



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudios genómicos y caracterización funcional  
de rizobios tipo Oregon noduladores de alfalfa y  
otras leguminosas**

---

Lic. Gonzalo A. Torres Tejerizo

Director: Prof. Dr. Mariano Pistorio

Codirector: Prof. Dr. Antonio Lagares

2011





Universidad Nacional de La Plata  
 Facultad de Ciencias Exactas  
 Departamento de Ciencias Biológicas  
 CONICET - CCT La Plata  
 Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

Tesis Doctoral

Estudios genómicos y caracterización funcional de rizobios tipo Oregon noduladores de alfalfa y otras leguminosas

Gonzalo A. Torres Tejerizo

Director: Prof. Dr. Mariano Pistorio  
 Codirector: Prof. Dr. Antonio Lagares

Junio 2011



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

*A mis padres*

*A mi abuela y a la  
memoria de mi abuelo*

## Mi reconocimiento

A la Universidad Nacional de La Plata por formarme desde hace más de quince años cuando comencé en el Colegio Nacional de La Plata.

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

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

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla, al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y al CeBiTec de la Universidad de Bielefeld, donde pude realizar experimentos del presente trabajo.

## Mi Agradecimiento

Al Prof. Dr. Mariano Pistorio, por dirigir mi trabajo, por su confianza, enseñanza y estímulo. Por nuestra estadía en Bielefeld y por no ser solamente mi director, sino un amigo y consejero.

Al Prof. Dr. Antonio Lagares, por codirigir mi trabajo, por su apoyo, sus ideas, consejo y enseñanza.

A la Dra. Florencia Del Papa, por ayudarme y aconsejarme en todo momento. Por leer, corregir y estar siempre dispuesta a ayudar.

A Juli y a Fede, por compartir lo que saben, escuchar mis experimentos y aconsejarme.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir todos estos años de experimentos y charlas.

A los integrantes de R3 por hacerme divertidas las horas en el laboratorio y compartir innumerables charlas (tanto científicas como...bueno, mejor no escribirlo).

A todos los integrantes del IBBM, a los que están y a los que se fueron. Por los consejos, los equipos compartidos, las reuniones nocturnas, los almuerzos y los "fulbitos".

Al Prof. Dr. Manuel Megías y al Prof. Dr. Antonio Gil-Serrano, por abrirme las puertas de sus laboratorios y colaborar en todo para que mi estadía sea fructífera y agradable. A todos los integrantes de sus laboratorios por su compañerismo y predisposición.

Al Prof. Dr. Alfred Pühler y a todos los que colaboraron mientras estuve en Bielefeld por brindarme todo lo necesario para no sentirme tan solo.

A Julia, por estar y dejarme estar, por aguantar mi dedicación (o fanatismo) y por ayudarme en todo. Por tu apoyo y tus retos de mis consumos de hidratos...jeje.

A JPG, por acompañarme innumerables días al labo, por aconsejarme y querer cambiar mi formalidad...aunque no puedas...

A Florcita, por preocuparte por todo y por tu amistad.

A Augusto F., Florencia G., Ileana S., Julieta C., Mauro S. y Paula R., por estar siempre.

A mi familia, por su apoyo incondicional y aguantarme siempre.

A todos, ¡Gracias!

# Índice General.

	<i>Página</i>
<b>Capítulo I: Introducción</b>	<b>1</b>
<i>I.1. Evolución.</i>	3
<i>I.2. La transferencia horizontal de genes, fuerza generadora de diversidad bacteriana.</i>	3
I.2.a. Caracteres comunes introducidos por transferencia horizontal de genes.	5
Resistencia a antibióticos.	5
Biodegradación de compuestos xenobióticos.	6
Determinantes de patogenicidad y simbiosis.	6
I.2.b. Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias.	7
I.2.b.i. Transformación.	8
I.2.b.ii. Transducción.	9
I.2.b.iii. Conjugación.	10
I.2.b.iii.1. Descripción de la maquinaria involucrada en la transferencia conjugativa.	12
I.2.b.iii.2. Modulación de la transferencia conjugativa.	13
Regulación de los elementos del Dtr y Mpf.	13
Regulación en la replicación y segregación plasmídica.	15
Mecanismos involucrados en la exclusión.	16
Mecanismos de inmunidad.	17
I.2.c. Rol de la transferencia horizontal de genes en la adaptación bacteriana.	17
<i>I.3. Simbiosis y transferencia horizontal de genes.</i>	19
I.3.a. Generalidades de la simbiosis entre rizobios y leguminosas.	19
I.3.b. Etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa.	20
I.3.b.i. Intercambio de señales al comienzo de la interacción planta-bacteria.	20
I.3.b.ii. Adhesión de los rizobios a las raíces.	22
I.3.b.iii. Formación del hilo de infección.	23
I.3.b.iv. Desarrollo del hilo de infección.	24
I.3.b.v. Endocitosis del rizobio.	25
I.3.b.vi. Diferenciación del bacteroide.	25
I.3.b.vii. Desarrollo del nódulo e intercambio de nutrientes.	27
I.3.c. Implicancias de la transferencia horizontal de genes en la especiación de microorganismos simbióticos.	28
<i>I.4. Características generales de los genomas de los rizobios.</i>	30
I.4.a. Plásmidos simbióticos.	32
I.4.b. Plásmidos no simbióticos.	32
I.4.c. Transferencia plasmídica en los rizobios.	33

I.5. <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) como sistema modelo de la interacción rizobio-leguminosa.	35
I.6. Rizobios noduladores de alfalfa tolerantes a la acidez, los rizobios tipo Oregon.	36
I.6.a. Amplia distribución geográfica y baja variabilidad genómica de los rizobios tipo Oregon.	36
I.6.b. El aislamiento <i>Rhizobium</i> sp. LPU83 es un rizobio tipo Oregon.	38
I.6.c. Propiedades simbióticas de los rizobios tipo Oregon.	38
I.6.d. Estudios taxonómicos previos con el objetivo de dilucidar las relaciones genómicas de los rizobios tipo Oregon.	40
<b>I.7. Objetivos.</b>	<b>43</b>
I.7.a. Consideraciones generales.	43
I.7.b. Objetivos Generales.	43
I.7.c. Objetivos Específicos.	43
<b>Capítulo II: Materiales y Métodos</b>	<b>45</b>
II.1. Cepas bacterianas y plásmidos.	47
II.2. Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.	50
II.2.a. Medios de cultivo.	50
II.2.b. Medios de conservación.	52
II.2.c. Antibióticos.	52
II.3. Procedimientos microbiológicos.	52
II.3.a. Métodos de conjugación.	52
II.3.a.i. Conjugaciones biparentales.	52
II.3.a.ii. Conjugaciones Triparentales.	53
II.3.b. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de <i>E.coli</i> .	53
II.4. Técnicas de biología molecular.	54
II.4.a. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreps").	54
II.4.b. Extracción de ADN total.	54
II.4.c. Electroforesis de ADN.	55
II.4.c.i. Geles de lisis in situ.	55
II.4.c.ii. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.	55
II.4.c.iii. Revelado de geles y fotografía.	56
II.4.c.iv. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.	56
II.4.c.v. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	56
II.4.d. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).	56



II.4.e. Tratamientos enzimáticos del ADN.	58
II.4.f. Precipitación del ADN con etanol.	58
II.4.g. Ensayos de hibridación (Southern blot).	58
II.4.h. Construcción de sondas marcadas con digoxigenina (DIG) por PCR.	59
II.4.i. Construcción de una biblioteca genómica en fósidos.	59
II.4.j. Método general para la caminata genómica.	59
II.4.k. Construcción de la cepa reportera de la inducción de los genes involucrados en la síntesis de factores de nodulación en <i>R. sp.</i> LPU83.	60
II.4.l. Construcción de un mutante <i>nodH</i> estable en <i>R. sp.</i> LPU83.	60
II.4.m. Recuperación de las zonas aledañas a la integración de transposones.	61
II.4.n. Construcción de un mutante en el gen <i>traR</i> del plásmido pLPU83a.	61
II.4.o. Complementación del mutante <i>R. sp.</i> LPU83- <i>traR</i> <sup>-</sup> en trans.	61
II.4.p. Construcción de una cepa isogénica de <i>R. sp.</i> LPU83 que expresa la proteína verde fluorescente.	61
II.4.q. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.	62
II.4.r. Secuenciación de ADN.	62
II.4.r.i. Pirosecuenciación.	62
Ensamblado y nomenclatura.	62
II.4.r.ii. Secuenciamiento por el método de Sanger.	63
<b>II.5. Inducción, detección, y purificación de los factores de nodulación.</b>	63
II.5.a. Compuestos utilizados como inductores.	63
II.5.b. Detección de NFs por cromatografía en capa fina.	64
II.5.c. Obtención de NFs a gran escala.	64
II.5.d. Purificación de los NFs obtenidos.	65
II.5.e. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas de los NFs.	65
<b>II.6. Captura de imágenes.</b>	66
II.6.a. Capturas digitales macroscópicas.	66
II.6.b. Microscopía óptica.	66
<b>II.7. Ensayos con plantas.</b>	66
II.7.a. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.	66
II.7.b. Condiciones de cultivo.	67
II.7.c. Cultivo axénico de plantas de alfalfa.	67
II.7.d. Solución nutritiva.	67
II.7.e. Inoculación de los cultivos.	68
II.7.f. Medida de la competitividad para la nodulación.	68

II.7.g. Reaislamiento de rizobios de los nódulos.	68
<b>II.8. Análisis bioinformático.</b>	<b>69</b>
II.8.a. Anotación.	69
II.8.b. Genómica comparativa.	69
II.8.c. Estudios filogenéticos.	69
II.8.d. Secuencias utilizadas.	69
<b>Capítulo III: Secuenciamiento completo de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83</b>	<b>71</b>
<i>III.1. Introducción.</i>	73
<i>III.2. Pirosecuenciamiento del genoma de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83.</i>	74
<i>III.3. Pirosecuenciamiento del genoma de <i>R. sp. LPU83</i> por la metodología de pares de extremos cercanos y análisis de los resultados obtenidos.</i>	77
<i>III.4. Construcción de una biblioteca genómica en fósmidos y utilización de la misma para determinar las estructuras genómicas de <i>R. sp. LPU83</i>.</i>	78
<i>III.5. Estrategias generales para la finalización de los replicones de <i>R. sp. LPU83</i>.</i>	80
III.5.a. Cromosoma.	81
III.5.b. Plásmido pLPU83c.	82
III.5.c. Finalización del plásmido pLPU83b.	83
III.5.d. Plásmido pLPU83a.	84
<b>Capítulo IV: Estudios de genómica comparativa de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83</b>	<b>85</b>
<i>IV.1. Introducción.</i>	87
<i>IV.2. Estudios filogenéticos para evaluar las relaciones genómicas de <i>R. sp. LPU83</i>.</i>	87
<i>IV.3. Características generales del genoma de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83.</i>	89
IV.3.a. Funciones asociadas a los diferentes replicones. Distribución de grupos de clusters ortólogos.	93
IV.3.b. Estudios de genómica comparativa.	95
IV.3.b.i. Evaluación de la estructura del cromosoma de <i>R. sp. LPU83</i> .	96
IV.3.b.ii. Evaluación de las zonas conservadas del plásmido de pLPU83a.	96
IV.3.c. Análisis comparativo del contenido genético de los rizobios tipo Oregon.	96
<i>IV.4. Búsqueda y análisis de regiones y genes de interés en <i>R. sp. LPU83</i>.</i>	99
IV.4.a. Genes involucrados en la interacción planta-bacteria.	99
IV.4.a.i. Determinantes de la síntesis de componentes superficiales.	100
IV.4.a.i.1. Exopolisacáridos.	100
IV.4.a.i.2. Lipopolisacáridos.	101

IV.4.a.ii. Comparación de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno.	102
IV.4.b. Genes involucrados en la replicación y transferencia plasmídica.	103
IV.4.b.i. Estudio de las funciones replicativas de los distintos replicones.	103
IV.4.b.ii. Identificación de genes implicados en funciones conjugativas.	105
<b>Capítulo V: Estructura química y determinantes genéticos de los factores de nodulación de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83</b>	<b>111</b>
<i>V.1. Introducción.</i>	113
<i>V.2. Estructura genética del cluster de genes de nodulación en el plásmido pLPU83b.</i>	114
<i>V.3. Análisis de los genes nodD presentes en la cepa R. sp. LPU83.</i>	115
<i>V.4. Inferencia de la posición filogenética de la cepa R. sp. LPU83 dentro de los rizobios noduladores de alfalfa a partir de la región intergénica nodEG (IGS<sub>NOD</sub>).</i>	117
<i>V.5. Estudio de la inducción de los genes de nodulación en la cepa R. sp. LPU83.</i>	117
<i>V.6. Análisis estructural de los factores de nodulación producidos por la cepa R. sp. LPU83.</i>	119
<i>V.7. Efecto de la sobreproducción de NFs en el comportamiento simbiótico de la cepa R. sp. LPU83.</i>	124
<b>Capítulo VI: Estudios de la transferencia conjugativa de los plásmidos de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83</b>	<b>127</b>
<i>VI.1. Introducción.</i>	129
<i>VI.2. Marcación de los plásmidos de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83 por medio de un transposón Tn5-B10.</i>	129
<i>VI.3. Estudio de las regiones genéticas involucradas en la conjugación presentes en R. sp. LPU83.</i>	132
<b>Capítulo VII: Influencia de los plásmidos transmisibles de <i>Rhizobium</i> sp. LPU83 en la simbiosis</b>	<b>139</b>
<i>VII.1. Introducción.</i>	141
<i>VII.2. Caracterización funcional del plásmido pLPU83a.</i>	142
<i>VII.3. Complementación de <i>E. meliloti</i> SmA818 con pLPU83b.</i>	144
<b>Capítulo VIII: Discusión General y Conclusiones</b>	<b>151</b>
<i>VIII.1. Discusión General.</i>	153
<i>VIII.2. Conclusiones.</i>	159
<i>VIII.3. Perspectivas.</i>	160
<b>Anexo</b>	<b>161</b>

<i>A. Evaluación de la formación de hilos de infección por R. sp. LPU83.</i>	163
<i>B. Publicaciones relacionadas a este trabajo.</i>	165
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>167</b>

## Índice de Figuras.

	<i>Página</i>
Figura I.1. Esquema general de transformación.	8
Figura I.2. Esquema general de transducción.	10
Figura I.3. Esquema general de conjugación.	11
Figura I.4. Mecanismos de transferencia de plásmidos.	11
Figura I.5. Esquema de la maquinaria conjugativa.	14
Figura I.6. Esquema de la señalización temprana entre rizobios y leguminosas.	21
Figura I.7. Esquema del desarrollo de nódulos indeterminados y determinados.	26
Figura I.8. Análisis filogenético del gen del 16s rDNA.	41
Figura I.9. Análisis filogenético del gen <i>nodC</i> .	42
Figura II.1. Estrategia de secuenciamiento.	63
Figura III.1. Comparación del número de genomas procariotas completos publicados por año.	74
Figura III.2. Frecuencia del largo de las lecturas obtenidas de <i>R. sp.</i> LPU83 del primer pirosecuenciamiento.	75
Figura III.3. Alineamientos de los contigs obtenidos de <i>R. sp.</i> LPU83 con diferentes genomas de referencia.	76
Figura III.4. Ordenamiento de los scaffolds con la información de la biblioteca genómica.	79
Figura III.5. Esquema del orden de los scaffolds del cromosoma de <i>R. sp.</i> LPU83.	82
Figura III.6. Orden de los scaffolds que conforman el plásmido pLPU83c.	83
Figura III.7. Orden parcial de los scaffolds en pLPU83b.	84
Figura IV.1. Análisis filogenético mediante el uso de siete genes concatenados.	88
Figura IV.2. Análisis filogenético de rizobios completamente secuenciados	89
Figura IV.3. Esquema del cromosoma de <i>R. sp.</i> LPU83.	90
Figura IV.4. Mapa físico del megaplásmido pLPU83c.	91
Figura IV.5. Esquema del plásmido pLPU83a.	92
Figura IV.6. Evaluación de la sintenia genética del cromosoma de <i>Rhizobium sp.</i> LPU83.	97
Figura IV.7 Genética comparativa del plásmido pLPU83a.	98
Figura IV.8. Comparación del contenido genético mediante diagramas de Venn.	99
Figura IV.9. Comparación de la organización de los genes <i>exo</i> .	101
Figura IV.10. Comparación de los <i>clusters</i> de genes involucrados en la síntesis de LPS.	102
Figura IV.11. Metabolismo del nitrógeno en <i>R. sp.</i> LPU83, <i>R. etli</i> CFN42 y <i>E. meliloti</i> 1021.	103
Figura IV.12. Análisis filogenético de genes <i>repA</i> de rizobios.	106
Figura IV.13. Análisis filogenético de genes <i>repB</i> de rizobios.	107
Figura IV.14. Análisis filogenético de genes <i>repC</i> de rizobios.	108

Figura IV.15. Esquemas de la organización de los genes involucrados en la transferencia conjugativa descriptos en rizobios.	109
Figura IV.16. Mapas de las regiones involucradas en la transferencia conjugativa halladas en los plásmidos de <i>R. sp.</i> LPU83.	109
Figura V.1 Organización genética del cluster de nodulación en la cepa <i>R. sp.</i> LPU83.	115
Figura V.2. Árbol filogenético tipo <i>Neighbor-joining</i> de los genes <i>nodD</i> .	116
Figura V.3. Árbol filogenético tipo <i>Neighbor-joining</i> para IGS <sub>NOD</sub> de los rizobiosnoduladores de alfalfa.	118
Figura V.4. Análisis de los NFs producidos por <i>R. sp.</i> LPU83 y <i>R. sp.</i> LPU83-H mediante el uso de RP-TLC.	119
Figura V.5. Análisis por HPLC y espectrometría MS/MS de los LCOs purificados.	123
Figura V.6. Cinéticas de aparición de nódulos en raíces de alfalfa de las cepas <i>R. sp.</i> LPU83 y la sobreproductora de NFs, <i>R. sp.</i> LPU83 (pMP640).	124
Figura VI.1 Esquema de la estrategia general utilizada para la marcación e identificación de mutantes en los distintos plásmidos de la cepa <i>R. sp.</i> LPU83.	131
Figura VI.2 Perfiles plasmídicos en geles de lisis <i>in situ</i> .	132
Figura VI.3. Comparación de los mapas genéticos de los Mpf presentes en <i>R. sp.</i> LPU83.	134
Figura VI.4. Esquema de la mutagénesis sitio dirigida en <i>traR</i> .	135
Figura VI.5. Complementación del mutante <i>R. sp.</i> LPU83- <i>traR</i> .	136
Figura VII.1. Cinéticas de nodulación de <i>E. meliloti</i> portando el plásmido pLPU83a en condiciones de acidez y neutralidad.	143
Figura VII.2. Ensayo para estimar la fijación biológica de nitrógeno de <i>E. meliloti</i> 2011 portando el plásmido pLPU83a.	144
Figura VII.3. Evaluación por PCR de la complementación genética de SmA818 con el plásmido simbiótico de <i>R. sp.</i> LPU83, pLPU83b.	145
Figura VII.4. Evaluación de los perfiles plasmídicos de las cepas quiméricas.	146
Figura VII.5. Cinéticas de nodulación de las cepas complementadas en condiciones de acidez y neutralidad.	148
Figura VII.6. Evaluación de la estructura interna de los nódulos formados por las bacterias complementadas.	149
Figura Anexo.1. Hilos de infección formados por <i>R. sp.</i> LPU83-GFP	164



## Índice de Tablas.

	<i>Página</i>
Tabla I.1. Comparación genómica de diferentes especies de rizobios.	30
Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.	47
Tabla II.2. Plásmidos y transposones utilizados en el presente trabajo.	48
Tabla II.3. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en reacciones de PCR en este trabajo.	57
Tabla III.1 Resultados obtenidos del pirosecuenciamiento.	78
Tabla IV.1. Análisis general del genoma de <i>R. sp.</i> LPU83.	93
Tabla IV.2. Distribución de COGs en <i>R. sp.</i> LPU83.	94
Tabla IV.3. Comparación de los COGs sobrerrepresentados en los rizobios	95
Tabla IV.4. Presencia de los genes <i>nif</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en cepas de rizobios secuenciadas completamente.	104
Tabla V.1. Estructuras de los factores de nodulación producidos por <i>R. sp.</i> LPU83 y su mutante <i>nodH</i> .	121
Tabla V.2. Comparación de los factores de nodulación y sus decoraciones.	122
Tabla VI.1. Frecuencias de conjugación de los plásmidos de <i>R. sp.</i> LPU83 en diferentes entornos genómicos.	132
Tabla VII.1. Evaluación del comportamiento simbiótico de las cepas complementadas.	147

## *Abreviaturas.*

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
Ap:	Ampicilina
bv.:	biovariedad
DO:	Densidad Óptica
EPS:	Exopolisacárido bacteriano
FBN:	Fijación Biológica de Nitrógeno
GFP:	Proteína verde fluorescente
Gm:	Gentamicina sulfato
HGT:	Transferencia Horizontal de genes, <i>Horizontal Gene Transfer</i>
IS:	Secuencia de Inserción
Km:	Kanamicina sulfato
LPS:	Lipopolisacárido bacteriano
NFs:	Factores de nodulación
Nm:	Neomicina sulfato
PCR:	" <i>Polymerase Chain Reaction</i> ", reacción en cadena de la polimerasa.
Sm:	Estreptomina
Sp:	Espectinomicina
Tc:	Tetraciclina
TY:	Medio de cultivo triptona extracto de levadura
u.f.c.:	unidades formadoras de colonias bacterianas.
wt:	Tipo salvaje
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido

# **Capítulo I**

## **Introducción**



## **I.1. Evolución.**

La evolución biológica comenzó hace más de 3,8 billones de años con la formación de la célula primitiva (Nisbet & Sleep, 2001). Las mismas evolucionaron mediante cambios genéticos que le permitieron obtener funciones metabólicas y sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables. Los microorganismos que sufrieron cambios en su material genético tuvieron la posibilidad de sobrevivir en un ecosistema y fueron seleccionados a lo largo del tiempo (Darwin, 1860), generando así, una diversidad genética que estableció las bases para la selección y evolución de las poblaciones microbianas (Clarke, 1984).

El desarrollo de modelos para realizar estudios filogenéticos ha permitido conocer las fuerzas que gobiernan la evolución demostrando la existencia de una primera forma de vida, el ancestro común, a partir del cual evolucionaron el resto de los organismos (Woese, *et al.*, 1990; Pace, 1997).

La evolución bacteriana es dirigida, principalmente, por tres mecanismos: transferencia vertical de genes, transferencia horizontal de genes (HGT, *Horizontal Gene Transfer*) y recombinación. Estos mecanismos han desempeñado un papel fundamental en la distribución del material genético (Slater, 1984; Hall, 1984). Las mutaciones que permiten a ciertos microorganismos sobrevivir a una determinada condición ambiental son transmitidas entre generaciones por transferencia vertical de genes y son rápidamente distribuidas, la recombinación genera nuevas variantes alélicas y la HGT permite el intercambio “no genealógico” de material genético de un organismo a otro (Goldenfeld & Woese, 2007). El intercambio genético genera organismos con múltiples atributos de otros organismos. Sin lugar a dudas, la HGT ha jugado un papel muy importante en la evolución de los genomas y es una de las principales fuerzas de la evolución procariota (Davison, 1999; Arber, 2000; Koonin & Wolf, 2008).

## **I.2. La transferencia horizontal de genes, fuerza generadora de diversidad bacteriana.**

La habilidad de las bacterias para explotar nuevos ambientes y responder a nuevas presiones de selección a lo largo del proceso evolutivo puede ser, en la mayoría de los casos, mejor explicada en base a los mecanismos de adquisición de nuevos genes por HGT que por modificaciones genéticas basadas en la acumulación de mutaciones puntuales (Syvanen, 1994; Lawrence & Ochman, 1997). La HGT entre diversos organismos es uno de

los temas más estudiados en las ciencias biológicas desde 1940 y su estudio ha adquirido un nuevo interés debido a los posibles peligros de la liberación, accidental o deliberada, de organismos genéticamente modificados al ambiente.

La liberación potencial de microorganismos genéticamente modificados al ambiente ha generado un debate profundo y ha demostrado que el conocimiento existente de la transferencia de genes bajo condiciones naturales no es extenso. En vistas de la liberación de microorganismos con propósitos agrícolas es necesario ahondar el conocimiento del proceso de HGT. Estos organismos que son liberados suelen estar relacionados con un aumento en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*), la solubilización de fosfatos (*Burkholderia*, *Erwinia*), el control de hongos y bacterias patógenas (*Pseudomonas*, *Erwinia*), la estimulación del crecimiento vegetal (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*), el control de insectos (*Bacillus thuringiensis*), y la bioremediación de áreas contaminadas con compuestos xenobióticos (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*) (Davison, 1988; Wilson & Lindow, 1993).

Para estudiar el rol de la HGT en la evolución bacteriana, han sido descriptas, principalmente, dos aproximaciones (Sorensen, *et al.*, 2005):

- A través del secuenciamiento masivo de genomas y herramientas bioinformáticas es posible la comparación entre genes y proteínas con funciones similares (Syvanen, 1994). La presencia de variación genómica en bacterias puede ser interpretada como un ejemplo de HGT que contribuye a la evolución y adaptación. La reciente aparición de genomas completamente secuenciados hacen que estos estudios puedan ser desarrollados (Ochman, *et al.*, 2000; Gogarten & Townsend, 2005).

- Experimentalmente puede estudiarse cómo las bacterias adquieren, modifican o pierden material genético por HGT en un sistema definido. Las evidencias de que la HGT ocurre naturalmente suelen observarse por la dispersión de ciertos fenotipos como la resistencia a antibióticos o a metales pesados. Estas aproximaciones experimentales requieren que las células receptoras no posean el fenotipo a estudiar (Sorensen, *et al.*, 2005).

La secuencia completa del genoma de *Escherichia coli* ha permitido un análisis molecular retrospectivo de la frecuencia de transferencia con que ha intercambiado material cromosomal (Lawrence & Ochman, 1998; Ochman & Jones, 2000). De esta manera, se encontró que los linajes de *Salmonella enterica* y *E. coli* se separaron aproximadamente hace 100 millones de años. Un análisis basado en la diferencia en composición y patrones de utilización de codones ha permitido realizar una estimación de la extensión de la HGT. Como resultado de este análisis, aproximadamente el 17 % de los genes de *E. coli* han sido



adquiridos por transferencia horizontal. La dispersión de genes de resistencia a antibióticos y de vías catabólicas que permiten la degradación de compuestos xenobióticos en diferentes bacterias es causada, en conjunto, por la HGT y la presión de selección causada por la presencia de estas sustancias en los ambientes naturales (Levy, 1992; van der Meer, *et al.*, 1992; Davies, 1996; Salyers & Shoemaker, 1996). De manera similar, numerosas islas de patogenicidad han sido adquiridas por una variedad de patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Dichelobacter nodosis*, *Helicobacter pylori* y algunas variantes de *E. coli* (Hacker, *et al.*, 1997).

### **I.2.a. Caracteres comunes introducidos por transferencia horizontal de genes.**

Para que la HGT sea un mecanismo exitoso, es necesario que los genes transferidos persistan en las bacterias receptoras (Thomas & Nielsen, 2005). Los genes que codifican para el ARN ribosomal no suelen ser transferidos de manera exitosa debido a que las células receptoras poseen genes con funciones similares. En estos eventos, los genes ortólogos nativos tienen una historia de co-evolución en el tiempo con el resto de la maquinaria celular y es poco probable que sean reemplazados por los genes entrantes. En cambio, genes con una selección pobre o transitoria (vías catabólicas no esenciales) pueden beneficiar a otras bacterias por la adquisición de sus funciones. De esta forma es que la HGT previene la pérdida, debido a deleciones, de estos genes con poca selección ya que éstos se encuentran ampliamente distribuidos entre los linajes bacterianos.

El impacto de la transferencia horizontal se observa claramente cuando existe una correlación entre la adquisición de una capacidad particular y la habilidad para explotar nuevos ambientes o estilos de vida. Si bien las funciones de algunos genes adquiridos han sido determinadas, no siempre es claro cuál es el mejor ambiente para explotar las capacidades que estos suministran. En otros casos, se sabe cuáles son los genes que intervienen en la explotación de algunos nichos ecológicos, pero no se ha podido determinar con precisión cuál es la contribución fisiológica en la que se encuentran involucrados (Lawrence, 1999).

Existen numerosos ejemplos bien estudiados donde la HGT interviene en los procesos de adaptación de las bacterias:

#### *Resistencia a antibióticos.*

La dispersión de resistencias a antibióticos entre patógenos (tanto humanos como animales) y poblaciones comensales es el paradigma de la HGT. La transferencia de genes

involucrados en la resistencia a antibióticos permite a los microorganismos expandir su nicho ecológico al permitir la proliferación en presencia de compuestos tóxicos. En los últimos 50 años hemos sido capaces de obtener información sobre las respuestas de diferentes ecosistemas al someterlos a diversos antibióticos bacterianos, resultados de numerosos estudios han demostrado que los genes involucrados en la resistencia a antibióticos suelen encontrarse asociados a elementos genéticos con una alta capacidad de movilización. Los plásmidos son capaces de transferirse entre especies y constituyen la vía más común de adquirir determinantes asociados a la resistencia a antibióticos (Gotz, *et al.*, 1996; Yan, *et al.*, 2002; Schjørring, *et al.*, 2008; Nagachinta & Chen, 2009). Estudios recientes a partir del secuenciamiento de plásmidos de bacterias de una planta de tratamiento de aguas residuales encontraron que la misma es una fuente de genes asociados a la resistencia a antibióticos. En ella se detectaron genes codificando para la resistencia a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactamasas, cloranfenicol, rifampicina, tetraciclina y sulfonamidas, entre otros. Estos resultados sugieren que los efluentes de estas plantas de tratamiento podrían diseminar al medio ambiente los genes de resistencia a antibióticos (Szczepanowski, *et al.*, 2009).

#### *Biodegradación de compuestos xenobióticos.*

No es sorprendente que la HGT haya permitido la dispersión de operones involucrados en la degradación de compuestos xenobióticos en ambientes contaminados (Williams & Sayers, 1994; van der Meer, 1997; Basta, *et al.*, 2004; Bathe, *et al.*, 2004). En este caso, las presiones de selección impuestas por estos compuestos son similares a los antibióticos, pero la degradación de los compuestos xenobióticos requieren sistemas enzimáticos complejos, usualmente operones de 10 o más genes. Por ejemplo, el plásmido pNL1 de *Sphingomonas aromaticovorans* contiene un grupo de 15 genes directamente asociados con el catabolismo y transporte de compuestos aromáticos (Romine, *et al.*, 1999). También se han encontrado microorganismos que poseen plásmidos autotransmisibles que portan los genes necesarios para degradar naftaleno (Herrick, *et al.*, 1997; Stuart-Keil, *et al.*, 1998; Obayori & Salam, 2010).

#### *Determinantes de patogenicidad y simbiosis.*

Algunos plásmidos en bacterias patogénicas están cargados con determinantes para la virulencia, los cuales pueden variar desde los asociados con la producción de toxinas o al sabotaje de la maquinaria celular. Otros plásmidos llamados “patogénicos” son relevantes debido a que su sola presencia puede cambiar el comportamiento de su bacteria

hospedadora. A este grupo pertenecen el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y los plásmidos de virulencia de *Yersinia*, *Shigella* y *E. coli*. Cuando estos plásmidos son adquiridos por una nueva bacteria, ellos crean, en esencia, un nuevo tipo de bacteria (Sundin, 2008; Kado, 2009).

Otro claro ejemplo son las islas de patogenicidad (Barinaga, 1996; Groisman & Ochman, 1997), las cuales codifican para funciones fisiológicas bien definidas (por ejemplo, adhesinas, sistema de secreción tipo III, sistemas de incorporación de hierro) y están asociadas con el desarrollo de un estilo de vida definido como es el crecimiento dentro de un huésped eucariótico específico. La promiscuidad de las islas de patogenicidad permite a diferentes taxones bacterianos adquirir un complejo comportamiento patogénico a través de un evento de transferencia horizontal (Lawrence, 1999). La evolución de las islas de patogenicidad es el paradigma de la evolución lenta de las funciones bacterianas. Si bien muchas de ellas se integran en el cromosoma, existe evidencia que sugiere que son o han sido parte de elementos genéticos móviles.

En los últimos tiempos, las islas de patogenicidad junto a los elementos conjugativos integrativos, transposones conjugativos y algunos profagos, han sido denominados islas genómicas (GEIs, *Genomic Islands*). Las GEIs son elementos de ADN discretos que difieren entre bacterias cercanas. Algunos de estos elementos son móviles, mientras que otros o no lo son, o lo fueron. Las GEIs son capaces de integrarse al cromosoma del huésped, escindir y transferirse a un nuevo huésped por transformación, transducción o conjugación. Una porción significativa de la HGT es o ha sido facilitada por las GEIs, por lo cual determinan un rol crucial en la evolución de un amplio espectro de bacterias debido a que están involucradas en la diseminación de genes (Juhas, *et al.*, 2009).

Como veremos en secciones posteriores, los rizobios, microorganismos que pueden interactuar con plantas en una asociación simbiótica que tiene como resultado la fijación de nitrógeno atmosférico, suelen poseer la información necesaria para esta simbiosis en grandes plásmidos, algunos de ellos movilizables y capaces de brindar las características necesarias para generar nuevos organismos simbióticos (Rogel, *et al.*, 2011).

### **I.2.b. Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias.**

La HGT entre bacterias puede realizarse por tres mecanismos conocidos: transformación, transducción y conjugación. La transformación es un proceso en el cual las bacterias adquieren moléculas de ADN desnudo del entorno. La transducción es un proceso por el cual el ADN es transferido a otras bacterias por un virus. La conjugación es la transferencia de material genético (plásmidos) entre bacterias mediante el contacto directo célula - célula.

Debido a que muchos plásmidos exhiben un amplio rango de hospedadores para la transferencia y replicación autónoma, la conjugación es considerada como un factor importante en la dispersión de genes entre bacterias y una de las maneras más eficientes para el intercambio de información genética entre procariotas (Fry & Day, 1990; Amábile-Cuevas & Chicurel, 1993).

#### I.2.b.i. *Transformación.*

La transformación (Figura I.1) se refiere al proceso que involucra la incorporación estable, la integración y la expresión funcional de ADN extracelular, que puede ocurrir bajo condiciones normales de crecimiento bacteriano. Para que ocurra este proceso de manera natural, las células deben desarrollar, en primer lugar, un estado fisiológico de competencia, en el cual se han visto implicadas aproximadamente entre 20 y 50 proteínas. Con excepción de algunas bacterias, este estado de competencia tiene una duración limitada y responde a condiciones ambientales como alteraciones en las condiciones de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, densidad celular (*quórum sensing*) o ayuno (Cohan, *et al.*, 1991; Thomas & Nielsen, 2005). La proporción de bacterias naturalmente transformables es aproximadamente un 1 % de las bacterias descritas, y dentro de ese grupo, las bacterias que desarrollan este estado de competencia puede variar desde cero a cien por ciento (Jonas, *et al.*, 2001). La habilidad para incorporar ADN desnudo por transformación natural ha sido detectada en arqueas y en algunos tipos de bacteria, incluyendo grupos representativos de Gram positivos, Gram negativos y cianobacterias, entre otros (Lorenz & Wackernagel, 1994; Paget & Simonet, 1994). La capacidad conservada de adquirir las moléculas de ADN mediante transformación por parte de una amplia gama de bacterias, indica que el fenotipo es funcionalmente importante en el ambiente permitiendo el acceso del ADN como información genética (Thomas & Nielsen, 2005). Las bacterias competentes pueden incorporar el ADN libre en solución, como también el asociado a partículas y a restos celulares (Juni, 1972; Lorenz, *et al.*, 1988; Lorenz & Wackernagel, 1990; Stewart, *et al.*, 1991).

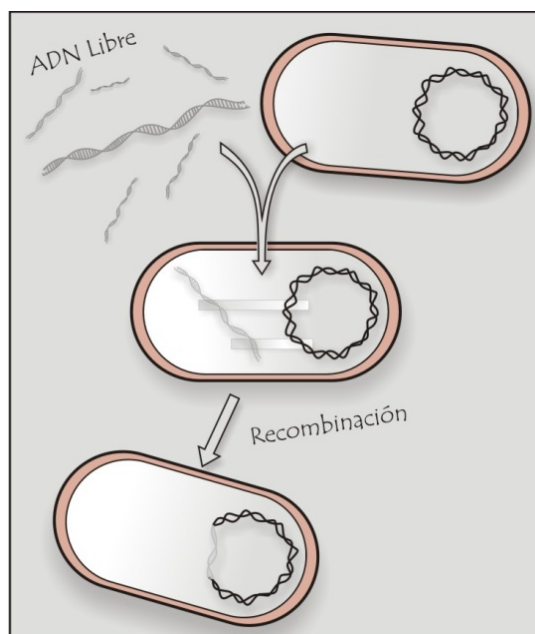


Figura I.1. Esquema general de transformación.

A pesar de su sensibilidad a las nucleasas (DNAsas), el ADN es relativamente común en casi todos los entornos y puede ser liberado por bacterias vivas o en procesos de autólisis (Lorenz & Wackernagel, 1994). El ADN en el medio ambiente puede ser degradado por nucleasas o bien estabilizado por adsorción a partículas de arena y arcilla. De esa manera se vuelve de 100 a 1000 veces más resistente a las DNAsas y mantiene su capacidad transformante por semanas (Khanna & Stotzky, 1992; Romanowski, *et al.*, 1993; Lorenz & Wackernagel, 1994).

En algunos casos, como *E. coli*, el estado de competencia puede ser inducido por tratamientos químicos o físicos. La transformación ha sido demostrada en diversos ecosistemas naturales (Williams, *et al.*, 1996; Ashelford, *et al.*, 1997; Lilley, *et al.*, 2003; Simpson, *et al.*, 2007; Jackson, *et al.*, 2008), y si bien la dilución del ADN en ambientes marinos podría ser un impedimento, ha sido demostrado que en *biofilms* situados en ambientes acuáticos la HGT por transformación puede ser significativa (Baur, *et al.*, 1996).

#### I.2.b.ii. *Transducción.*

En el proceso de transducción, genes bacterianos son incorporados accidentalmente en bacteriófagos y luego son transferidos a otras bacterias, donde es posible que se produzca la recombinación y posterior herencia estable de los mismos (Figura I.2) (Frost, *et al.*, 2005). El proceso de transducción es un mecanismo de HGT específico debido a que depende del rango de huésped del bacteriófago y de la resistencia de la bacteria a la infección por ese bacteriófago; en este sentido lo hace un mecanismo más restringido de HGT en condiciones naturales (Jiang & Paul, 1998) (Figura I.2).

El intercambio genético por transducción puede ocurrir, esencialmente, a través de tres formas: transducción generalizada, transducción especializada y transducción abortiva. En la transducción generalizada, un fago defectivo conteniendo sólo ADN bacteriano infecta a células hospedadoras y el ADN introducido es luego incorporado al cromosoma de la bacteria receptora o es mantenido como plásmido. En la transducción especializada, el cambio fenotípico en el huésped es debido a la lisogenización de un fago temperado; el gen codificando la nueva característica fenotípica es adyacente a la inserción del genoma del fago y es transferido a través de una escisión incorrecta del profago en la bacteria donadora. En la transducción abortiva, las secuencias cromosomales de la bacteria donadora, empaquetadas en el fago, son inyectadas en la célula receptora y expresadas transitoriamente antes que sean diluidas por la división celular. Esto se debe a que el ADN transferido no es capaz de replicarse o recombinarse en la célula receptora.

Varios autores han demostrado la existencia de fenómenos de transferencia de genes en el medio ambiente mediada por transducción, lo que evidencia que es un proceso significativo aunque limitado por su mecanismo (Morrison, *et al.*, 1978; Saye, *et al.*, 1987; Kidambi, *et al.*, 1994). Jiang & Paul (1998) demostraron que en ambientes marinos la transducción facilita la dispersión de plásmidos de amplio rango de huésped. Dichos autores pudieron calcular que la tasa de transducción por año puede ser de aproximadamente  $10^{14}$  eventos, lo que sugiere que en ambientes marinos es un importante mecanismo de HGT.

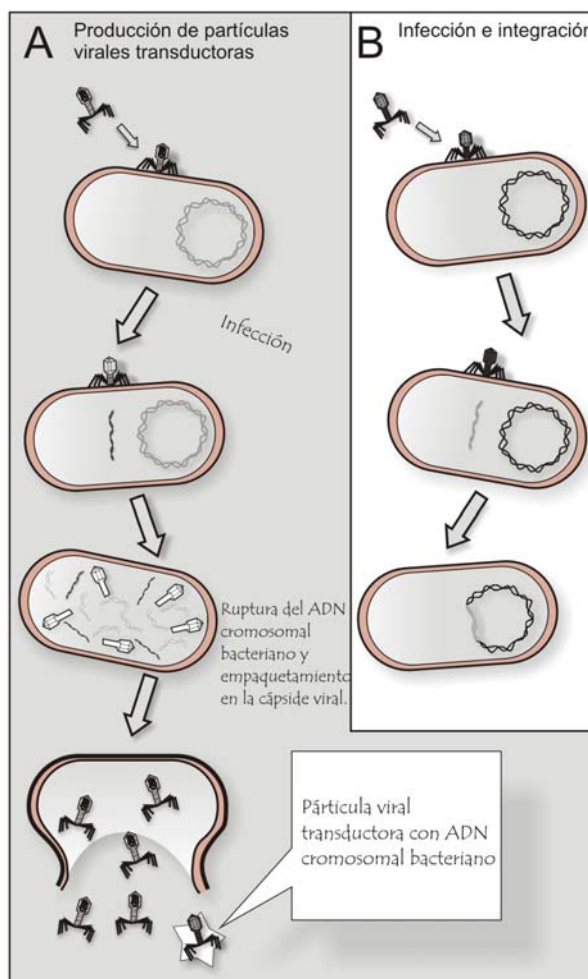


Figura I.2. Esquema general de transducción.

### I.2.b.iii. Conjugación.

La transferencia conjugativa de genes se considera el mecanismo más frecuente para la HGT entre bacterias (Fry & Day, 1990; Amábile-Cuevas & Chicurel, 1993). La conjugación es un proceso que requiere el contacto directo célula-célula. De este modo, los plásmidos son transferidos desde una célula donadora a una receptora. La conjugación se considera un factor importante para el flujo de genes entre bacterias ya que muchos plásmidos conjugativos exhiben un amplio rango de transferencia y replicación, lo que les permite un gran espectro para su dispersión (Figura I.3).

La conjugación puede ocurrir mediante diversos mecanismos:

- La transferencia de plásmidos que contienen en su secuencia toda la información necesaria para su transferencia (plásmidos auto-transmisibles o conjugativos) (Figura I.4.A).



- La transferencia de plásmidos que contienen el origen de transferencia (*oriT*), pero sólo pueden ser transferidos por la acción de un plásmido que aporte las funciones de transferencia, plásmido de ayuda o *helper* (plásmido movilizable) (Figura I.4.B).
- La transferencia de plásmidos por co-integración, donde dos plásmidos diferentes pueden recombinar para formar un tercer plásmido

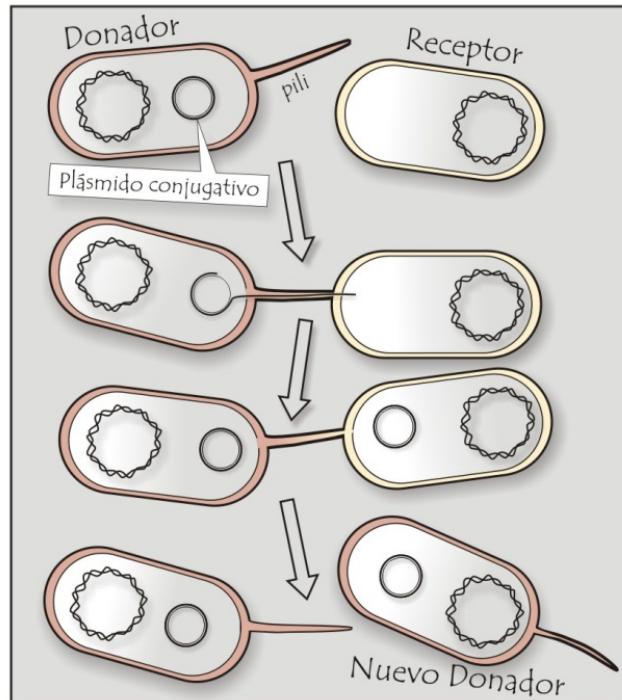


Figura I.3. Esquema general de conjugación.

- auto-transmisible. Así, un plásmido no transmisible puede ser transferido debido a la acción de un plásmido conjugativo y la recombinación. Esta fusión es generalmente facilitada por la presencia de transposones o secuencias de inserción. La resolución del cointegrado en la célula receptora puede ocurrir o no (Figura I.4.C).
- La transferencia conjugativa mediada por elementos conjugativos integrativos (ICEs, *Integrative Conjugal Elements*) o transposones conjugativos. Estos elementos móviles pueden transferirse a otras células facilitando la movilización de plásmidos (Clewel, *et al.*, 1995; Burrus, *et al.*, 2002).

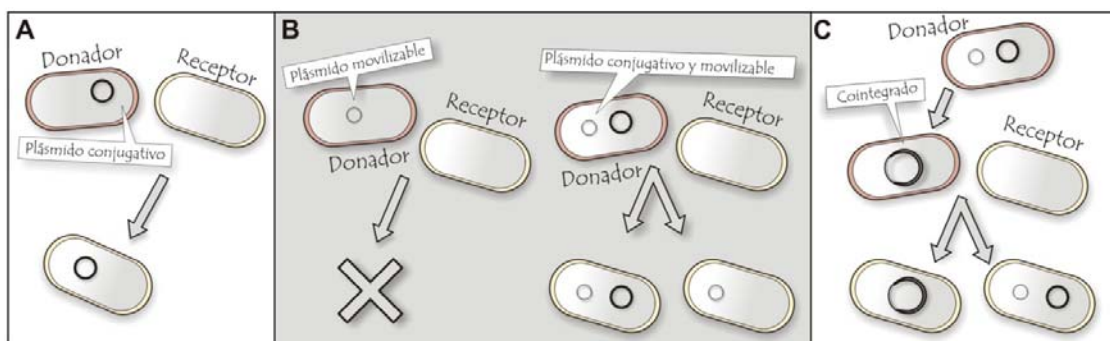


Figura I.4. Mecanismos de transferencia de plásmidos. **A.** Plásmido autotransmisible o conjugativo, posee en su secuencia la información para su transferencia. **B.** Plásmido no-autotransmisible, contiene *oriT* y puede ser movilizado por acción de un plásmido conjugativo. **C.** Transferencia de plásmidos por co-integración, dos plásmidos diferentes se fusionan para formar un tercero autotransmisible.

Numerosos plásmidos tienen un rango de replicación amplio. Por ejemplo, el grupo de plásmidos movilizables IncQ (como el plásmido RSF1010) tienen un extremadamente amplio rango de hospedadores, incluyendo a la mayoría de las bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas: *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Synechococcus* y *Mycobacterium*. Los plásmidos auto-transmisibles, como el RP4, y transposones conjugativos, como la familia del Tn916, también poseen un amplio rango de huésped. Miembros de la familia Tn916 se encuentran dispersos en más de 50 especies pertenecientes a 24 géneros bacterianos (Clewell, *et al.*, 1995; Salyers & Shoemaker, 1996).

La transferencia conjugativa ha sido demostrada en muchos tipos de ecosistemas: en superficies vegetales, ecosistemas animales, rizósfera y tanto en agua como en suelos contaminados o no (Davison, 1999). Así, las evidencias demuestran que la transferencia conjugativa se encuentra en una amplia variedad de bacterias y situaciones ambientales.

#### I.2.b.iii.1. Descripción de la maquinaria involucrada en la transferencia conjugativa.

Usualmente, los sistemas de transferencia conjugativa se encuentran codificados en un *cluster* de genes de transferencia, *tra*, el cual está compuesto por dos sistemas: el sistema de transferencia y replicación del ADN (Dtr, *DNA Transfer and Replication*) y el sistema de apareamiento del par conjugativo (Mpf, *Mating Pair Formation*). El sistema de Dtr contiene el origen de transferencia (*oriT*) que actúa en *cis* y es el lugar físico a partir del cual se inicia la transferencia conjugativa. También contiene los genes necesarios para el procesamiento del ADN, incluyendo la relaxasa, la helicasa, la primasa y otras proteínas accesorias. El sistema de Mpf consiste en genes que codifican para la formación del pili y el poro conjugativo, esto constituye el sistema de secreción tipo IV (T4SS, *Type 4 Secretion System*) (Lawley, *et al.*, 2003; Ding & Hynes, 2009). Al describir este proceso desde el punto de vista de su mecanismo bioquímico, existen tres etapas: el procesamiento del ADN, el reclutamiento del ADN y la translocación a la célula receptora (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). La conjugación se inicia cuando la relaxasa reconoce el *oriT*, y comienza su procesamiento mediante la generación de un corte (*nick*) en la hebra a ser transferida (hebra T). En este paso la relaxasa queda unida mediante un enlace covalente al extremo 5' de la hebra T y el ADN se relaja por el corte producido. El complejo ADN-proteína formado por la hebra T, la relaxasa y otras proteínas accesorias codificadas en el sistema del Dtr se denomina relaxosoma (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). El relaxosoma es reconocido por una proteína que los acopla (CP, *Coupling Protein*) al T4SS asociado (Szpirer, *et al.*, 2000). Luego, la relaxasa dirige a la hebra T a través del canal de translocación, y una vez dentro de la célula receptora cataliza la recircularización de la hebra T y la síntesis de la

hebra complementaria a la recientemente transferida (Figura I.5) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

Los ICEs deben ser procesados antes de su translocación. Para esto, una recombinasa los escinde del cromosoma formando un intermediario circular, en el cual luego el *oriT* es reconocido y continúa el procedimiento previamente descrito para la transferencia conjugativa de plásmidos. Una vez en la célula receptora el intermediario circular se integra por la acción de una integrasa codificada en el ICE (Figura I.5).

Si bien los elementos genéticos móviles pueden conferir beneficios a sus hospedadores, también pueden tener efectos adversos sobre ellos, y debido a esto es que la maquinaria conjugativa se encuentra modulada en diferentes estadios del proceso de conjugación.

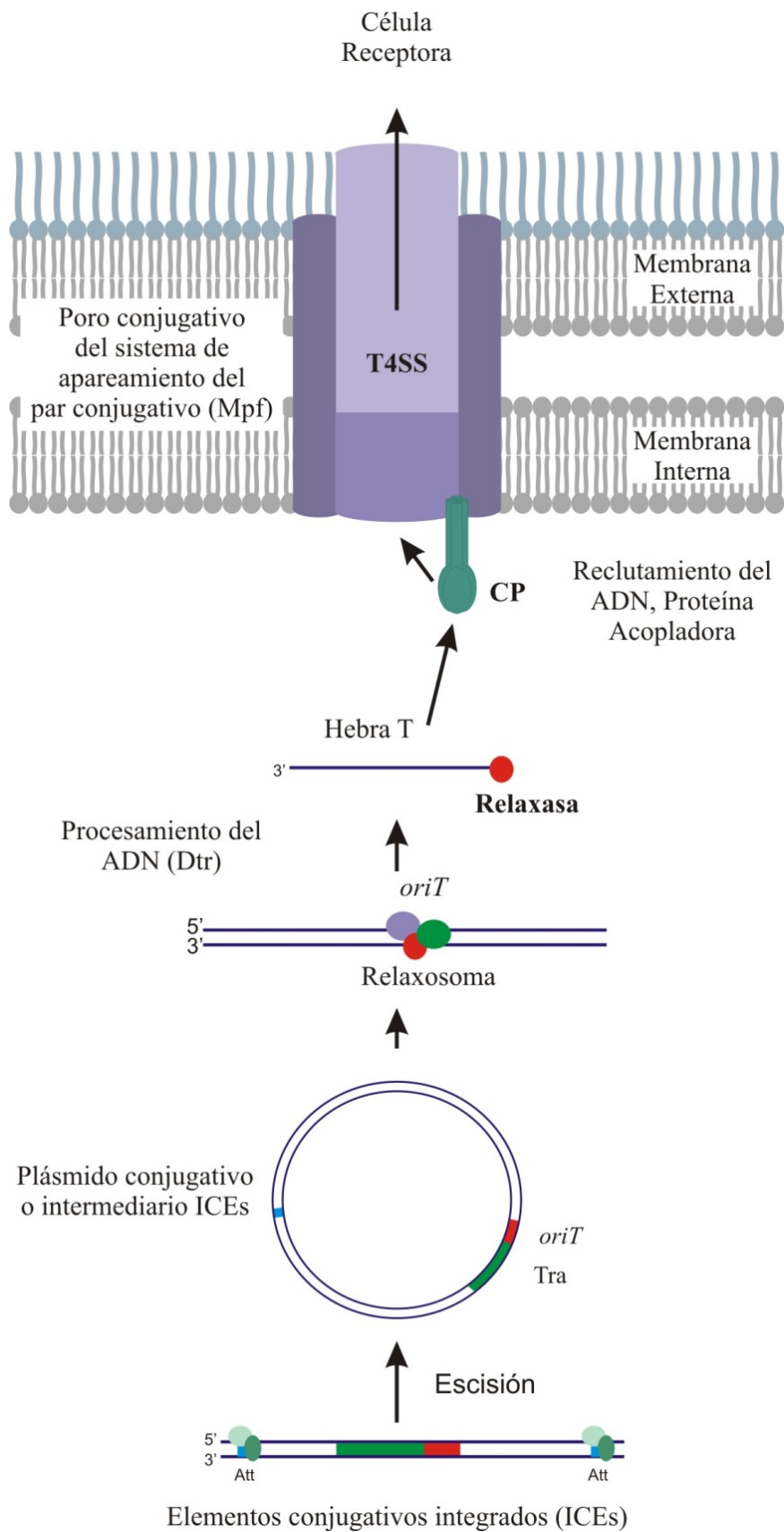
#### I.2.b.iii.2. Modulación de la transferencia conjugativa.

Los elementos genéticos móviles pueden beneficiar a sus células hospedadoras debido a los genes para los que codifican (resistencia a los antibióticos, factores de virulencia, etc.), ya que éstos suelen aumentar la sobrevivencia de las células en determinados ambientes. Sin embargo, también imponen un costo energético muy alto para sus hospedadores, por lo que para minimizar el riesgo de afectar la viabilidad de estos microorganismos, existen mecanismos que regulan la propagación de los mismos. Estos mecanismos incluyen la regulación de los elementos del Dtr y Mpf, de la replicación y partición plasmídica, de la exclusión de entrada, y los recientemente descritos mecanismos de inmunidad.

##### Regulación de los elementos del Dtr y Mpf.

Existen diversos mecanismos que regulan los pasos iniciales de la conjugación. Estos mecanismos controlan, por ejemplo, la activación o represión de genes involucrados en la transferencia conjugativa.

La transferencia conjugativa de los plásmidos pTi de *Agrobacterium tumefaciens* es controlada por dos sistemas jerárquicos. La expresión de los tres operones de transferencia *traAFB*, *traCDG* y *traI-trb* requieren de pequeñas moléculas señal, las opinas conjugativas, las cuales son producidas en los tumores inducidos por *A. tumefaciens* en la planta (Ellis, *et al.*, 1982). Estas opinas regulan la transferencia en un modo indirecto ya que regulan la producción de TraR, el cual es el regulador directo de los operones involucrados en la transferencia conjugativa. TraR es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales mediados por *quórum sensing* (QS) LuxR, los cuales responden a una homoserina lactona (HSL) (Piper, *et al.*, 1993; Zhang, *et al.*, 1993). Las bacterias pueden



**Figura I.5. Esquema de la maquinaria conjugativa.** El *oriT* es reconocido por la relaxasa y junto a otras proteínas forman el relaxosoma. Éste último es reconocido por la proteína acopladora (CP) que los une al T4SS asociado para transferir el ADN a la célula receptora. Los ICEs deben ser previamente escindidos y formar un intermediario circular para sufrir el procedimiento previamente descrito.

producir estas HSL por intermedio de TraI, una acil-HSL sintasa, también codificada en los plásmidos pTi (Hwang, *et al.*, 1994). Mecanismos similares en los cuales la transferencia se halla regulada por QS han sido descritos en p42a de *Rhizobium etli* CNF42 (Tun-Garrido, *et al.*, 2003), pRL1JI de *Rhizobium leguminosarum* 248 y en pNGR234a de *Rhizobium* sp. NGR234 (Ding & Hynes, 2009).

Otro mecanismo que está involucrado en la regulación de genes de la transferencia conjugativa es el constituido por los genes *rctA/rctB*. Este sistema fue encontrado en p42d de *R. etli* CNF42, pSymA de *Ensifer meliloti* y pAt58 de *A. tumefaciens*. En este caso, no existe una activación directa de los genes de transferencia, sino que *rctA* es un represor de la transcripción del operón *virB* (genes involucrados en el Mpf). La transcripción de *rctA* se encuentra positivamente auto-regulada, pero se ve reducida cuando se sobreexpresa RctB, el cual actúa como activador de la conjugación. Recientemente fue demostrado que existe un motivo específico para la unión y transcripción del operón *virB*; dicho motivo se ve bloqueado por la unión de RctA, reprimiendo así la conjugación. RctB bloquea el acceso de RctA a dicho motivo, permitiendo la transcripción de los genes necesarios para la conjugación (Perez-Mendoza, *et al.*, 2005; Sepulveda, *et al.*, 2008).

En los plásmidos de *E. coli* F y tipo F, los genes necesarios para la síntesis del pili conjugativo y la transferencia del ADN se encuentran fuertemente regulados. Por ejemplo, la proteína TraJ de los plásmidos de *E. coli* tipo F, actúa como un activador del operón de genes *tra* (Willets, 1977; Frost, *et al.*, 1994). TraJ también regula la expresión de *traM* a través de TraY.

En etapas posteriores TraM, TraY y la relaxasa TraI junto con otros factores forman el relaxosoma, que debe ser reconocido por la CP para transferir el DNA. Así, TraJ está involucrado en distintas etapas reguladoras de la conjugación (Frost, *et al.*, 1994; Nelson, *et al.*, 1995; Penfold, *et al.*, 1996).

#### Regulación en la replicación y segregación plasmídica.

Otra posibilidad es controlar la propagación de plásmidos a nivel de la replicación. La incompatibilidad es el fenómeno por el cual dos plásmidos no pueden mantenerse de forma estable en una misma célula ya que comparten tanto sus mecanismos de replicación como las formas de regular la misma. De esta manera, al entrar un plásmido con similares características al que ya se encuentra alojado en una célula, sólo uno de ellos se mantendrá de manera estable (Novick, 1987; Izquierdo, *et al.*, 2005).

Los plásmidos de las  $\alpha$ -proteobacterias presentan, principalmente, dos tipos de operones de replicación: *repABC* y *repC*. En general, la familia de replicones llamada *repABC* posee

tres genes siempre en el mismo orden, *repA*, *repB* y *repC*; también se ha descrito un ARN antisentido (ctRNA) entre *repB* y *repC* (Cevallos, *et al.*, 2008). Este ctRNA juega un papel en la regulación de la replicación (Venkova-Canova, *et al.*, 2004; Chai & Winans, 2005; MacLellan, *et al.*, 2005). *repC* codifica para la proteína que inicia la replicación mientras que *repA* y *repB* se encuentra involucradas en la segregación plasmídica (Ramírez-Romero, *et al.*, 2001; Pappas & Winans, 2003). La familia de replicones *repC* se encuentra relacionada evolutivamente con la familia *repABC* ya que comparten *repC*, pero no poseen ni *repA* ni *repB* (Mercado-Blanco & Olivares, 1994). La eliminación de plásmidos de cepas de rizobios mediante incompatibilidad plasmídica es utilizada desde hace más de 25 años (Hynes, *et al.*, 1985).

#### Mecanismos involucrados en la exclusión.

La exclusión de entrada es una propiedad de los plásmidos por la cual la bacteria hospedadora del mismo resulta incapaz de recibir plásmidos similares por conjugación. En los plásmidos F, la exclusión sucede por dos mecanismos basados en dos genes diferentes, *traT* y *traS* (Garcillan-Barcia & de la Cruz, 2008). El producto del gen *traT* actúa a nivel de la membrana externa y su acción resulta en disminuir la capacidad de las células donadoras para formar un par de apareamiento estable (Achtman, *et al.*, 1977), fenómeno que se denomina exclusión de superficie. En el segundo tipo de exclusión, denominada exclusión de entrada, el producto del gen *traS* interfiere en la transferencia del ADN una vez que se ha alcanzado un contacto célula-célula estable (Garcillan-Barcia & de la Cruz, 2008).

El plásmido F se ha utilizado como sistema modelo desde hace ya muchos años. Sin embargo, muchos plásmidos conjugativos codifican para funciones de exclusión. Cho *et al.* (2009) han descrito recientemente, plásmidos de *A. tumefaciens* que codifican para funciones de exclusión de entrada. En este caso, existen dos proteínas, denominadas TrbJ y TrbK, que median la exclusión de entrada y actúan sinérgicamente. Debido a que los genes se encuentran en los operones de transferencia previamente mencionados (ver sección I.2.b.3.ii), su expresión se induce en presencia de HSL. Esto último evidencia un mecanismo en el cual las células de *A. tumefaciens* que poseen estos plásmidos, ante la presencia de HSL y por ende una población bacteriana alta, inducen la exclusión a la entrada de otros plásmidos similares; mientras que la transferencia de su plásmido se verá inducida para donarlo a una bacteria receptora que no posea dichos elementos. De esta forma, la comunidad bacteriana se garantiza que dicho plásmido se mantenga en la misma.

Mecanismos de inmunidad.

Además de los mecanismos previamente descriptos, en los últimos años se han encontrado sistemas que controlan la infección por elementos móviles. Uno de ellos involucra el reconocimiento de ADN foráneo mediante una proteína denominada HN-S. Esta proteína se une al ADN con alto contenido AT en relación a la bacteria receptora, silenciando la expresión de genes en el elemento móvil incorporado. El otro mecanismo involucra a un grupo de repeticiones palindrómicas cortas intercaladas con regularidad en el genoma (CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y proteínas asociadas a los CRISPRs. Estos elementos confieren inmunidad directamente contra secuencias entrantes en plásmidos o fagos. El mecanismo exacto de acción todavía no ha sido completamente dilucidado (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

### **I.2.c. Rol de la transferencia horizontal de genes en la adaptación bacteriana.**

La HGT es uno de los mecanismos evolutivos que desafían la comprensión de la dinámica de los genomas bacterianos, lo cual ha sido recientemente evidenciado con el secuenciamiento de genomas en forma masiva (Lawrence & Ochman, 1998; Ochman, 2001; Gogarten, *et al.*, 2002). Dentro de este contexto, se debe prestar especial atención a la transferencia de material genético por conjugación (Kinkle & Schmidt, 1991; Kinkle, *et al.*, 1993) debido a que es considerado uno de los mecanismos más eficiente de intercambio de ADN entre procariotas (Fry & Day, 1990; Amábile-Cuevas & Chicurel, 1993). La adquisición de nuevo ADN por HGT puede promover fenómenos de especiación entre linajes bacterianos (Sullivan, *et al.*, 1995; Sullivan, *et al.*, 1996; Vetsigian & Goldenfeld, 2005). Así, es necesario desarrollar estudios centrados en analizar la magnitud de la HGT dentro de una población para entender mejor los procesos que guían la diversificación y evolución bacteriana.

Los plásmidos son considerados elementos claves en los procesos de adaptación y especiación de poblaciones bacterianas debido a que poseen características únicas que contribuyen a la plasticidad genómica. Estos elementos genéticos pueden ser perdidos, recuperados, y también pueden cambiar su contenido, lo cual es consistente con el rol de los plásmidos como mediadores transitorios de los cambios en las estructuras genéticas de las especies/poblaciones (Smets & Barkay, 2005). Los plásmidos están presentes en todas las ramas del árbol evolutivo bacteriano y se han encontrado en todas las comunidades estudiadas hasta la fecha, incluyendo suelos, ambientes marinos y aislados clínicos. Los

análisis comparativos de los datos disponibles han revelado la complejidad de la genética de los plásmidos, la capacidad de estos elementos de replicarse de forma autónoma en células bacterianas permisivas y la presencia de un conjunto único de genes que son claramente distintos de los presentes típicamente en cromosomas bacterianos. El grado de diversidad genética dentro del conjunto de elementos genéticos móviles, ha permitido especular con que los plásmidos representan un recurso genético distinto, donde la relación entre los plásmidos y sus anfitriones es crucial para la ecología del anfitrión (Molbak, *et al.*, 2003).

Los plásmidos permiten a las poblaciones bacterianas evaluar el conjunto de elementos genéticos móviles buscando así rasgos adaptativos que puedan ser ventajosos para la supervivencia bajo presiones selectivas locales, como resistencia a antibióticos, metales pesados y contaminantes orgánicos del ambiente o la capacidad de utilizar fuentes de carbono alternativas. Es bien sabido, aunque faltan realizar estudios funcionales detallados, que los plásmidos llevan varios rasgos que facilitan, o son esenciales, para la adaptación a las variaciones del entorno. Estos estudios pueden identificar funciones nuevas y potencialmente claves que no se podrían descubrir únicamente por el estudio de aislamientos bacterianos. La movilidad de plásmidos y de sus genes proporciona la fuerte hipótesis de que los genes sumamente especializados están presentes en elementos genéticos móviles. Este mecanismo implica que los vectores de estos genes (los plásmidos) aseguren una ventaja adaptativa, y que los plásmidos, por ellos mismos, sean seleccionados y conservados. La ecología de los plásmidos sigue sin entenderse completamente y sabemos muy poco de su distribución y diversidad (Sorensen, *et al.*, 2005).

En los ambientes terrestres, factores como el suelo, temperatura, pH y el movimiento de agua han sido identificados como agentes que influyen en la frecuencia de transferencia horizontal de genes (Sorensen, *et al.*, 2005). Ha sido encontrado que en ambientes naturales existen lugares donde la HGT sucede con mayor frecuencia. 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 (Van Elsas, *et al.*, 1989; Lilley, *et al.*, 1994; Troxler, *et al.*, 1997). Dichos estudios demuestran que la rizósfera favorece la transferencia de genes por conjugación cuando se la compara con el suelo no rizosférico. 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 indígenas conjugativos (van Elsas, *et al.*, 1998). Como veremos en las próximas secciones, los rizobios son microorganismos de relevancia por su capacidad para asociarse con plantas y mejorar el crecimiento vegetal. La mayoría de ellos



llevan plásmidos y son capaces de transferirlos, delineando la evolución de estos microorganismos.

### **I.3. Simbiosis y transferencia horizontal de genes.**

#### **I.3.a. Generalidades de la simbiosis entre rizobios y leguminosas.**

Los rizobios son bacterias Gram negativas que se caracterizan por interactuar con plantas y poseer una gran diversidad en su taxonomía, metabolismo y genética (van Rhijn & Vanderleyden, 1995; Masson-Boivin, *et al.*, 2009). Los rizobios pertenecen a 12 géneros bacterianos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacterias, en los cuales se incluyen simbioses y patógenos. Una visión clásica de la taxonomía de los rizobios considera los géneros *Allorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Willems, 2006). La aparición de rizobios en géneros distantes podría haber sido originada por eventos, repetidos e independientes, de transferencia horizontal de genes involucrados en las funciones simbióticas (Sullivan, *et al.*, 1995; Sullivan, *et al.*, 1996; Martínez-Romero, 2009; Masson-Boivin, *et al.*, 2009). Los rizobios previamente mencionados habitan los suelos en vida libre y asociados en simbiosis a las raíces de las plantas leguminosas como microorganismos fijadores de nitrógeno.

Recientemente se ha propuesto que los rizobios se clasifiquen de acuerdo a las “sym-biovariedades”. En este caso, los rizobios deberían clasificarse según el plásmido simbiótico o la isla simbiótica aunque otros replicones puedan estar involucrados en ciertas características de la simbiosis. Una “sym-biovariedad” particular podría ser mantenida en diversos linajes bacterianos por HGT (Rogel, *et al.*, 2011).

Una de las mayores entradas de nitrógeno disponible en la biósfera ocurre por la reducción biológica de nitrógeno atmosférico a amonio como consecuencia de la simbiosis entre los rizobios y las plantas leguminosas. Estas interacciones simbióticas han sido un importante motivo en la investigación agrícola en los últimos tiempos debido a su capacidad de aumentar las producciones de las cosechas sobre suelos pobres en nitrógeno. La simbiosis resultante, altamente específica en cuanto a los individuos implicados, se desarrolla a lo largo de una serie de pasos ordenados que implican la participación de la planta y los rizobios, como de compuestos y moléculas señal específicas (Jones, *et al.*, 2007).

### **I.3.b. Etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa.**

El desarrollo de esta compleja asociación se lleva a cabo bajo la expresión coordinada de varios genes relacionados con la simbiosis, tanto en la planta como en la bacteria. Si bien la pared de las células vegetales forman una fuerte barrera de protección, existe un intercambio de señales que permite a la bacteria utilizar los pelos radiculares como vía de entrada. (Perret, *et al.*, 2000; D'Haese & Holsters, 2002; Jones, *et al.*, 2007; Oldroyd & Downie, 2008)

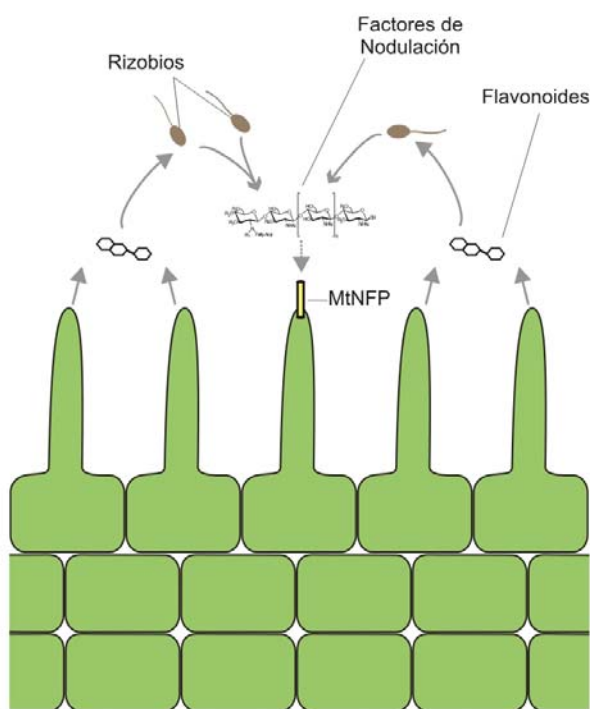
#### *I.3.b.i. Intercambio de señales al comienzo de la interacción planta-bacteria.*

Las plantas secretan una alta cantidad de materia orgánica a los suelos, la cual es importante para sostener el crecimiento de los microorganismos rizosféricos (Helal & Sauerbeck, 1989). De todos éstos, los compuestos aromáticos denominados flavonoides son importantes para la simbiosis. Los flavonoides, específicamente, disparan en los rizobios la expresión de los genes requeridos para la nodulación (*nod*, *nol*, *noe*). La capacidad de inducción varía dependiendo de los flavonoides, e incluso, algunos de ellos pueden actuar como represores (Perret, *et al.*, 2000).

Si bien la regulación de los genes *nod* en los rizobios puede cambiar dependiendo de la cepa estudiada, suele encontrarse mediada por la proteína NodD. Esta proteína pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR, que se unen a motivos conservados de ADN, denominados cajas *nod*, encontrados en la zona promotora de numerosos *clusters* involucrados en la nodulación (Rostas, *et al.*, 1986; Schlaman, *et al.*, 1992; Perret, *et al.*, 2000). La proteína NodD, actúa como sensor de las señales producidas y como activador transcripcional. Dependiendo de la especie bacteriana, puede cambiar el número de copias de *nodD*, como así la respuesta de cada una de ellas a diferentes compuestos.

*R. leguminosarum* bv. *trifolii* posee solamente una copia de *nodD*, sin embargo en *Bradyrhizobium japonicum*, *R. sp.* NGR234 y *Rhizobium tropici*, el número de copias varía entre 2 y 5 (Perret, *et al.*, 1991; Gottfert, *et al.*, 1992; van Rhijn, *et al.*, 1993; Fellay, *et al.*, 1995). En *E. meliloti* existen tres copias, *nodD1*, *nodD2* y *nodD3*. *nodD1* se activa por extractos radiculares o el flavonoide luteolina; *nodD2* por extractos radiculares y *nodD3* modula la expresión de los genes *nod* en ausencia de señales de la planta (Mulligan & Long, 1989). El gen *nodD3* en *E. meliloti* junto al regulador *syrM* conforman un circuito regulatorio que puede auto-amplificarse y está involucrado en el desarrollo del nódulo (Swanson, *et al.*, 1993). En *R. etli*, donde se hallan tres homólogos de *nodD*, la producción de NFs es activada por naringenina o exudados de raíz (Poupot, *et al.*, 1995).

Luego de la activación de los genes *nod*, la bacteria comienza la producción de compuestos denominados factores de nodulación (NFs) (Figura I.6). Los NFs son lipoquitooligosacáridos (LCOs), formados por una cadena principal de 3, 4 o 5 residuos de N-acetil-glucosamina modificada por diferentes sustituyentes químicos (Perret, *et al.*, 2000). Las distintas sustituciones que se encuentran unidas al núcleo oligosacárido de los NFs dependen de cada especie o cepa de rizobios y ha sido demostrado que contribuye a la especificidad entre huésped y hospedador. Todos los NFs que han sido identificados consisten en un núcleo de dos a seis residuos de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) - N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Entre los sustituyentes que se encuentran en el extremo no reductor de la glucosamina podemos mencionar a los grupos metilo, carbamoilo, acetilo y varios ácidos grasos. El extremo reductor del núcleo de glucosaminas puede encontrarse modificado por un grupo sulfato o con D-arabinosa, L-fucosa o 2-O-metilfucosa, entre otros. Por ejemplo, el sulfato unido al extremo reductor del quitooligosacárido de los NFs de *E. meliloti* es necesario para la actividad de los mismos en la alfalfa, mientras que su ausencia no permite dicha actividad. Esta modificación ha sido reportada previamente como esencial para la infección de alfalfa; la ausencia de dicho sustituyente no permitiría la nodulación de las mismas (Faucher, *et al.*, 1988; Schultze, *et al.*, 1995; Cloutier, *et al.*, 1996; Wais, *et al.*, 2002). Otro ejemplo de especificidad es la presencia del grupo metilo en el extremo no reductor de los NFs producidos por los rizobios noduladores de poroto, como *R. etli* o *R. tropici* (Poupot, *et al.*, 1993; Poupot, *et al.*, 1995).



**Figura I.6. Esquema de la señalización temprana entre rizobios y leguminosas.** La planta secreta flavonoides al medio que la rodea. El flavonoide adecuado puede inducir en los rizobios la expresión de los genes involucrados en la producción de NFs. Los NFs alcanzan a la planta preparándola para recibir a los rizobios.

Una de las primeras respuestas de la planta a la interacción con el NFs adecuado es un incremento en los niveles de calcio intracelular en los pelos radiculares, seguido de fuertes oscilaciones en el nivel de calcio (*spiking*) y alteraciones en su citoesqueleto (Cardenas, *et al.*, 2003; Sieberer, *et al.*, 2005). Estas respuestas son seguidas por el enrulamiento (*curling*) del pelo radicular, que atrapa a los rizobios dentro de lo que se denomina el pelo radicular enrulado colonizado (CCRH, *Colonized Curled Root Hair*) (Gage, 2004). Simultáneamente, los NFs estimulan a las células de la raíz a que reinicien la mitosis. Estas células formarán el primordio nodular que dará lugar a las células que recibirán a las bacterias invasoras.

Múltiples receptores con dominios extracelulares han sido descritos para que la respuesta de la planta a los NFs sea completa y la ausencia de la proteína MtNFP (*Medicago truncatula Nod Factor Perception*) funcional en *M. truncatula* no permite que la planta responda (Figura I.6). Recientemente, otros componentes involucrados en la transducción de señales luego de la interacción con los NFs han sido identificados, como DMI1, DMI2, DMI3, NSP1 y NSP2 (DMI, *Does not Make Infection*; NSP, *Nodulation Signaling Pathway*) (Jones, *et al.*, 2007). Si bien los NFs son necesarios para la invasión y la formación de nódulos, no es la única molécula producida por la bacteria necesaria para la infección. Los NFs secretados son capaces de activar múltiples respuestas en la planta huésped que la preparan para recibir a las bacterias invasoras. Estas respuestas pueden ser activadas por concentraciones adecuadas del NF con las substituciones requeridas, pero también se pueden desencadenar por concentraciones elevadas de NFs carentes de las decoraciones adecuadas. En condiciones naturales, los rizobios se adhieren a la raíz de la planta, acumulándose en zonas apropiadas. Esto aumenta el número de rizobios en las raíces, aumentando la concentración de NFs (Oldroyd & Downie, 2008).

### I.3.b.ii. *Adhesión de los rizobios a las raíces.*

La adhesión de los rizobios a la raíz es el evento más temprano de contacto físico entre la planta y los rizobios. La habilidad de los rizobios para adherirse a las raíces tiene dos ventajas: aumenta la concentración de rizobios en la rizósfera y aumenta la posibilidad de infección. Las lectinas de las plantas aumentan la adhesión de los rizobios al adherir polisacáridos superficiales específicos (Oldroyd & Downie, 2008). Las lectinas vegetales son proteínas que tienen al menos un dominio no catalítico de unión a un mono u oligosacárido y se encuentran en altas cantidades en las semillas y en otros sitios de la planta como hojas, tallos y raíces. Éstas pueden servir como receptores de polisacáridos de superficie del rizobio. Además, las lectinas están implicadas en parte en la especificidad simbiótica; por ejemplo, la expresión de la lectina de soja en *Lotus corniculatus*

transgénico, permitió que la planta sea nodulada por *B. japonicum* (van Rhijn, *et al.*, 1998). En términos generales, se ha descrito al proceso de adhesión de los rizobios a las leguminosas en dos etapas: una primera etapa donde ocurre una adhesión débil y reversible, donde las lectinas de leguminosas pueden reconocer un carbohidrato de superficie del rizobio y una segunda etapa donde intervienen fibras de celulosa bacteriana, ya sea producida antes o después de la adhesión de las bacterias. Estas fibrillas causarían una unión irreversible y la formación de agregados bacterianos en la superficie del hospedador (Dazzo, *et al.*, 1984; Ausmees, *et al.*, 1999; Laus, *et al.*, 2005a)

### I.3.b.iii. *Formación del hilo de infección.*

Para que los rizobios puedan fijar nitrógeno deben ser primero internalizados por la planta. Existen principalmente dos vías por las que los rizobios pueden entrar a la raíz de la planta: por pelos radiculares formando hilos de infección o por heridas (*crack entry*) en la epidermis de la planta (Oldroyd & Downie, 2008). La infección por hilos requiere cambios significativos en el citoesqueleto de las células de la planta para formar un túnel que contiene a los rizobios, mientras que en el mecanismo de *crack entry* se forman líneas organizadas de rizobios entre las células vegetales (Brewin, 2004). La infección por *crack entry* suele ser menos específica que la realizada a través de hilos de infección; en esta última los NFs desempeñan un papel muy importante.

La infección por pelos radiculares es la más común y en ella se forman hilos de infección, los cuales son estructuras tubulares compuestas por componentes de la pared celular de la planta. El hilo de infección se forma por una invaginación de la pared celular del pelo radical, que da origen a un canal a través del cual migran los rizobios hacia la mencionada zona subcortical. En el hilo de infección en crecimiento las bacterias se dividen formando una columna (Gage, 2002; Gage, 2004). El proceso de formación del hilo de infección es un proceso dinámico, donde la pared de las células vegetales se degrada y resintetiza, formando así el hilo de infección lleno de bacterias (Gage, 2004; Ferguson, *et al.*, 2010). Los NFs estimulan la mitosis de las células del córtex de la raíz, y esto resulta en la formación del primordio nodular, el cual será el lugar en donde se recibirán los rizobios (Foucher & Kondorosi, 2000). Las bacterias que fueron atrapadas en el CCRH y pueden producir tanto NFs como exopolisacáridos pueden inducir esta invaginación. Ha sido estudiado que numerosos mutantes en componentes superficiales de *E. meliloti* no pueden formar hilos de infección, ejemplo de esto es el gen *exoY*, una galactosil transferasa requerida para la síntesis del exopolisacárido I (EPS1) (Cheng & Walker, 1998). En

diferentes pares simbióticos, los exopolisacáridos pueden jugar un papel no tan crítico para la infección, como por ejemplo entre *R. leguminosarum* y *Vicia sativa* (Laus, *et al.*, 2005b).

#### I.3.b.iv. *Desarrollo del hilo de infección.*

Una vez que el hilo de infección ha penetrado hasta la base del pelo radicular, bacteria y planta deben ser capaces de mantener el progreso del hilo de infección a través de las distintas capas de células de la raíz hasta llegar a las células del córtex. Las citoquinas, hormonas de la planta involucradas en la división celular, y los NFs se encuentran involucrados en el direccionamiento del hilo de infección hacia las células del córtex. Mediante el uso de ARN de interferencia contra receptores de citoquinas (MtCRE1) se observó un detenimiento en la reiniciación de la división celular en las células del córtex y la aparición de hilos de infección abortivos (Gonzalez-Rizzo, *et al.*, 2006). Recientemente se encontró que el factor de transcripción transmembrana MtNIN, dependiente de MtCRE1, induce la división de las células corticales, como así también el desarrollo del hilo de infección, sugiriendo de esta manera que MtNIN podría estar implicado en la integración de estos procesos (Marsh, *et al.*, 2007). Este hecho es consistente con el modelo donde las células corticales de la raíz proveen señales para la iniciación y el desarrollo del hilo de infección (Jones, *et al.*, 2007).

Como mencionamos previamente, el primordio nodular se induce por la acción de los NFs que en un principio se ponen en contacto con la epidermis de la raíz (Oldroyd & Downie, 2008). Este evento ocurre en paralelo a la formación del hilo de infección. Una vez inducido, en el primordio continúan las divisiones mitóticas de las células corticales, que sufren un proceso de desdiferenciación, conduciendo a la formación de un meristema cuya función será generar el tejido en crecimiento del nódulo. De acuerdo a la leguminosa en cuestión, se pueden formar dos tipos de nódulos con distinta morfología: nódulos determinados y nódulos indeterminados. Las diferencias entre ambos tipos de nódulos se encuentran en el sitio donde se producen las primeras divisiones celulares, el mantenimiento de la región meristemática y la forma del nódulo maduro. Para los nódulos indeterminados, las primeras divisiones celulares ocurren en el sector más alejado a la epidermis, en el córtex interior. Estas divisiones conllevan a la formación del primordio nodular. Los nódulos indeterminados adquieren una forma de cilindro, ejemplo de éstos son los nódulos formados por *Medicago sativa* (alfalfa), *Trifolium repens* (trébol), *Pisum sativum* (arveja) y *M. truncatula*. En el meristema apical continuamente se producen nuevas células que se infectan con bacterias. Cuando ya son maduros, los nódulos indeterminados poseen una población heterogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno debido a la división celular

continua, generando un gradiente de estados de desarrollo a medida que el nódulo se alarga. Estos nódulos también presentan menor sistema vascular que los nódulos determinados. Los nódulos determinados usualmente son esféricos y no muestran un desarrollo en gradiente. Los primeros eventos de división en estos nódulos típicamente ocurren en el córtex externo, en el tejido adyacente a la epidermis. Los nódulos determinados ya maduros contienen una población homogénea de bacteroides, ya que la diferenciación de las células infectadas ocurre de manera sincronizada. Ejemplos de estos nódulos son los producidos por *Glycine max* (soja) y *Phaseolus vulgaris* (poroto) (Figura I.7) (Ferguson, *et al.*, 2010).

#### I.3.b.v. *Endocitosis del rizobio.*

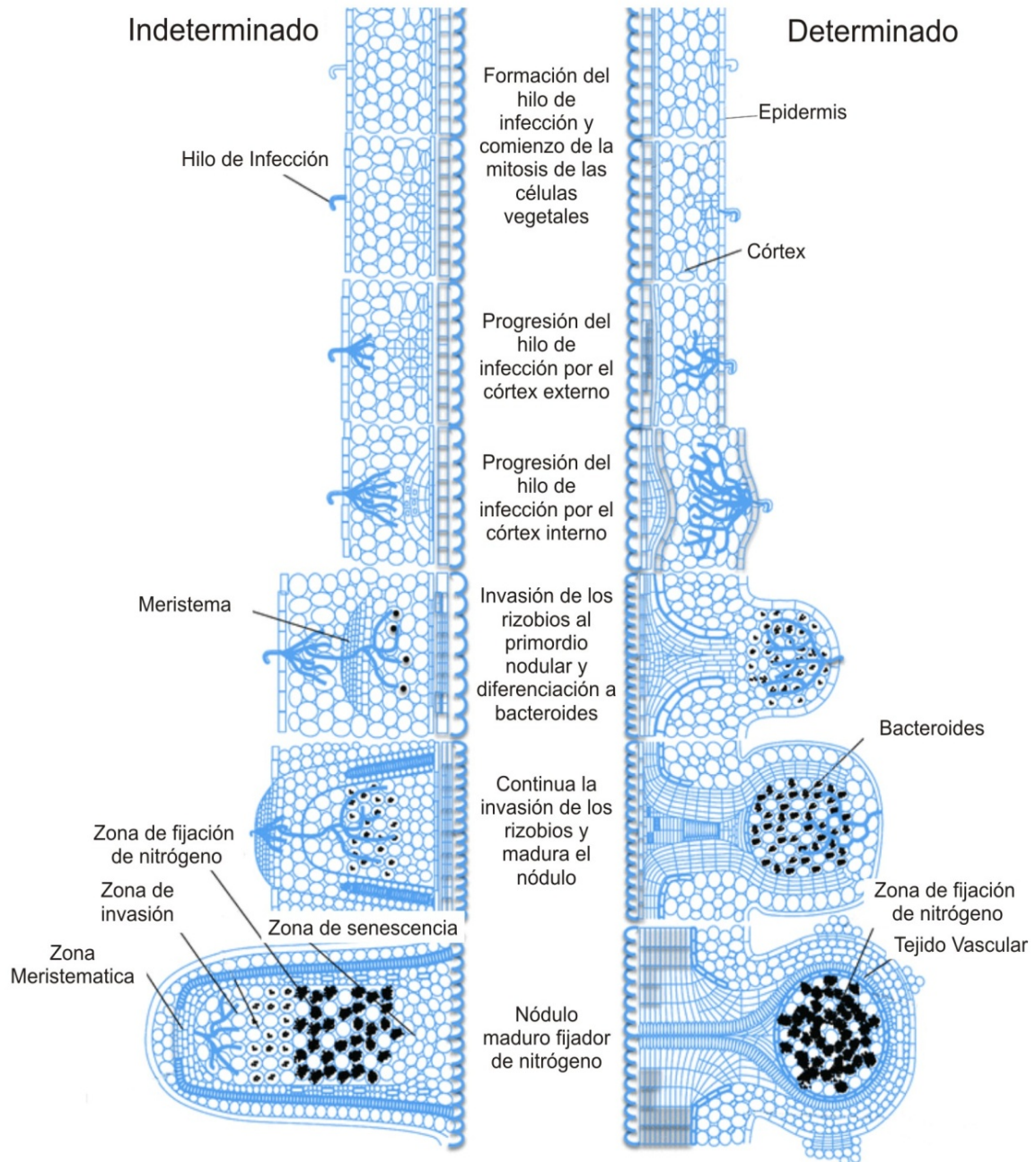
Cuando las bacterias alcanzan el córtex interior, deben ser internalizadas por una célula cortical y establecerse dentro de ellas. Cada bacteria es internalizada por una célula vegetal, en un compartimento rodeado de membrana originado a partir del hilo de infección (Brewin, 2004). Cada una de estas unidades se denomina simbiosoma. Defectos en la bacteria como en la planta pueden resultar en una falla en la formación del simbiosoma (Jones, *et al.*, 2007). Por ejemplo, mutantes en el gen *hemA* de *E. meliloti*, cuyo primer defecto es la falla en la biosíntesis de porfirinas, no son liberados desde los hilos de infección y no son encapsulados en los simbiosomas. Como los rizobios son encerrados en los simbiosomas por endocitosis, se ha sugerido que este compartimento puede ser un derivado de una vacuola lítica (Jones, *et al.*, 2007).

#### I.3.b.vi. *Diferenciación del bacteroide.*

Una vez que las bacterias han sido engullidas, deben sobrevivir dentro del simbiosoma y diferenciarse a la forma fijadora de nitrógeno, el denominado bacteroide. Nuevamente, señales provenientes de la bacteria y de la planta se encuentran involucradas en dicho proceso.

Uno de los mecanismos de defensa que poseen los rizobios son los lipopolisacáridos (LPS) que poseen en su membrana externa. Ha sido descrito que un mutante en el gen *bacA* de *E. meliloti* es defectuoso en la formación de su LPS y los bacteroides formados por este mutantes se lisan rápidamente después de la endocitosis y no demuestran los cambios morfológicos característicos de los bacteroides (Campbell, *et al.*, 2002). De la misma manera, mutantes en el gen *lpsB* de *E. meliloti* pueden infectar alfalfa pero no pueden diferenciarse a bacteroides fijadores de nitrógeno (Lagares, *et al.*, 1992; Campbell, *et al.*, 2002). No sólo mutantes en genes relacionados a los LPS se ven afectados en la diferenciación en bacteroides; otros genes relacionados con funciones fisiológicas como

*sitA*, *pha*, *rpoH1*, que codifican para transportadores de manganeso, bombas transportadoras de potasio y factores sigma de la ARN polimerasa, respectivamente, afectan la diferenciación.



**Figura I.7. Esquema del desarrollo de nódulos indeterminados y determinados.** El desarrollo del nódulo se esquematiza con la formación del hilo de infección y la división de las células vegetales. Luego, progresa el hilo de infección hasta llegar al primordio nodular, donde las bacterias son liberadas en un simbiosoma que se diferenciará al estadio de bacteroide donde podrá realizar la FBN. Modificado de Ferguson, *et al.*, 2010.



Las plantas que forman nódulos indeterminados imponen a las bacterias que las invaden un programa en el que las bacterias deben duplicar su genoma e incrementar su tamaño celular para sostener la fijación de nitrógeno; en las plantas que se forman nódulos determinados esto no sucede (Mergaert, *et al.*, 2006). Así, no sólo de las bacterias depende la diferenciación a bacteroides. Recientemente, se han identificado péptidos secretados por plantas que inducen a la correcta diferenciación de *E. meliloti*. En mutantes en el gen *dnfl* de *M. truncatula*, el desarrollo de simbiosomas y bacteroides se ve bloqueado (Wang, *et al.*, 2010). Los péptidos identificados, que son ricos en cisteínas y específicos en el desarrollo del nódulo (NCR, *Nodule-specific Cysteine-Rich*), tienen como objetivo alcanzar a las bacterias y entrar a su citosol. Los NCRs son similares a péptidos antimicrobianos y podría tratarse de un mecanismo de defensa de la planta ante un microorganismo no deseado (Van de Velde, *et al.*, 2010). Los NCRs son específicos de las plantas que forman nódulos indeterminados y para probar su rol relacionado a la diferenciación terminal del bacteroide, se expresaron NCRs en plantas que forman nódulos determinados en las cuales no existe dicha diferenciación y no se encuentran NCRs. La expresión de los NCRs en *L. japonicum* desencadenó una diferenciación en los nódulos de la misma (Van de Velde, *et al.*, 2010). El mecanismo, si es que existe, por el cual las bacterias detectan y responden a los NCRs aún no ha sido descrito.

#### I.3.b.vii. *Desarrollo del nódulo e intercambio de nutrientes.*

Las bacterias que han sido encerradas dentro de un simbiosoma se encuentran en un medio con baja presión de oxígeno y completan su diferenciación. Dichas bacterias pueden expresar los genes de la nitrogenasa y comenzar con la FBN (Fischer, 1994). Los cambios transcripcionales que se producen en los bacteroides reducen la mayoría de los procesos metabólicos excepto los involucrados en la fijación de nitrógeno y en la respiración (Barnett, *et al.*, 2006). El nitrógeno atmosférico es convertido en amonio por los bacteroides y es subsecuentemente asimilado por la planta luego de convertirlo a glutamina y más tarde a glutamato por la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, respectivamente (Udvardi & Day, 1997). Durante la fijación de nitrógeno, es necesaria una fuente constante de carbono. En el caso de *E. meliloti* los gránulos de polihidroxibutirato (PHB) formados durante la invasión, son degradados en estas etapas (Willis & Walker, 1998). El carbono fijado por la planta es suministrado a las bacterias en forma de ácidos dicarboxílicos a través de un sistema bacteriano de transportadores específicos (*Dct uptake system*).

Existen otras proteínas aportadas por la planta para sostener la fijación de nitrógeno, como por ejemplo la leghemoglobina. Esta última proteína se encarga de disminuir la

presión de oxígeno en los nódulos y administrar el ambiente microaeróbico necesario para la fijación. La presencia de leghemoglobina se evidencia por el color rosado que adquieren los nódulos funcionales (Ott, *et al.*, 2005).

### **I.3.c. Implicancias de la transferencia horizontal de genes en la especiación de microorganismos simbióticos.**

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en la simbiosis rizobio-leguminosa permite su utilización para introducir nitrógeno en suelos agrícolas, evitando así el empleo masivo de fertilizantes químicos (Peoples & Herridge, 1990; Peoples & Craswell, 1992). Una consideración importante al utilizar los rizobios como biofertilizantes es que puede existir HGT desde las bacterias introducidas a la población nativa. Se han encontrado evidencias que sostienen posibles eventos de HGT en suelos de Nueva Zelanda desde cepas de *Mesorhizobium loti* utilizadas como inoculantes biológicos a bacterias nativas no simbióticas (Sullivan, *et al.*, 1995; Sullivan, *et al.*, 1996). En estas bacterias los genes simbióticos se encuentran localizados en una isla genómica de aproximadamente 500 Kpb. Estos autores encontraron que las bacterias aisladas de nódulos de *Lotus corniculatus* en el campo eran diferentes de las introducidas previamente (en esos campos no había una población nativa que pudiera nodular dichas leguminosas). Estas nuevas cepas contenían la isla simbiótica de la cepa inoculada, indicando que la isla simbiótica del cromosoma había sido transferida e integrada al cromosoma de otra bacteria (originalmente no simbiótica) confiriéndole la habilidad de nodular *L. corniculatus*. Esta hipótesis fue verificada en el laboratorio al transferir la isla simbiótica de una cepa a otra no simbiótica. La integración fue descrita como sitio específica y el gen para el ARNt de la fenilalanina fue reconstituido en este proceso. Luego fue encontrado que dentro de dicha isla simbiótica se encontraba codificada una integrasa, posiblemente responsable de la integración sitio específica (Sullivan & Ronson, 1998).

Recientemente, Barcellos *et al.* (2007), han confirmado la HGT de genes simbióticos entre cepas de *B. japonicum* utilizadas como inoculantes y cepas indígenas en Cerrados, Brasil. En este estudio, cepas aisladas de nódulos de soja fueron estudiadas, encontrando cepas de *Bradyrhizobium elkanii* y *Ensifer fredii* que habían adquirido genes de la cepa inoculada inicialmente.

Además de poseer un cromosoma, los rizobios usualmente contienen plásmidos que llevan material genético y codifican para una amplia diversidad de funciones incluyendo las regiones necesarias para la nodulación y la FBN (García de los Santos, *et al.*, 1996; Mercado-Blanco & Toro, 1996). En muchos rizobios el ADN plasmídico puede constituir

un porcentaje bastante elevado del ADN total bacteriano, como por ejemplo en *E. meliloti* 1021 que alcanza un 45 % (Tabla I.1) (Galibert, *et al.*, 2001).

La extensa cantidad de información genética codificada en grandes plásmidos de bajo número de copias es una característica distintiva de los rizobios. El número de plásmidos en los rizobios varía tanto entre especies como dentro de cada una de ellas. Como ya mencionamos, en los plásmidos de los rizobios suelen encontrarse los genes necesarios para la nodulación y la FBN, pero cabe aclarar que la mayoría de los plásmidos que portan los rizobios no son esenciales para esas funciones, y son usualmente denominados como no simbióticos o crípticos. Las funciones reconocidas de estos plásmidos es la de conferir propiedades adicionales, no indispensables, que permitan a las poblaciones bacterianas colonizar y competir en comunidades naturales.

Dentro de las especies rizobiaceas, estudios genómicos clásicos indican que un plásmido particular puede contener regiones que se encuentran conservadas en otros plásmidos aislados de diferentes cepas de la misma especie, en plásmidos de otras especies pero de mismo género, o incluso entre plásmidos presentes en otros géneros de diferentes familias. Ejemplos de esto se han encontrado en *R. etli* (Brom, *et al.*, 2002) y en *E. meliloti* (Stiens, *et al.*, 2006).

Estas observaciones sugieren que la transferencia genética y la recombinación son eventos muy activos entre bacterias del mismo o de distinto género y especie. Asimismo, la existencia de secuencias compartidas sugiere que algunas de ellas pueden ser potencialmente importantes para mejorar la adaptabilidad de las bacterias a un nicho determinado, o que simplemente son mediadores de la recombinación que conlleva a la generación de nuevas estructuras plasmídicas. Estos sucesos pueden promover la especiación debido a que la incorporación de los genes simbióticos podrían permitir a un “rizobio” receptor (originalmente no simbiótico) ocupar un nuevo nicho. La diversidad de la información contenida en los elementos genéticos móviles y el impacto de los plásmidos en el fenómeno de especiación (por ejemplo, *R. leguminosarum* bv *trifolii* y bv. *viciae* difieren esencialmente en sus plásmidos simbióticos), destacan la importancia de los plásmidos al guiar la evolución simbiótica y genómica de los rizobios.

Una publicación reciente ha investigado la diversidad de las bacterias que se asocian con el género *Medicago* y obtuvo evidencias que sostienen un rol muy activo de la HGT en la evolución de las estructuras genéticas de los sinorizobios (*Ensifer*) (Bailly, *et al.*, 2007).

**Tabla I.1. Comparación genómica de diferentes especies de rizobios <sup>a</sup>.**

Cepa Bacteriana	Genoma (Mbp)	GC (%)	Número de plásmidos	Tamaño Total de los plásmidos (Mbp)	Porcentaje de ADN en plásmidos (%)	Referencias
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	9,10	64,06	-	-	-	Kaneko, <i>et al.</i> , 2002
<i>Ensifer medicae</i> WSM419	6,84	61,15	3	3,04	44,41	Reeve, <i>et al.</i> , 2010c
<i>Ensifer meliloti</i> 1021	6,71	62,17	2	3,05	45,53	Galibert, <i>et al.</i> , 2001
<i>Ensifer meliloti</i> SM11	7,49	61,5	4	3,59	47,98	Schneiker-Bekel, <i>et al.</i> , 2011
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	7,59	62,51	2	0,56	7,38	Kaneko, <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	6,53	61,03	6	2,15	32,89	
<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	6,44	61,31	3	1,94	30,12	Gonzalez, <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	7,42	60,77	5	2,65	35,73	Reeve, <i>et al.</i> , 2010a
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304	6,87	61,18	4	2,34	33,98	Reeve, <i>et al.</i> , 2010b
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	7,75	60,86	6	2,69	34,72	Young, <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhizobium</i> sp. LPU83	7,63	59,65	3	3,44 <sup>b</sup>	45,01	Este Trabajo
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	6,90	62,42	2	2,97	43,07	Schmeisser, <i>et al.</i> , 2009

<sup>a</sup> Fuente: "Integrated Microbial Genomes" ([www.img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi](http://www.img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi)) y "Complete Microbial Genomes" de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi))

<sup>b</sup> El tamaño total de los plásmidos es estimado a partir de la información del secuenciamiento (Ver Capítulo III)

#### **I.4. Características generales de los genomas de los rizobios.**

Los miembros de la familia *Rhizobiaceae* tienen genomas con diversas estructuras. Esto incluye cromosomas únicos o múltiples y plásmidos de un tamaño variable. Dentro de las cepas de *Agrobacterium* secuenciadas, *A. tumefaciens* C58 posee un cromosoma circular, un cromosoma lineal y dos plásmidos (Goodner, *et al.*, 2001), mientras *Agrobacterium vitis* S4 posee dos cromosomas circulares y cinco plásmidos (Slater, *et al.*, 2009). *Agrobacterium radiobacter* K84 tiene sólo un cromosoma circular, un gran replicón de 2,65 Mpb, que los autores no consideran como cromosoma, y tres plásmidos (Slater, *et al.*, 2009). Ya dentro de los rizobios, *B. japonicum* USDA110 posee solamente una molécula de ADN de 9 Mpb y *M. loti* MAFF303099 posee un cromosoma de 7 Mpb y dos plásmidos (Kaneko, *et al.*,

2000; Kaneko, *et al.*, 2002). Los rizobios secuenciados que forman una asociación simbiótica eficiente con alfalfa han demostrado conservar una estructura con la presencia de un cromosoma y dos megaplásmidos, de 1,7 Mpb y 1,4 Mpb, algunos de ellos no presentan plásmidos crípticos como *E. meliloti* 1021 (Galibert, *et al.*, 2001), mientras que otros si los tienen, como *E. medicae* WSM419 y *E. meliloti* SM11 (Reeve, *et al.*, 2010c; Schneiker-Bekel, *et al.*, 2011). En el caso de los rizobios noduladores de poroto, como *Rhizobium etli* CIAT652 y *R. etli* CFN42, y los rizobios del género *R. leguminosarum*, se halla una estructura de un cromosoma y un número variable de plásmidos (entre 3 y 6) (González, *et al.*, 2006; Young, *et al.*, 2006; Gonzalez, *et al.*, 2010; Reeve, *et al.*, 2010a; Reeve, *et al.*, 2010b) (Tabla I.1). Si bien en muchos casos se los llama plásmidos, la presencia de genes indispensables en dichos replicones ha dado lugar a llamarlos segundos cromosomas. Evidencias de la presencia de genes indispensables han sido presentadas en *E. meliloti* 1021 con la presencia del ARNt de la arginina (Galibert, *et al.*, 2001). Recientemente, Landeta *et al.* (2011) han demostrado que el plásmido p42e de *R. etli* CFN42 también posee genes esenciales involucrados en el crecimiento en medios de cultivo ricos. Los resultados de dicho trabajo sostienen que tanto el p42e como los replicones homólogos a él (pRL11 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, pRL132502 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325, pRLG202 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304 y pA de *R. etli* CIAT 652) merecen ser considerados como cromosomas secundarios. Al estudiar los cromosomas “primarios” se puede observar una alta conservación de los genes como también de la sintenia génica, mientras que en los cromosomas denominados secundarios, la conservación se halla restringida a algunos bloques de genes, por lo que fue propuesto que los cromosomas secundarios tienen su origen en un plásmido ancestral que adquirió genes esenciales desde el cromosoma “primario” (Slater, *et al.*, 2009).

Como hemos mencionado, los plásmidos en los rizobios varían en número y tamaño; muchos de ellos pueden desarrollar papeles importantes en la asociación entre el rizobio y su planta hospedadora (Mercado-Blanco & Toro, 1996). La mayoría de los genes requeridos para la simbiosis se encuentran alojados en elementos extracromosomales, denominados plásmidos simbióticos (pSym). Numerosos plásmidos no son esenciales para la nodulación y son denominados no simbióticos (García de los Santos, *et al.*, 1996; Mercado-Blanco & Toro, 1996). Debido a que las funciones de muchos de éstos no han sido identificadas, son designados como plásmidos crípticos o accesorios.

#### **I.4.a. Plásmidos simbióticos.**

Los plásmidos simbióticos (pSym) son aquellos que contienen los genes esenciales para el establecimiento una simbiosis completa. Estos plásmidos codifican para los genes requeridos para la nodulación (*nod*), para la fijación de nitrógeno (*nif/fix*) y para la síntesis de polisacáridos (*exo/lps*) (Johnston, *et al.*, 1978; Hirsch, *et al.*, 1980; Banfalvi, *et al.*, 1981; Hooykaas, *et al.*, 1982; Finan, *et al.*, 1986; Hynes, *et al.*, 1986). Además de los genes simbióticos, muchos genes no simbióticos también se encuentran en los pSyms. En *M. loti* y en *B. japonicum* los genes simbióticos se encuentran localizados en el cromosoma. *E. meliloti* contiene dos megaplásmidos de 1,4 y 1,7 Mpb, denominados pSymA y pSymB, respectivamente (Hynes, *et al.*, 1986; Hynes & McGregor, 1990; Barnett, *et al.*, 2001; Finan, *et al.*, 2001). Colectivamente representan un 45% del genoma de *E. meliloti*. La secuencia completa del genoma de *E. meliloti* 1021 demostró la estructura genética de sus replicones (Barnett, *et al.*, 2001; Finan, *et al.*, 2001). La secuencia completa del plásmido simbiótico pNGR234a (536 kpb) de la cepa de amplio rango de huésped *R. sp.* NGR234 (Freiberg, *et al.*, 1997) ha revelado interesantes características. Por ejemplo, un 18 % del plásmido está formado por secuencias similares a secuencias de inserción (IS, *insertion sequences*), integrones y otras secuencias que de acuerdo al cambio en el contenido GC sugieren un proceso evolutivo que resulta en una estructura del tipo de mosaico genético (Hynes & Finan, 1997).

Recientemente, Lozano *et al.* (2010) han caracterizado la dinámica evolutiva del cromosoma y los plásmidos simbióticos de *R. etli*, observando que dichos replicones tienen diferentes historias evolutivas y sosteniendo la hipótesis de que el plásmido simbiótico puede tener un origen reciente en *R. etli* (González, *et al.*, 2006). Por otro lado, vale la pena mencionar que la información acarreada en los plásmidos simbióticos, en cuanto a genes involucrados en la simbiosis, se encuentra conservada (Gonzalez, *et al.*, 2010). Asimismo, la región simbiótica del plásmido simbiótico de los sinorizobios (*Ensifer*) ha sido evaluada y los resultados indican que ha evolucionado como un segmento clonal transferido horizontalmente dentro de las poblaciones naturales (van Berkum, *et al.*, 2010).

#### **I.4.b. Plásmidos no simbióticos.**

Los plásmidos no simbióticos o crípticos son aquellos que no son necesarios para el establecimiento de una simbiosis completa (Mercado-Blanco & Toro, 1996). El tamaño de estos plásmidos es altamente variable. Ha sido postulado que algunas regiones de estos plásmidos pueden estar involucradas en la aparición de rearrreglos genéticos llevando a la

presencia de secuencias repetitivas, generando deleciones y plásmidos cointegrados (Kaluza, *et al.*, 1985; Hahn & Hennecke, 1987). Desde un punto de vista bioquímico, los plásmidos crípticos pueden codificar para características que le provean ventajas a los rizobios que los posean. Los plásmidos crípticos pueden codificar para enzimas involucradas en el metabolismo de compuestos presentes en el suelo o de exudados radiculares, sugiriendo que los plásmidos crípticos pueden tener un rol en el ciclo de vida libre de los rizobios.

En los últimos tiempos se han secuenciado completamente plásmidos crípticos de rizobios, como por ejemplo pSmeSM11a (Stiens, *et al.*, 2006) y pSmeSM11b (Stiens, *et al.*, 2007), ambos aislados de una cepa dominante en ensayos de campo realizados previamente, *E. meliloti* SM11. Es notable destacar que en el caso de pSmeSM11a, posee una región de aproximadamente 42 Kbp que es homóloga a una región del plásmido simbiótico pSymA de *E. meliloti* 1021. Dicho plásmido posee una copia extra de los genes involucrados en la sulfatación de los NFs *nodPQ*, quizás esta copia extra le confiera a la cepa *E. meliloti* SM11 su dominancia en el campo (Stiens, *et al.*, 2006).

#### **I.4.c. Transferencia plasmídica en los rizobios.**

Los elementos genéticos transmisibles por conjugación han sido reportados prácticamente en todos los miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Entre 1970 y 1980, un número significativo de trabajos demostraron la transferencia de los plásmidos desde rizobios donadores hacia otros miembros de la familia *Rhizobiaceae*, utilizados como cepas receptoras. Sin embargo, la naturaleza de los sistemas conjugativos no ha sido investigada en profundidad, excepto en algunos casos particulares (Pistorio, *et al.*, 2003; Tun-Garrido, *et al.*, 2003; Brom, *et al.*, 2004; Pérez-Mendoza, *et al.*, 2004; Pérez-Mendoza, *et al.*, 2005). Los plásmidos transmisibles usualmente coexisten con otros plásmidos no conjugativos, especialmente en aislados rizobianos del suelo (Pistorio, *et al.*, 2008). En muchos casos, estos plásmidos pueden cointegrarse para formar un plásmido más grande (Scott & Ronson, 1982; Brom, *et al.*, 2000; Brom, *et al.*, 2004). Así, la transferencia de un plásmido puede haber ocurrido debido a que: A) es conjugativo, B) se cointegró con otro plásmido que es conjugativo (conducción), o C) porque es un plásmido movilizable y otro plásmido aportó las funciones de transferencia en *trans* (plásmido de ayuda, *helper*). Para discernir entre estas posibilidades es necesario analizar las características de la cepa que contenga solamente el plásmido a evaluar (para ensayar si otro plásmido es requerido o no para la transferencia). La ausencia de transconjugantes en un ensayo de movilización debe ser evaluada con cautela, ya que la expresión de los genes involucrados en la transferencia

pueden estar regulados y/o requerir inductores no siempre presentes en condiciones de laboratorio (Moré, *et al.*, 1996; Li, *et al.*, 1998).

Los plásmidos auto-trasmisibles de rizobios incluyen una amplia variedad de plásmidos crípticos (aprox. 20-500 kpb), y simbióticos (mega) plásmidos (aprox. 400-1600 kpb). La falta de marcadores de selección para monitorear la transferencia de estos plásmidos fue generalmente solucionada mediante la utilización de transposones (Johnston, *et al.*, 1978; Brewin, *et al.*, 1980; Hooykaas, *et al.*, 1981; Brom, *et al.*, 1992; Pistorio, *et al.*, 2003). En el caso de los plásmidos simbióticos, otra estrategia utilizada se sustentó en la utilización de plantas trampa y bacterias receptoras que no posean plásmidos simbióticos, así, la planta selecciona las bacterias que recibieron el plásmido en cuestión (Rao, *et al.*, 1994).

El plásmido simbiótico pRL1JI de *R. leguminosarum* bv. *viciae* fue uno de los primeros en ser identificados como transmisibles (Johnston, *et al.*, 1978). La regulación de la transferencia conjugativa es específicamente inducida por una acil-HSL (Danino, *et al.*, 2003). Esta señal induce en pRL1JI al gen regulador *traR*, cuyo producto induce el operón *traI-trb* en una regulación mediada por QS.

El análisis de la transferencia conjugativa del plásmido p42d, el plásmido simbiótico de *R. etli*, reveló la presencia de un nuevo gen, *rctA*, el cual es esencial en el sistema de regulación para inhibir la transferencia conjugativa del pSym de *R. etli* al reprimir la transcripción de los genes involucrados en la transferencia conjugativa (Pérez-Mendoza, *et al.*, 2005; Sepúlveda, *et al.*, 2008) (ver sección I.2.b.3.ii). En el caso de *E. meliloti*, el simbionte de *Medicago* spp., no había sido posible transferir su pSym bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, Pérez-Mendoza *et al.* (2005) demostraron que la mutación del gen *rctA* en *E. meliloti* permite detectar transconjugantes bajo condiciones de laboratorio.

Numerosos plásmidos no simbióticos han sido reportados como transmisibles en los rizobios. Johnston *et al.* (1982) mediante el uso de mutagénesis generalizada Tn5 mostraron que dos plásmidos crípticos de *R. leguminosarum* 1062, pRL8JI y pIJ1001, eran conjugativos. Es interesante mencionar que la frecuencia de conjugación era baja para cada uno de ellos, pero cuando el plásmido simbiótico y auto-trasmisible pRL8JI se encontraba presente, los plásmidos pRL8JI y pIJ1001 eran movilizadas a mayor frecuencia (Johnston, *et al.*, 1982).

Los plásmidos crípticos de *E. meliloti* GR4, pRmeGR4a y pRmeGR4b son de los mejores caracterizados dentro de los plásmidos no simbióticos de rizobios (Mercado-Blanco & Olivares, 1993; Mercado-Blanco & Olivares, 1994; Herrera-Cervera, *et al.*, 1996; Mercado-Blanco & Toro, 1996; Herrera-Cervera, *et al.*, 1998). Ha sido demostrado que pRmeGR4 es conjugativo y capaz de movilizar al plásmido pRmeGR4b. Este último



plásmido lleva genes involucrados en la eficiencia de la nodulación que determinan la competitividad para la nodulación. Pistorio *et al.* (2003) caracterizaron las propiedades conjugativas de los plásmidos crípticos de la cepa *E. meliloti* LPU88, en este caso, el plásmido pSmeLPU88b es movilizable en presencia del plásmido pSmeLPU88a, el cual aporta las funciones de transferencia en *trans*, sin embargo, este último no es movilizable, a diferencia del sistema binario de la cepa *E. meliloti* GR4.

El análisis del cromosoma y los plásmidos en poblaciones naturales de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Schofield, *et al.*, 1987), bv. *phaseoli* (Geniaux & Amarger, 1993; Laguerre, *et al.*, 1993), bv. *viciae* (Young & Wexler, 1988) y también en *R. galegae* (Kaijalainen & Lindström, 1989) sostiene que existe intercambio genético en condiciones ambientales. Análisis teóricos de algunos datos obtenidos sugieren que entre un 10 % (*R. galegae*) y un 30 % (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) de todos los tipos genéticos han sido donadores o receptores de algún evento de transferencia plasmídica (Valdes & Piñeiro, 1992).

### **I.5. *Medicago sativa* (alfalfa) como sistema modelo de la interacción rizobio-leguminosa.**

En nuestro laboratorio se ha estudiado desde hace muchos años la interacción simbiótica rizobio-leguminosa, tomando como planta modelo *M. sativa* (alfalfa). La alfalfa es la leguminosa forrajera más cultivada para la alimentación animal, ocupando más de 32 millones de hectáreas en el mundo (Michaud, *et al.*, 1988). El interés agronómico en la alfalfa se basa en el alto contenido proteico de dicha forrajera en comparación con otras leguminosas. En la Argentina, más de 6 millones de hectáreas son cultivadas con alfalfa, donde la simbiosis con rizobios eficientes en la FBN es un evento crucial para asegurar la entrada de nitrógeno atmosférico a los suelos agrícolas (Peticari, *et al.*, 1989; Hijano & Basigalup, 1995). Por otro lado, la alfalfa es una planta muy versátil que puede adaptarse a un rango de condiciones climáticas amplio que puede extenderse de estaciones frías y templadas a cálidas y subtropicales (Duke, 1983). También puede cultivarse en una amplia variedad de suelos (Larkcom, 1980), pero lo hace mejor en suelos ricos y bien drenados. Sin embargo, la alfalfa no soporta bien períodos de inundaciones y falla al crecer en suelos ácidos. Por estas razones, el manejo de una simbiosis fijadora de nitrógeno en alfalfa es clave para asegurar un rendimiento máximo en la producción de esta forrajera. Una amplia variedad de condiciones ambientales influyen el establecimiento eficiente de la simbiosis. Un obstáculo importante en esta interacción resulta de los pHs moderadamente

bajos de los suelos, los cuales afectan el establecimiento de la simbiosis con el rizobio eficiente, ya sea indígena y/o inoculado. Una característica distintiva de la alfalfa es la marcada especificidad de esta leguminosa con su microsimbionte, *E. meliloti* o *E. medicae*. Ambas especies bacterianas son extremadamente sensibles a los bajos pHs (Glenn & Dilworth, 1994), pudiendo observar una tasa de crecimiento disminuida o cesante a pH 5,5 o más bajos (Howieson, *et al.*, 1992; Reeve, *et al.*, 1993). La tolerancia a la acidez en los rizobios noduladores de alfalfa ha sido considerada una característica fenotípica clave, por lo que se ha buscado activamente rizobios que puedan desarrollar la FBN cuando otras no lo pueden hacer por las condiciones ambientales desfavorables (Howieson, *et al.*, 1988; Del Papa, *et al.*, 1999).

### **I.6. Rizobios noduladores de alfalfa tolerantes a la acidez, los rizobios tipo Oregon.**

Muchos estudios se han concentrado en el aislamiento y la caracterización de rizobios noduladores de alfalfa de suelos ácidos y se ha demostrado la presencia de dos poblaciones bacterianas, cada una de ellas con claras diferencias en sus propiedades simbióticas y de tolerancia a la acidez (Barber, 1980; Eardly, *et al.*, 1985; Del Papa, *et al.*, 1999). Una de estas poblaciones es representada por el simbiote eficiente de la alfalfa, *E. meliloti*, mientras que la otra población es representada por las cepas *Rhizobium* sp. Or191 y *Rhizobium* sp. LPU83 (Eardly, *et al.*, 1985; Del Papa, *et al.*, 1999). A este grupo de bacterias nos referiremos como rizobios tipo Oregon. Las principales características de este último grupo de bacterias son la tolerancia a la acidez y el amplio rango de hospedadores que poseen. Los rizobios tipo Oregon son capaces de nodular, al menos, *M. sativa*, *P. vulgaris* (poroto) (Eardly, *et al.*, 1985) y *Leucaena leucocephala* (Del Papa, *et al.*, 1999). Asimismo, son altamente competitivas para la nodulación de alfalfa en suelos ácidos. Sin embargo, estas cepas son ineficientes en la FBN en su asociación con alfalfa. Al mismo tiempo, la información genética disponible ha revelado que la estructura genómica de estos aislamientos es compleja, y posee regiones genómicas de diferentes rizobios, lo que genera la dificultad de asignar una clara posición filogenética.

#### **I.6.a. Amplia distribución geográfica y baja variabilidad genómica de los rizobios tipo Oregon.**

La inoculación de alfalfa con el simbiote eficiente y competitivo *E. meliloti* es utilizada desde hace mucho tiempo para aumentar la producción y para preservar la cantidad de

nitrógeno disponible en los suelos agrícolas. Sin embargo, en suelos ácidos, esta inoculación frecuentemente genera pobres resultados, principalmente debido a la baja supervivencia de *E. meliloti* en estas condiciones. Es por esto que se han realizado grandes esfuerzos para encontrar aislamientos de *E. meliloti* tolerantes a la acidez. En 1980, Barber reportó el aislamiento a partir de suelos ácidos en Oregon, Estados Unidos, de cepas de *E. meliloti* que eran capaces de crecer a un pH de 5 pero que formaban nódulos ineficientes en alfalfa. Debido a que no se han reportado cepas de *E. meliloti* con la habilidad de crecer por debajo de pH de 5,6 (O'Hara G, *et al.*, 1989; Graham, *et al.*, 1994; Del Papa, *et al.*, 1999), los aislamientos tolerantes a la acidez descritos por Barber muy probablemente pertenecían al grupo de los rizobios tipo Oregon.

También en Oregon, Eardly *et al.* (1985) aislaron rizobios de nódulos radiculares de plantas de alfalfa noduladas de manera ineficiente. Luego de una caracterización más profunda, estos rizobios tipo Oregon poseían la habilidad de nodular plantas de poroto pero eran incapaces de crecer a 39 °C. En condiciones de laboratorio la mayoría de los rizobios aislados de campo dieron lugar a nódulos en plantas de alfalfa, que fueron generalmente pequeños y blancos, a diferencia de los producidos por *E. meliloti*, los cuales son alargados y rosados debido a la presencia de leghemoglobina. Debido a la promiscuidad simbiótica de estos rizobios, surgió la inquietud de si los aislamientos se encontraban más relacionados con *E. meliloti* o con *R. etli*. Más tarde, Del Papa *et al.* (1999) reportaron rizobios tipo Oregon aislados de nódulos de alfalfa en suelos agrícolas ácidos de América del Sur, los cuales eran genéticamente homogéneos con la cepa *R. sp.* Or191, aislada en Oregon por Eardly *et al.* (1985).

En experimentos de campo en Ontario, Canadá, alfalfa y trébol fueron cultivadas durante dos temporadas en condiciones ligeramente ácidas (pH 6,1), y al aislar las bacterias de los nódulos obtenidos se encontró un grupo predominante de bacterias resistentes a fagos (Bromfield, *et al.*, 2001). Las bacterias recuperadas de alfalfa (con una frecuencia de 69 %) representaban mayoritariamente a un genotipo que era indistinguible de la cepa *R. sp.* Or191 mediante el uso de diferentes marcadores genéticos y análisis de los perfiles plasmídicos (Bromfield, *et al.*, 2010). Asimismo, el aislamiento de rizobios tipo Oregon de nódulos de *P. vulgaris* (poroto) cultivados en suelos ácidos contaminados con cobre en Landes, Francia, indican que la distribución de este grupo de bacterias no se encuentra restringida solamente a suelos americanos (Laguerre, *et al.*, 2006). Así, la uniformidad genética entre los rizobios tipo Oregon ha sido encontrada independientemente de su origen geográfico. Recientemente, un grupo diferente de rizobios tipo Oregon ha sido aislado a baja frecuencia de plantas de alfalfa un rDNA 16S similar (Bromfield, *et al.*, 2010).

### **I.6.b. El aislamiento *Rhizobium* sp. LPU83 es un rizobio tipo Oregon.**

Del Papa *et al.* (1999) analizaron una colección de 465 rizobios capaces de nodular alfalfa aislados de suelos de Argentina y Uruguay de acuerdo a su tolerancia a la acidez. Esta evaluación reveló la presencia de aislamientos tolerantes a la acidez, capaces de crecer a pH 5,0 y formar nódulos en alfalfa con una baja tasa de fijación de nitrógeno. Todos los aislamientos tolerantes a la acidez fueron encontrados a partir de suelos cuyos pHs se encontraban entre 5,0 y 6,5. Los análisis realizados a estos aislamientos demostraron que todos compartían un entorno genético estrechamente relacionado a la cepa descrita previamente *R. sp. Or191*, aislada en suelos de Oregon. Los aislamientos argentinos compartían los perfiles de lipopolisacáridos, las “huellas digitales” de las IS (indicando la distribución de secuencias de inserción), las “huellas digitales” genómicas obtenidas con los cebadores MBOREP1, BOXC1 y ERIC y la secuencia correspondiente al rDNA 16S con la cepa *R. sp. Or191*, demostrando que todos estos aislamientos pertenecían a la misma especie (Wegener, *et al.*, 2001). Dichos aislamientos también compartían los perfiles plasmídicos, con 3 plásmidos denominados pLPU83a, pLPU83b y pLPU83c (Wegener, *et al.*, 2001).

Además de la capacidad de todas estas cepas de formar nódulos de alfalfa ineficientes en la FBN, los aislamientos pertenecientes a este grupo también son capaces de nodular poroto y *L. leucocephala*, revelando un amplio rango de hospedadores. El aislamiento *R. sp. LPU83* fue aislado de Castelar, Buenos Aires, Argentina (en un suelo de pH 6,08) y posee tasas de crecimiento similares en un rango de pH entre 5,0 y 7,0, mientras que la cepa *E. meliloti* 2011 es incapaz de crecer a un pH de 5,5 y su viabilidad disminuye al bajar el pH.

### **I.6.c. Propiedades simbióticas de los rizobios tipo Oregon.**

Con el objetivo de estudiar el rango de hospedadores de los rizobios tipo Oregon, previamente se realizaron ensayos de inoculación con diferentes plantas leguminosas y demostraron que este tipo de rizobios eran capaces de nodular *M. sativa* (alfalfa), *M. truncatula*, *M. nigra* var. *nigra*, *M. arabica*, *M. falcata*, *M. alba* var. *alba*, *M. indica*, *M. messanensis*, *M. officinalis*, *Trigonella foenum-graecum*, *T. caerulem*, *P. vulgaris* y *L. leucocephala*. Sin embargo, las hojas de las plantas inoculadas se ponían amarillentas, y los nódulos producidos por estos rizobios tolerantes a la acidez eran preferentemente blancos y algunos de ellos mostraban áreas necróticas (Eardly, *et al.*, 1992; Wegener, *et al.*, 2001). Los bacteroides producidos por la cepa *R. sp. Or191* no se parecían a las cepas utilizadas en inoculantes biológicos comerciales de alfalfa o de poroto (Eardly, *et al.*, 1992). Wegener *et*

*al.* (2001) analizaron los nódulos producidos por la cepa *R. sp.* LPU83 en alfalfa para intentar establecer si el defecto en la FBN estaba acompañado de una falla en el desarrollo del nódulo; así encontraron que los nódulos producidos por los rizobios tipo Oregon sólo tenían unos pocos bacteroides comparados con aquellos en los que se usó la cepa de referencia *E. meliloti* 2011. Estos autores también demostraron que al intentar recuperar las bacterias desde los nódulos, se obtenían unas 40 veces más unidades formadoras de colonias que con *E. meliloti* 2011. Para complementar estos experimentos, la capacidad de *R. sp.* LPU83 para fijar nitrógeno fue analizada mediante ensayos de reducción de acetileno en *M. sativa*, *M. truncatula* y *P. vulgaris*. En estos ensayos las tasas de fijación de nitrógeno observadas en *R. sp.* LPU83 fueron menores que las tasas de las cepas de referencia correspondientes (Wegener, *et al.*, 2001).

Del Papa *et al.* (1999) profundizaron aún más la caracterización de la nodulación de alfalfa por los rizobios tipo Oregon. Para ello, evaluaron la cinética de nodulación en diferentes partes de la raíz de las plantas. Cuando la alfalfa era inoculada con *E. meliloti* el desarrollo de nódulos alcanzaba un máximo (*plateau*) después de 2-3 semanas post-inoculación. Sin embargo, la cinética de nodulación de *R. sp.* LPU83 exhibía un patrón diferente, la nodulación continuaba en el tiempo a una misma tasa incluso 4 semanas post-inoculación, dicho fenómeno se observaba en las raíces secundarias. Esta característica probablemente se encontraba asociada a la pobre FBN. Al analizar la ocupación de los nódulos producidos en alfalfa de las cepas tipo Oregon cuando son co-inoculadas con *E. meliloti*, Segundo *et al.* (1999) encontraron que estos rizobios son muy competitivos en la nodulación a pHs ácidos.

Introduciéndonos más en los aspectos moleculares de la simbiosis, Soto *et al.* (2004) observaron que la adhesión de *E. meliloti* a la raíz de alfalfa es uno de los pasos limitantes para la simbiosis a pHs bajos, a diferencia de los rizobios tipo Oregon, en los cuales la adhesión no se ve afectada significativamente en dichas condiciones.

Como hemos mencionado previamente, la inducción de la formación de nódulos en alfalfa ha sido descrita como un mecanismo que necesita de ciertas moléculas señal de naturaleza lipoquitooligosacáridica, los denominados factores de nodulación (NFs) (ver sección I.3.a.iii) (Perret, *et al.*, 2000; Jones, *et al.*, 2007). En el caso de la alfalfa, los NFs deben estar sulfatados en su extremo reductor, siendo este sustituyente un determinante clave en la especificidad de la interacción alfalfa-rizobio (Schultze, *et al.*, 1995). Recientemente, resultados de nuestro laboratorio, presentaron evidencia de que existe el gen *nodH*, encargado de codificar para la enzima que sulfata los NFs en la cepa *R. sp.* LPU83. La mutación de este gen en la cepa *R. sp.* LPU83, sin embargo, no impide la nodulación de

alfalfa por el mutante mencionado, cuando en *E. meliloti* esto no es posible. Lamentablemente, la estructura de los NFs de dicho mutante *nodH* no fue determinada, dejando abierto el interrogante de si podía existir otra enzima que produzca la sulfatación de los NFs o si esta cepa es capaz de nodular alfalfa sin poseer factores de nodulación sulfatados (Del Papa, *et al.*, 2007).

#### **I.6.d. Estudios taxonómicos previos con el objetivo de dilucidar las relaciones genómicas de los rizobios tipo Oregon.**

En el pasado, los rizobios se clasificaban basados en el concepto de grupo de inoculación cruzada, en el cual los rizobios eran agrupados de acuerdo a la habilidad de cada rizobio para específicamente infectar y fijar nitrógeno con un cierto grupo de leguminosas (Fred, *et al.*, 1932). En la actualidad se conoce que muchos rizobios pueden formar una simbiosis con diversas plantas y que el concepto de inoculación cruzada no es apropiado para realizar una clasificación de los rizobios. Más tarde, las especies rizobianas comenzaron a ser analizadas a niveles fenotípicos, genotípicos y filogenéticos (Eardly, *et al.*, 1992; Eardly, *et al.*, 1995; van Berkum, *et al.*, 1996).

Debido a la promiscuidad de los rizobios tipo Oregon, surge la pregunta de si estos aislamientos se encontraban más cercanamente relacionados con los rizobios noduladores de alfalfa o con los rizobios noduladores de poroto. Como primera aproximación para resolver esto, los rizobios tipo Oregon fueron evaluados en características que pudieran discernir a qué grupo de rizobios se parecían, como la tolerancia a stress ambiental, la efectividad simbiótica y perfiles enzimáticos (*multilocus enzyme electrophoresis*). Estos resultados, sin embargo, no fueron decisivos (Eardly, *et al.*, 1992). Con la llegada de métodos filogenéticos más poderosos, Laguerre *et al.* (2001) realizaron el análisis de los genes 16S rDNA (Figura I.8), *nodC* (Figura I.9) y *nifH* dentro de una colección de 83 cepas de rizobios representando a 23 especies distribuidas en los géneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, como también otras cepas sin clasificar de varias leguminosas. Los árboles filogenéticos obtenidos utilizando el gen del 16S rDNA mostraron que los rizobios tipo Oregon se encontraban relacionados con los rizobios noduladores de poroto, trébol y arveja (Figura I.8). En contraste con esto, el gen *nodC*, que codifica para la enzima que cataliza la primera reacción de síntesis del núcleo de los NFs (Perret, *et al.*, 2000) indicó que el gen *nodC* de *E. meliloti*, es el gen más cercano (Figura I.9). Los análisis del gen *nifH* demostraron que los rizobios tipo Oregon forman un nuevo clado que se agrupa de manera cercana al clado formado por *E. meliloti* y *E. medicae*. Recientemente,

Del Papa *et al.* (2007) estudiaron el gen *nodH* y encontraron relaciones filogenéticas similares a las descritas previamente con respecto a los genes simbióticos (Laguerre, *et al.*, 2001).

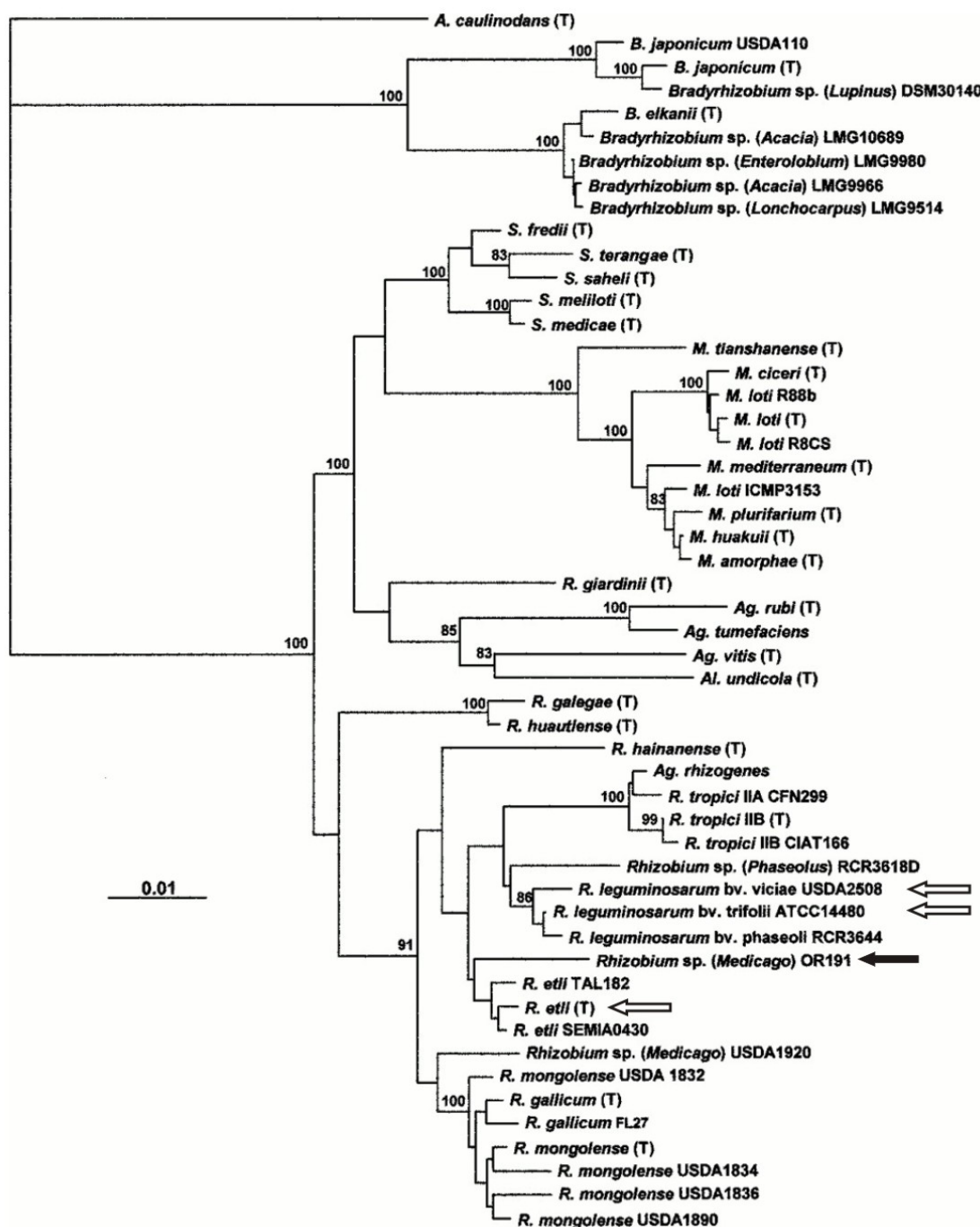
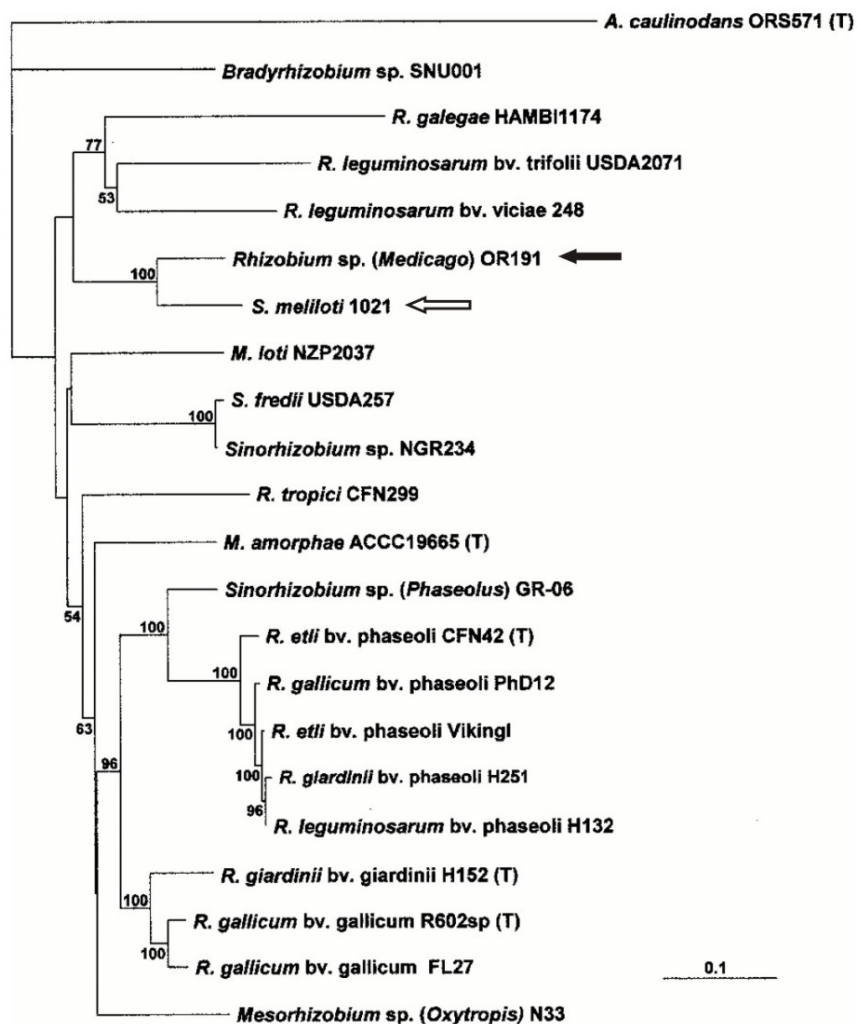


Figura I.8. Análisis filogenético del gen del 16S rDNA. Con un flecha llena se indica la posición de los rizobios tipo Oregon, mientras que con flechas vacías los rizobios noduladores de poroto, trébol y arveja. Tomado de Laguerre, *et al.*, 2001.



**Figura I.9. Análisis filogenético del gen *nodC*.** Con un flecha llena se indica la posición de los rizobios tipo Oregon, mientras que con una flecha vacía la cepa del simbionte eficiente de alfalfa, *E. meliloti*. Tomado de Laguerre, *et al.*, 2001.

Es esperable que las relaciones filogenéticas basadas en genes del plásmido simbiótico no se correspondan con las que se utilicen genes cromosomales, probablemente debido a que estos plásmidos pueden transferirse a través de diferentes entornos genéticos.



## **I.7. Objetivos.**

### **I.7.a. Consideraciones generales.**

Debido a sus características particulares fenotípicas y taxonómicas, los rizobios tipo Oregon han atraído la atención de los rizobiólogos desde su aislamiento original por Eardly *et al.* (1985) en Oregon, USA. Estos rizobios son tolerantes a la acidez, tienen un rango de hospedadores amplio (nodulan varias leguminosas), son muy competitivos para la nodulación de alfalfa en suelos ácidos y son ineficientes para la fijación de nitrógeno en asociación con la alfalfa. Todos estos factores señalan a este grupo de rizobios como un potencial factor de riesgo en los suelos agrícolas en los que coexisten y compiten con *E. meliloti*, el simbionte eficiente de alfalfa. Nueva información sobre la genética y fisiología de las bacterias tipo Oregon es necesaria para desarrollar mejores estrategias y herramientas (moleculares) para su detección, para comprender de modo más acabado su ecología en suelos de cultivo, y para minimizar los impactos sobre la simbiosis eficiente entre alfalfa y *E. meliloti*.

### **I.7.b. Objetivos Generales.**

Abordar estudios genómicos y caracterizar funcionalmente a los rizobios tipo Oregon, noduladores de alfalfa y otras leguminosas, tolerantes a la acidez e ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

### **I.7.c. Objetivos Específicos.**

- Obtener el genoma completo de la cepa *Rhizobium* sp. LPU83, como el representante mejor caracterizado de los rizobios tipo Oregon.
- Realizar el análisis funcional *in silico* del nuevo genoma y evaluar, comparativamente, marcadores cromosomales y plasmídicos respecto de sus homólogos en otros rizobios con el fin de establecer relaciones funcionales y filogenéticas con otras rizobacterias.
- Analizar la información contenida en plásmidos, y su transmisibilidad por vía conjugativa.
- Determinar la estructura de los factores de nodulación de los rizobios tipo Oregon como determinantes de especificidad para la nodulación de alfalfa. Explorar las relaciones estructurales de los factores de nodulación con los de otros rizobios, especialmente los noduladores de *Medicago* spp. y *Phaseolus vulgaris*.



# **Capítulo II**

## **Materiales y Métodos**



## 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. Los plásmidos y transposones utilizados se detallan en la Tabla II.2.

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

Cepas	Propiedades	Referencias
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
UBAPF2	<i>A. tumefaciens</i> libre de plásmidos. Rifa <sup>r</sup> .	Hynes, <i>et al.</i> , 1985
UBAPF2G	Derivado de UBAPF2. Gm <sup>r</sup> por la presencia del transposón Tn5-M8S.	Este trabajo
<i>Ensifer meliloti</i>		
2011	Sm <sup>r</sup> , Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> en alfalfa	J. Dénarié, France
2011-Sp	Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> , Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> en alfalfa.	Pistorio, <i>et al.</i> , 2003
20MP6	Derivado de <i>E. meliloti</i> 2011, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , GFP.	Pistorio, <i>et al.</i> , 2002
SmA818	<i>E. meliloti</i> 2011 curada del plásmido pSymA.	Oresnik, <i>et al.</i> , 2000
SmA818R	Derivado de SmA818, Rifa <sup>r</sup> .	Este trabajo
SmA818B	SmaA818R con el plásmido pLPU83b-5.	Este trabajo
SmA818AB	SmaA818R con el plásmido pLPU83b-5 y pLPU83a-13.	Este trabajo
<i>Rhizobium etli</i>		
CFNX89	CFN42 curada del plásmido simbiótico.	Brom, <i>et al.</i> , 1992
CFNX89R	Derivado de CFNX89, Rifa <sup>r</sup> .	Este trabajo
<i>Rhizobium</i> sp.		
LPU83	Sm <sup>r</sup> , Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+/-</sup> en alfalfa.	Del Papa, <i>et al.</i> , 1999
LPU83-5	Tn5-B10 insertado en pLPU83b.	Este trabajo
LPU83-12	Tn5-B10 insertado en pLPU83c.	Este trabajo
LPU83-13	Tn5-B10 insertado en pLPU83a.	Este trabajo
LPU83-21	Tn5-B10 insertado en pLPU83c.	Este trabajo
LPU83-35	Tn5-B10 insertado en pLPU83a.	Este trabajo
LPU83-38	Tn5-B10 insertado en pLPU83b.	Este trabajo
LPU83-H	<i>R. sp.</i> LPU83 <i>nodH</i> ::pGnod83, Sm <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> .	Del Papa, <i>et al.</i> , 2007

Tabla II.1. Continuación

Cepas	Propiedades	Referencias
LPU83-dobleH	Derivado de LPU83. Posee el gen de Tc <sup>r</sup> del plásmido pHP45Ω-Tc interrumpiendo el gen <i>nodH</i> .	Este trabajo
LPU83 (pMP604)	<i>R. sp.</i> LPU83 con el plásmido pMP604. Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> .	Este trabajo
LPU83-H (pMP604)	<i>R. sp.</i> LPU83-H con el plásmido pMP604. Sm <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> .	Este trabajo
LPU83-nodC::lacZ sense	Derivado de LPU83, Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Fusión transcripcional en el gen <i>nodC</i> con el plásmido pGATT9.	Este trabajo
LPU83-nodC::lacZ antisense	Derivado de LPU83, Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Fusión transcripcional en el gen <i>nodC</i> con el plásmido pGATT10.	Este trabajo
LPU83-traR <sup>r</sup>	<i>R. sp.</i> LPU83 (pLPU83a-traR::(pK18mob::traR)). Sm <sup>r</sup> Nm <sup>r</sup> .	Este trabajo
LPU83-traR <sup>r</sup> (pBBR1MCS5)	<i>R. sp.</i> LPU83-traR <sup>r</sup> con el plásmido (pBBR1MCS5). Sm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> , Gmr.	Este trabajo
LPU83-traR <sup>r</sup> (pBBR1MCS5::traR)	<i>R. sp.</i> LPU83-traR <sup>r</sup> con el plásmido (pBBR1MCS5::traR). Sm <sup>r</sup> , Nmr, Gmr.	Este trabajo
LPU83-GFP	Derivado de <i>R. sp.</i> LPU83 conteniendo el plásmido pFAJ-1708::GFP. Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> .	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , F80 <i>dlac</i> ZDM15.	Bathesda Res. Lab.
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma.	Simon, <i>et al.</i> , 1983

Rif<sup>r</sup>, Nm<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup> = Resistencias a rifampicina, neomicina, estreptomina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, ampicilina, y cloranfenicol, respectivamente.

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

Plásmidos y transposones	Propiedades	Referencias
Plásmidos		
pLOW1	Cm <sup>r</sup> , Vector de clonado de bajo número de copias.	Hansen, <i>et al.</i> , 1997
pUC19	Amp <sup>r</sup> , Vector de clonado de alto número de copias.	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> , 1985
pK18mob	Km <sup>r</sup> . Vector de clonado de alto número de copias.	Schäfer, <i>et al.</i> , 1994
pK18mob-LK	Derivado de pK18mob con un sitio de clonado modificado.	Tesis Doctoral M. Lozano
pG18mob2	Gm <sup>r</sup> . Vector de clonado de alto número de copias.	Kirchner & Tauch, 2003

Tabla II.2. Continuación

Plásmidos y transposones	Propiedades	Referencias
pFAJ1708	Amp <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> . Vector replicativo y estable en rizobios. Posee el sitio de clonado múltiple río abajo del promotor fuerte de <i>nptII</i> para permitir la expresión de genes.	Dombrecht, <i>et al.</i> , 2001
pK18mobsacB	Km <sup>r</sup> . Confiere sensibilidad a sacarosa. Vector de clonado de alto número de copias.	Schäfer, <i>et al.</i> , 1994
pBBR1MCS5	Gm <sup>r</sup> . Vector de clonado de bajo número de copias, replicativo en rizobios con el promotor Lac.	Kovach, <i>et al.</i> , 1995
pK18mob::traR	Gm <sup>r</sup> . Derivado de pK18mob con 257 pb internas al gen <i>traR</i> de pLPU83a.	Este trabajo
pBBR1MCS5::traR	Gm <sup>r</sup> . Derivado de pBBR1MCS5 con el gen <i>traR</i> de pLPU83a en la misma orientación que el promotor Lac.	Este trabajo
pGreenTIR	Vector con la posibilidad de liberar un <i>cassette</i> con la proteína verde fluorescente (GFP).	Miller & Lindow, 1997
pFAJ1708::GFP	Derivado de pFAJ1708 conteniendo el fragmento <i>EcoRI</i> del pGreenTIR que codifica para la GFP en el mismo sentido que el promotor fuerte de <i>nptII</i> .	Este trabajo
pAB2002	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , con el <i>cassette lacZ-aacCI</i> sin promotor para fusiones transcripcionales del gen <i>lacZ</i> .	Becker, <i>et al.</i> , 1995
pGATT8	Km <sup>r</sup> . pK18mob-LK, con un fragmento <i>EcoRI</i> de 1,25 kb del gen <i>nodC</i> de <i>R. sp.</i> LPU83.	Este trabajo
pGATT9	<i>Cassette lacZ-aacCI</i> del pAB2002 en el sitio <i>HindIII</i> del pGATT8, orientado en igual sentido que el gen <i>nodC</i> .	Este trabajo
pGATT10	<i>Cassette lacZ-aacCI</i> del pAB2002 en el sitio <i>HindIII</i> del pGATT8, orientado en antisentido del gen <i>nodC</i> .	Este trabajo
pKnodHTc	Derivado de pK18mobsacB que posee el gen de Tc <sup>r</sup> del plásmido pHP45Ω-Tc interrumpiendo el gen <i>nodH</i> de <i>R. sp.</i> LPU83.	Este trabajo
pHP45Ω-Tc	Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> . Posee un <i>cassette</i> con la resistencia a Tc <sup>r</sup> flanqueado por terminadores transcripcionales y traduccionales.	Prentki & Krisch, 1984
pMP604	Tc <sup>r</sup> . Plásmido FITA. Contiene un activador transcripcional independiente de flavonoides.	Spaink, <i>et al.</i> , 1989
pRDV3	Cósmido conteniendo la región <i>nod</i> de <i>R. sp.</i> LPU83.	Del Papa, <i>et al.</i> , 2007
pRDV7	Cósmido conteniendo la región <i>nod</i> de <i>R. sp.</i> LPU83.	Del Papa, <i>et al.</i> , 2007
pLPU83b-5	Tn5-B10 insertado en pLPU83b.	Este trabajo

Tabla II.2. Continuación

Plásmidos y transposones	Propiedades	Referencias
pLPU83a-13	Tn5-B10 insertado en pLPU83a.	Este trabajo
pRK2013	Km <sup>r</sup> , replicón ColE1, tra <sup>+</sup> de RK2.	Figurski & Helinski, 1979
RK600	Cm <sup>r</sup> , replicón ColE1, tra <sup>+</sup> de RK2.	Kessler, <i>et al.</i> , 1992
Transposones		
Tn5-B10	Km <sup>r</sup> RP4-mob.	Simon, <i>et al.</i> , 1989
Tn5-M8S	Gm <sup>r</sup> RP4-mob.	Quandt, <i>et al.</i> , 2004

Rifa<sup>r</sup>, Nm<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup> = Resistencias a rifampicina, neomicina, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, ampicilina, y cloranfenicol, respectivamente.

## II.2. Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.

### II.2.a. Medios de cultivo.

Los cultivos de las bacterias de los géneros *Ensifer*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY (Beringer, 1974) o YEM (Vincent, 1970):

#### TY

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

#### YEM

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0.4 g
Agua (desionizada)	1000 ml



Para el análisis y producción de factores de nodulación se utilizó medio **B** para el crecimiento de *R. sp.* LPU83 (Spaink, *et al.*, 1992):

**B**

Manitol	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.55 g
KNO <sub>3</sub>	0.55 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,3 g
Fe(III)-NaEDTA	33 mg
Biotina	2 mg
Tiamina HCl	5 mg
Elementos traza (400x)	2,5 ml
Agua (desionizada)	1000 ml

Solución de elementos trazas 400X

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,27 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,609 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,4 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04 g
Agua (desionizada)	1000 ml

Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio Luria-Bertani (**LB**) (Sambrook, *et al.*, 1989) cuya composición es la siguiente:

**LB**

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

Para la preparación de medios sólidos se utilizó en todos los casos 15 g/l de agar agar. Al utilizar medio YEM sólido se le adicionó rojo congo 0,25 % (p/v).

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

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

### **II.2.b. Medios de conservación.**

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

### **II.2.c. Antibióticos.**

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada salvo en los casos de tetraciclina, que se utilizó etanol, y para rifampicina y espectinomicina, en los que se utilizó metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración empleando membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ): para *E. coli* kanamicina sulfato (Km) 25; y para rizobios, neomicina sulfato 120 (Nm), ampicilina 200 (Ap), estreptomycinina 400 (Sm), rifampicina 200 (Rifa) espectinomicina 200 (Sp), tetraciclina 10 (Tc), gentamicina (Gm) 50 para rizobios y 10 para *E. coli*.

## **II.3. Procedimientos microbiológicos.**

### **II.3.a. Métodos de conjugación.**

#### *II.3.a.i. Conjugaciones biparentales.*

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon *et al.* (1983) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5 ml se mezclaron 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora (DO a 600 nm = 0,4 - 0,5) con 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora. La mezcla fue centrifugada a 640 g durante 8 minutos y el sedimento resuspendido suavemente en aproximadamente 50  $\mu\text{l}$  de medio líquido TY. La suspensión entonces fue colocada en una caja de Petri con medio TY sólido sin antibióticos e incubada a 28°C durante 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue finalmente resuspendida en medio líquido TY y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s) para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregó la bacteria donadora o la receptora.

### II.3.a.ii. *Conjugaciones Triparentales.*

Mediante esta metodología se realizó la transferencia de plásmidos no autotransmisibles (conteniendo el *oriT* del plásmido RK2) desde cepas que no poseían las funciones compatibles para la transferencia de los mismos. Para ello se utilizaron dos plásmido *helper* (de ayuda) según el caso, pRK2013 (Figurski & Helinski, 1979) o RK600 (Kessler, *et al.*, 1992) desde una tercera cepa de *E. coli* (conjugaciones triparentales). Para ello fueron mezclados en una proporción de volúmenes 1:1:1, la cepa donadora, la receptora y la cepa movilizadora (*helper*) todas en su fase exponencial tardía de crecimiento (500 µl de cada una). Esta mezcla fue centrifugada a 640 g minutos y el sedimento bacteriano fue resuspendido en 100 µl de medio líquido TY. La mezcla fue colocada sobre una placa conteniendo medio sólido TY. Las cajas fueron incubadas a 28°C por 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue resuspendida en medio líquido TY y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s). Se realizaron controles en los que la cepa donadora, receptora y la portadora del plásmido de ayuda se procesaron en forma independiente.

### II.3.b. **Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E.coli*.**

Se siguió la técnica de Tung & Chow (1995), con leves modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB sin cloruro de sodio con 1 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue incubado a 37°C y agitado vigorosamente hasta que la DO a 600 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 glicerol 10 % a 4°C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en glicerol 10 % a 4°C y se fraccionaron en alícuotas de 100 µl.

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

## II.4. *Técnicas de biología molecular.*

### II.4.a. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreps").

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

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

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

En ocasiones se utilizaron Kits comerciales para la obtención de plásmidos.

### II.4.b. Extracción de ADN total.

A partir de cultivos en fase exponencial tardía, se centrifugaron 1 ml de los mismos durante 3 min en un microtubo de polipropileno. Las células se lavaron luego con 100 µl de N-lauril sarcosina 0,1 % (P/V) en TE y se centrifugó durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de NaCl 1M. A continuación el sedimento se resuspendió en 250 µl de sacarosa 20 % (P/V) en TE, se añadieron 250 µl de lisozima 5 mg/ml en TE, se incubó 1 hora a 37°C, y luego se agregaron 50 µl de pronasa (2,5 mg/ml en TE) y 100 µl de SDS al 5% (P/V) en TE. La suspensión que fue mezclada por inversión se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Posteriormente, a la solución de ADN se le añadió 200 µl de fenol equilibrado con Tris pH 8, 70 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,4 y 100 µl de cloroformo. Se mezcló suavemente. La mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm pasando a continuación la fase superior acuosa a un nuevo tubo donde se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm. Recogida la fase acuosa, el ADN se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol frío y centrifugando durante 15 minutos a 13000 rpm. El precipitado obtenido se lavó con 0,5 ml

de etanol al 70 % y se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. El ADN se resuspendió en 25-50  $\mu$ l de agua y se incubó a 60° durante una hora.

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

#### **II.4.c. Electroforesis de ADN.**

##### II.4.c.i. *Geles de lisis in situ.*

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

##### II.4.c.ii. *Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.*

La separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2 % P/V) fue realizada empleando TBE (Tris 89 mM, EDTANa<sub>2</sub> 2,5 mM, BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 89 mM, pH 8,2) como tampón de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40 % y azul de bromofenol 0,25 % en una relación 5  $\mu$ l solución de ADN en agua o TE /  $\mu$ l solución de carga.

#### II.4.c.iii. *Revelado de geles y fotografía.*

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 260 nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación ultravioleta.

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

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

#### II.4.c.v. *Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.*

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

#### **II.4.d. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).**

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico iCycler o MyCycle (Ambos *Bio-Rad*). Se utilizaron las ADN polimerasas Pfx Platinum de *Invitrogen* (Temperatura óptima de elongación 68 °C), la Taq polimerasa (Temperatura óptima de elongación 72° C) de *Invitrogen* o la LongAmp Taq DNA polimerasa (Temperatura óptima de elongación 65° C) de *New England Biolabs* para fragmentos mayores a 2,5 Kpb, siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes. Los cebadores fueron utilizados 10 µM para PCR específicas, con volumen final de 25 µl en cada mezcla de reacción. Los cebadores empleados para la realización y evaluación de mutantes están listados en la Tabla II.2. Más de mil cebadores fueron utilizados para la finalización del genoma por lo cual omitimos su descripción. Los cebadores fueron sintetizados por *Operon, molecules for life* o *Metabion*.

Finalizada la reacción de PCR, 10 µl del producto fueron sembrados en un gel de agarosa.

Los moldes de ADN 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 ( $10^8$ - $10^9$  u.f.c.) fueron resuspendidas en 100 µl agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 14000 g por 4 minutos y 5 µl de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde. El remanente fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Alternativamente se realizaron preparaciones de ADN total de acuerdo a la metodología que se describió en II.4.b.

b) para la amplificación de secuencias específicas de ADN contenidas en plásmidos: Se preparo ADN plasmídico según se detalla en II.4.a y se realizó una dilución final 1/200.

**Tabla II.3. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en reacciones de PCR en este trabajo.**

Nombre	Secuencia*	Referencias
M13 Rv (-40)	5'– CAGGAAACAGCTATGAC –3'	Cebador universal
M13 Fw (-40)	5'– GTTTTCCAGTCACGAC –3'	Cebador universal
traR Rv	5'– AGACGAAAGTTGGACCTGGA –3'	Este Trabajo
traR Fw	5'– ATCGGATCGATTTTCGTCGT –3'	Este Trabajo
traR-Fw-out	5'– GGGACGGGAGGAGCAG –3'	Este Trabajo
traR-Rv-out	5'– CCGGTGACCGAGACGA –3'	Este Trabajo
nodH-out-Nter	5'– CCTATCCATTCAAGCCTCCT –3'	Este Trabajo
nodH-out-Cter	5'– CAAGTCCCTCAGCACCAA –3'	Este Trabajo
Tc-out-Nter	5'– GGCGAGATCACCAAGGTA –3'	Este Trabajo
Tc-out-Cter	5'– CTCGACCTGAATGGAAGC –3'	Este Trabajo
Tc Fw	5'– CTCCTTGCATGCACCATT –3'	Este Trabajo
Tc Rv	5'– GAATACCGCAAGCGACAG –3'	Este Trabajo
exoY Fw	5'– ATGGCCCTCGTCAAGTCT –3'	Hozbor <i>et al.</i> , 2004
exoY Rv	5'– GTTCTGGACATATTGCGTG –3'	Hozbor, <i>et al.</i> , 2004
nodCi	5'– CGYGACAGCCANTCKCTATTG –3'	Laguerre, <i>et al.</i> , 2001
nodCf	5'– AYGTHGTYGAYGACGGTTC –3'	Laguerre, <i>et al.</i> , 2001
ISs	5'– TGGAAGCTCAGATCCTGGAA –3'	Hozbor, <i>et al.</i> , 1998
IS50 directo	5'– GCTCGATCTAGAACGTTTCATGATAACTTCTGC –3'	Tesis Doctoral M. Pistorio
IS50 reverso	5'–TCTGCGGACTGGCTTTCTAC –3'	Tesis Doctoral M. Pistorio
nodH-LPU83-Fw	5'– TGTGGGCTGCAAGATCAA –3'	Del Papa, <i>et al.</i> , 2007
nodH-LPU83-Rv	5'– AAATCGTCGGCAGCTTTG –3'	Del Papa, <i>et al.</i> , 2007

\*Y=C o T; H=A, C o T; R=A o G; S=C o G; K=G o T; N=A, C, G o T; I=inosina.

#### **II.4.e. Tratamientos enzimáticos del ADN.**

Las reacciones enzimáticas del ADN se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por las casas comerciales (*Roche, Invitrogen, Fermentas y Promega Corp.*), y las recomendaciones descritas en Sambrook *et al.* (1989). Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas. Cuando fue necesario luego de los tratamientos enzimáticos se procedió a la inactivación de las enzimas por desnaturalización térmica.

#### **II.4.f. Precipitación del ADN con etanol.**

Cuando fue necesario purificar el ADN de impurezas o luego de tratamientos enzimáticos se realizó la precipitación del ADN con Etanol. Para esto, se agregó 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5,4 a la mezcla, se llevo a 100 µl con agua bidestilada y se agregó 300 µl de etanol 96° frio. Se incubó a -20°C durante 2 horas y se centrifugó 30 minutos a 13000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante con pipeta y se dejó secar para eliminar el etanol remanente. Luego se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril.

#### **II.4.g. Ensayos de hibridación (*Southern blot*).**

El ADN resultante de la digestión con endonucleasas de restricción, fue separado por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0.8 % a 1-2 Volt/cm. Una vez finalizada la corrida se visualizó el ADN por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV. A continuación el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon (Nylon N - Hybond). La transferencia alcalina de ADN se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: en primer lugar se incubó el gel de agarosa durante 1 hora en una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M y NaCl 3,0 M). Luego el gel se lavó durante 15 minutos con la solución de transferencia (8 mM de NaOH y 3,0 M de NaCl , pH 11,4) y se colocó entre papeles absorbentes y sobre la membrana Hybond formando un puente de papel por el que circuló la solución de transferencia por capilaridad durante una hora (transferencia rápida). Transcurrido ese lapso de tiempo, la membrana se neutralizó con tampón fosfato a pH 6,8 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M de cada uno) por 10 minutos para provocar la renaturalización del ADN. Se la secó a 80°C y finalmente se fijó el ADN a la membrana mediante exposición a luz UV de 260 nm durante 10 min.

Los filtros fueron prehibridados e hibridados en la misma mezcla (solución de prehibridación) excepto por la presencia de la sonda en esta última. Se utilizaron condiciones que favorecieron la hibridación de la sonda con regiones de ADN de alta



similitud de secuencia [58°C, 5X SSC (SSC 1X: 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio)]. Los lavados del filtro posteriores a la hibridación consistieron en: dos lavados con 2xSSC - 0.1 % (P/V) SDS a temperatura ambiente; dos lavados con 0,1xSSC - 0,1 % SDS a 60°C (Boehringer Mannheim). Para el revelado, las membranas fueron incubadas con anticuerpos contra digoxigenina y luego lavadas. El revelado fue realizado mediante una reacción quimioluminiscente, la cual fue iniciada a pH alcalino por la adición de *CDP-Star* (*GE Healthcare*) bajo las recomendaciones del fabricante. Las imágenes fueron capturadas con un “BioChemi System Video Digital Camera HCCD” (*UVP Inc., USA*).

#### **II.4.h. Construcción de sondas marcadas con digoxigenina (DIG) por PCR.**

Las sondas de hibridación marcadas con DIG fueron preparadas por PCR, pero empleando desoxiribonucleótidos (dNTPs) y digoxigenina-11-dUTP en las concentraciones indicadas en el producto (*Roche*). Para eliminar nucleótidos libres (fríos y marcados) los productos de PCR fueron precipitados por agregado de 3 volúmenes de etanol 96° y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M, y centrifugación a 14000 g 10 minutos. El precipitado fue lavado finalmente con 100 µl de etanol 70°, centrifugado 5 minutos a 14000 g 10 minutos y resuspendido en 50 µl de agua. Cuando fue necesario, la sonda se conservó congelada a -20°C ya sea en agua o en solución bloqueante de hibridación.

#### **II.4.i. Construcción de una biblioteca genómica en fósmidos.**

Para la realización de la biblioteca genómica en fósmidos se utilizó el kit comercial “*EpiFOS™ Fosmid Library Production Kit*” de *Epicentre Biotechnologies*, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN total de *R. sp. LPU83* fue obtenido como se describe en II.4.b y fragmentos de 40 kpb fueron clonados en el vector pCC1FOS provisto en el Kit.

#### **II.4.j. Método general para la caminata genómica.**

A partir de regiones ubicadas en los extremos de fragmentos conocidos se diseñaron cebadores para amplificar productos de entre 250 y 700 pb. Éstos se eligieron de manera tal que no posean sitios *SmaI* en su interior para facilitar el clonado posterior. Los productos se amplificaron con la polimerasa Pfx, que deja extremos romos y fueron clonados en el plásmido suicida en rizobios pK18mob, previamente digerido con *SmaI* (corte romo) y se omitió la inactivación de la enzima para evitar el religado del vector. Los clones obtenidos fueron posteriormente secuenciados. Los plásmidos fueron transferidos desde *E. coli* S17-1 a *R. sp. LPU83* por conjugación y los transconjugantes fueron seleccionados con Sm y Nm.

A partir de los mutantes obtenidos se aisló ADN total que se digirió con enzimas de restricción para obtener fragmentos de ADN adyacentes al sitio de inserción. Luego, se religó el ADN genómico digerido y se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los plásmidos obtenidos de un tamaño mayor a 6 Kpb fueron secuenciados.

#### **II.4.k. Construcción de la cepa reportera de la inducción de los genes involucrados en la síntesis de factores de nodulación en *R. sp.* LPU83.**

A partir del cósmido pRDV7 (Del Papa, *et al.*, 2007) se obtuvo un fragmento *EcoRI* de 1,2-Kpb que contenía una porción del gen *nodC* de *R. sp.* LPU83. Dicho fragmento se clonó en el sitio *EcoRI* del plásmido pK18mob-LK para generar el plásmido pGATT8. El gen *nodC* posee un sitio *HindIII* donde se clonó un *cassette* de 4 Kpb con el gen reportero *lacZ* y el de la resistencia a Gm (*aacCI*) del plásmido pAB2002 (Becker, *et al.*, 1995). Así, se generaron las construcciones en el sentido de la transcripción de *nodC* (*sense*) y en el sentido inverso (*antisense*), plásmidos pGATT9 y pGATT10, respectivamente. Estos plásmidos fueron transferidos desde *E. coli* S17-1 a *R. sp.* LPU83 por conjugación para la integración en el *cluster* de genes *nod* de *R. sp.* LPU83, generando las cepas *R. sp.* LPU83-*nodC::lacZ-sense* y *R. sp.* LPU83-*nodC::lacZ-antisense*, respectivamente. La correcta integración de los plásmidos fue confirmada por PCR utilizando los cebadores M13 y los cebadores *nodCi* y *nodCf* descritos por Laguerre *et al.* (2001), que se aparean en los extremos del gen *nodC*.

#### **II.4.l. Construcción de un mutante *nodH* estable en *R. sp.* LPU83.**

En primer lugar, un fragmento de 1,8 Kpb contenido en un pBBR1MCS5 utilizado por Del Papa *et al.* (2007) que contenía el gen *nodH* de *R. sp.* LPU83 completo fue interrumpido en el sitio único *DraI* con el *cassette* de resistencia a tetraciclina del plásmido pHP45 $\Omega$ Tc (Prentki & Krisch, 1984). En segundo lugar, la construcción fue liberada con *XbaI* y *PstI* para clonarla en el vector pK18mobsacB (Schäfer, *et al.*, 1994) y generar así el vector pKnodHTc. El mutante estable *nodH* de *R. sp.* LPU83 fue generado por homogeneización del vector pKnodHTc, y búsqueda de transconjugantes Tc<sup>r</sup>, Nm<sup>s</sup>, Sac<sup>s</sup>. La cepa obtenida fue designada *R. sp.* LPU83-dobleH. Este mutante fue confirmado por PCR con los cebadores externos *nodH-out-Nter* y *nodH-out-Cter* y los cebadores internos en el gen de tetraciclina Tc-out-Nter y Tc-out-Cter. El producto de PCR fue digerido con enzimas de restricción y el patrón de bandas obtenido confirmó el doble entrecruzamiento.

#### **II.4.m. Recuperación de las zonas aledañas a la integración de transposones.**

Para determinar la inserción de transposón Tn5 en los clones deseados se obtuvo ADN total de los mismos y se lo digirió con la enzima *BamHI* para su posterior ligación en el plásmido pLOW1 (digerido *BamHI*). La mezcla de ligación fue transformada en *E. coli* DH5 $\alpha$  y seleccionados por su resistencia a Km. Los clones fueron secuenciados con el cebador ISs.

#### **II.4.n. Construcción de un mutante en el gen *traR* del plásmido pLPU83a.**

Se diseñaron los cebadores traR Rv y tra Fw para amplificar 275 pb internas al gen *traR*. Luego se amplificó el fragmento con la polimerasa Pfx y se clonó en el plásmido pK18mob. Se secuenció uno de los clones obtenidos para chequear la construcción realizada. Dicho plásmido fue transferidos desde *E. coli* S17-1 a *R. sp.* LPU83 por conjugación y los transconjugantes seleccionados con Sm y Nm. La correcta integración de los plásmidos fue confirmada por PCR utilizando los cebadores M13 y los cebadores externos traR-Fw-out y traR-Rv-out. La cepa mutante obtenida fue denominada *R. sp.* LPU83-*traR*<sup>-</sup>.

#### **II.4.o. Complementación del mutante *R. sp.*LPU83-*traR*<sup>-</sup> en *trans*.**

Con los cebadores traR-Fw-out y traR-Rv-out y la polimerasa Pfx se amplificaron 876 pb que codifican para el gen *traR* completo. El producto obtenido fue clonado en el plásmido pBBR1MCS5, previamente digerido con *SmaI*. Debido a que deseábamos clonar el gen *traR* río abajo del promotor Lac para asegurarnos la expresión del mismo, los clones obtenidos fueron evaluados por PCR con los cebadores M13 Rv y traR-Rv-out para buscar la orientación deseada. La construcción se confirmó mediante secuenciamiento y fue transferida desde *E. coli* S17-1 al mutante *R. sp.* LPU83-*traR*<sup>-</sup> por conjugación. Los transconjugantes fueron seleccionados con Sm, Nm y Gm.

#### **II.4.p. Construcción de una cepa isogénica de *R. sp.* LPU83 que expresa la proteína verde fluorescente.**

Con el objetivo de obtener una cepa isogénica de *R. sp.* LPU83 que exprese la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), se decidió construir un vector replicativo y estable en rizobios que pueda expresar dicho gen constitutivamente. Para ello, a partir del vector pGreenTIR se obtuvo un fragmento *EcoRI* de 0,7 Kpb que contiene el gen de la GFP sin promotor y se lo clonó en el sitio *EcoRI* del vector pFAJ1708, de esta manera la expresión de la GFP quedó bajo el control de un promotor fuerte en rizobios,

como es el promotor de *nptII*. El vector obtenido fue denominado pFAJ1708::GFP e introducido en *R. sp.* LPU83 para generar la cepa *R. sp.* LPU83-GFP.

#### **II.4.q. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.**

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió por el método del o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) descrito por Miller *et al.* (1972). Para ello, 125  $\mu$ l de cultivo de DO mayor a 0,6 unidades se les adicionaron 375  $\mu$ l de tampón Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,06M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,04 M; KCl 0,01 M;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 M;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05M, pH=7), 20  $\mu$ l de una solución de SDS 0,1 % (P/V) y 50  $\mu$ l de cloroformo. Las mezclas se termostataron a 37°C por 10 minutos y a continuación se agregaron 100  $\mu$ l de ONPG 4 mg/ml. Se cronometró el tiempo y se detuvo la reacción por agregado de 250  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Se midió la absorbancia a 420 nm de las mezclas de reacción.

#### **II.4.r. Secuenciación de ADN.**

##### II.4.r.i. *Pirosecuenciación.*

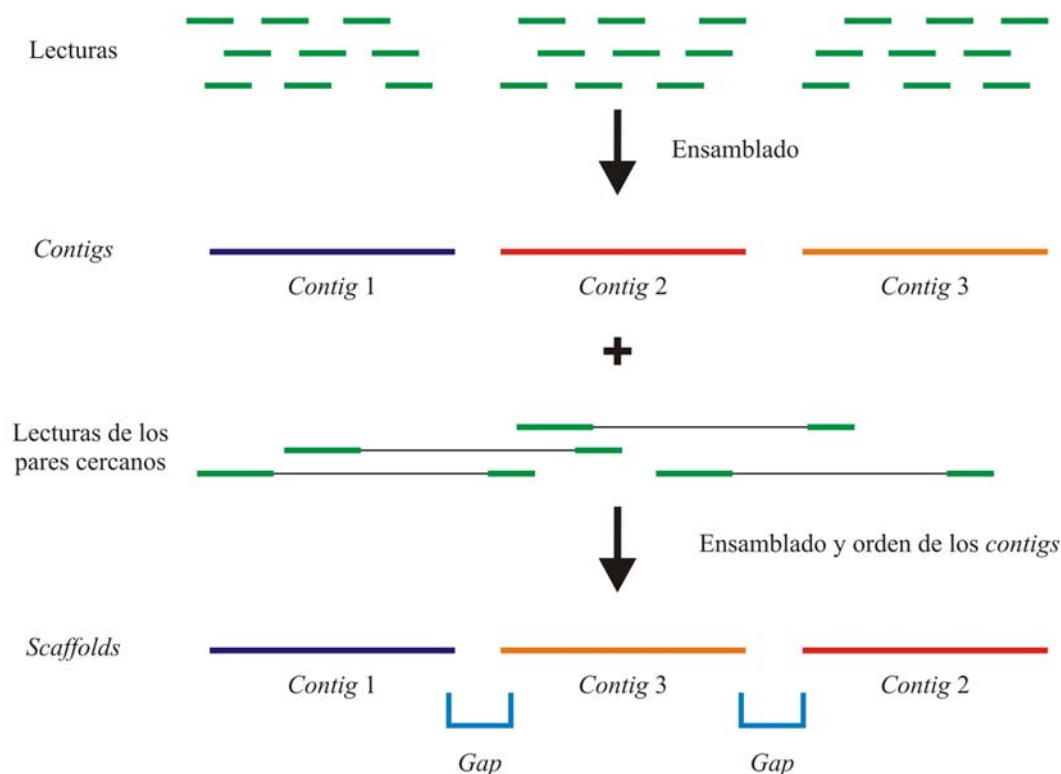
El ADN total de la cepa *Rhizobium* LPU83 se analizó mediante el uso de un secuenciador “454”. En primer lugar se utilizó la tecnología *GS FLX Titanium*, para luego utilizar el sistema *GS FLX Titanium 3 kb Span Paired End*, en todos los casos los materiales utilizados fueron provistos por Roche y se siguieron los protocolos descritos por la empresa proveedora.

##### Ensamblado y nomenclatura.

Las lecturas obtenidas del pirosecuenciamiento por la tecnología *GS FLX Titanium* fueron ensambladas generando estructuras denominadas *contigs*, este procedimiento fue realizado utilizando el programa *gsAssembler* implementado en el *software Newbler (Roche)*. Luego, mediante el uso de la tecnología *GS FLX Titanium 3 kpb Paired End*, ordenamos los *contigs* debido a que las lecturas obtenidas no solamente dan información de la secuencia, sino que establece que dichas lecturas se encuentran a una distancia conocida (en nuestro caso 3 Kbp). Sin embargo, quedaron regiones cuya secuencia nucleotídica debía ser completada (estas regiones son denominadas *gaps*). La estructura de *contigs* ordenados y *gaps* se denomina *scaffolds* (Figura II.1). Una vez obtenidas dichas estructuras, se utilizó el programa *Consed* (Gordon, *et al.*, 1998) para incorporar nuevas secuencias y para realizar el ensamblado final de los distintos replicones.

### II.4.r.ii. *Secuenciamiento por el método de Sanger.*

Para la secuenciación de plásmidos recombinantes o productos de PCR se utilizaron secuenciadores automatizados ABI3730XL de *Macrogen Inc. Korea* o del servicio de secuenciación de la Universidad de Bielefeld, Alemania.



**Figura II.1. Estrategia de secuenciamiento.** Esquema del procedimiento de ensamblado de las lecturas y la nomenclatura utilizada.

## II.5. *Inducción, detección, y purificación de los factores de nodulación.*

### II.5.a. **Compuestos utilizados como inductores.**

Los flavonoides utilizados fueron naringenina (*4',5,7-trihydroxyflavanone*), apigenina (*4',5,7-trihydroxyflavone*), crysina (*5,7-dihydroxyflavone*), luteolina (*3',4',5,7-tetrahydroxyflavone*), genisteina (*4',5,7-trihydroxyisoflavone*), daidzeina (*4',7-dihydroxyisoflavone*), isoliquiritigenina (*4,2',4'-trihydroxychalcone*), fisetina (*3,3',4',7-tetrahydroxyflavone*), flavanona (*2,3-dihydroflavone*), kaempferol (*3,4',5,7-tetrahydroxyflavone*), morina (*2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone*), flavonas (*2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one*), umbelliferona (*7-hydroxycoumarin*), 6-hydroxyflavanona, 4,7-dihydroxyflavanona, quercetina (*3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone dihydrate*), 7-hydroxyflavona, 5-hydroxyflavonas, hesperedina (*hesperetin 7-rhamnoglucoside*) y

coumesterol (7, 12-dihydroxycoumestan). Las soluciones de flavonoides fueron preparadas en etanol, a una concentración de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Para la preparación de exudados, semillas de *M. sativa* (alfalfa cv. Monarca) y *P. vulgaris* (poroto cv. Negro Jamapa) fueron esterilizadas superficialmente como se describe en II.7.a. Luego, las semillas fueron colocadas en 20 ml de agua. Dos días después, los exudados fueron filtrados (tamaño de poro de  $0,2 \mu\text{m}$ ) y guardados.

### **II.5.b. Detección de NFs por cromatografía en capa fina.**

Los análisis por cromatografía en capa fina de los factores de nodulación se llevaron a cabo de acuerdo con el método propuesto por Spaink *et al.* (1992). Para ello, se prepararon cultivos en medio mínimo B<sup>-</sup> a una D.O.= 0,2 medida a 600 nm, los cuales fueron diluidos en el mismo medio adicionando el flavonoide inductor correspondiente, salvo para el control negativo, hasta una concentración final de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . El marcaje radiactivo se efectuó con  $0,4 \mu\text{Ci}$  de clorhidrato de  $^{14}\text{C}$ -glucosamina (actividad específica de  $55 \text{ Ci mol}^{-1}$ ; Amersham). Después de 16 horas de cultivo, se añadió n-butanol saturado con agua (0,5 ml) al sobrenadante, dejándose la mezcla 12 horas con agitación. Después de una centrifugación para separar la fase butanólica de la acuosa, se concentró la fase butanólica en un rotavapor Speed-Vac. El sólido resultante se resuspendió en n-butanol saturado con agua (40  $\mu\text{l}$ ), aplicándose esta disolución (5-10  $\mu\text{l}$ ) a la placa de cromatografía en capa fina de sílica (HPTLC Sílica Gel 60, Merck) de 10 cm x 10 cm. La separación de los factores de nodulación se llevó a cabo empleando una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1) como eluyente. Las placas de cromatografía en capa fina fueron visualizadas mediante el uso del equipo de detección "PhosphorImager" después de 7 días de exposición.

### **II.5.c. Obtención de NFs a gran escala.**

Para el análisis de la estructura de los factores de nodulación se prepararon muestras a partir de 2 L de cultivo. A partir de tubos con 5 mL de cultivo en medio B<sup>-</sup> de la bacteria a estudiar se inocularon matraces de 100 mL del mismo medio y se incubaron a 28 °C. Una vez que la DO a 600 nm llegó a 0,6-0,8, se trasvasó el contenido de los matraces a otros con 1 L del medio indicado suplementado con el flavonoide correspondiente a una concentración final de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , salvo controles negativos. Ambos cultivos fueron incubados a 28 °C en agitación hasta fase exponencial tardía. La extracción de los factores de nodulación se realizó añadiendo 300 mL de n-butanol por litro de medio, dejándolo en agitación durante 12 horas. Posteriormente se recogió la fase butanólica concentrándose a

sequedad en rotavapor a 50 °C. El sólido obtenido se resuspendió en 10 ml de Acetonitrilo (AcN) en agua al 60 % (v/v) para luego llevarlo a una concentración de AcN 20 % (v/v), esta última etapa se realizó con agitación constante durante 12 hs.

#### **II.5.d. Purificación de los NFs obtenidos.**

El extracto butanólico conteniendo los factores de nodulación se pasó a través de una columna de purificación en fase reversa C18 (octadecilsilano) (SPE 6 ml, 1g, Resprep). Luego se lavó la columna con AcN 20 % (v/v) y se eluyó con metanol. La fracción metanólica obtenida se concentró y se liofilizó. Por último, se resuspendió en AcN 50 % (v/v) y se filtró para su separación por HPLC

#### **II.5.e. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas de los NFs.**

La muestra obtenida se sometió a fraccionamiento utilizando un cromatógrafo de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución, *High Performance Liquid Chromatography*). Para esto, se utilizó un sistema de HPLC "Perkin Elmer Series 200" (Wellesley, MA, USA) acoplado a un detector "Applied Biosystems QTRAP LC-MS/MS system" (Foster City, CA, USA), el cual consiste en un espectrómetro de masas que posee un triple cuadrupolo con una fuente de ionización por *electrospray*. Los análisis por HPLC fueron realizados en una columna de fase reversa "Tracer pherisorb ODS2 C18" con un tamaño de partícula de 5 µm (Teknokroma, Barcelona, España). El flujo utilizado fue de 0,3 ml min<sup>-1</sup>. La separación cromatográfica fue realizada mediante el uso de un gradiente binario formado por agua (A) y acetonitrilo (B), con ambos componentes conteniendo un 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. El perfil de elución fue isocrático por 5 min en un 30 % B, luego B se incrementó linealmente desde un 30 % a 100 % durante 30 min, finalmente, se realizó un nuevo paso isocrático de 3 min.

La detección por espectrometría de masas fue realizada en modo positivo. Para el análisis HPLC-MS/MS, el espectrómetro fue configurado con los siguientes parámetros: "Curtain gas, 35 psi, Ion-spray potential, 5,500 V; Source temperature, 300 °C; Source gas, 60 psi; Declustering potential, 50 V; Entrance potential, 10 V". Los experimentos MS/MS fueron realizados con una energía de colisión de 35 V. Solamente los iones precursores con una relación m/z entre 800 y 1,600, e intensidades mayores a 1,000 cps fueron seleccionados para el análisis posterior por MS/MS.

## **II.6. Captura de imágenes.**

### **II.6.a. Capturas digitales macroscópicas.**

Las fotografías realizadas a placas de Petri fueron tomadas con BioChemi System Video Digital Camera HCCD (*UVP Inc., USA*).

### **II.6.b. Microscopía óptica.**

Los preparados de bacterias frescos fueron observados bajo microscopio de fluorescencia (Olympus) y la toma de imágenes fue realizada con una cámara digital Olympus SP-350 o Canon Power Shot A620. Alternativamente se usó un microscopio Nikon Eclipse E400 equipado con una cámara digital Nikon CoolPix 4500.

Para la observación de la estructura de los nódulos, las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2 % durante dos horas a 4° C y se lavaron con tampón fosfato. Luego se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1 % durante 2 horas a 4°C. Una vez post-fijadas se lavaron con tampón fosfato y se deshidrataron en una batería de alcoholes desde 50° hasta alcohol absoluto y finalmente acetona. Posteriormente las muestras se infiltraron e incluyeron en resina Epoxi durante 36 hs a 35°, 50° y 60°C para su polimerización. Se realizó vacío suave en la mayor parte del procesamiento.

Los cortes semifinos de 2-3  $\mu\text{m}$  de espesor se colorearon con Azul de O-Toluidina. Los cortes ultrafinos de 60 nm de espesor se montaron sobre grillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo al 1 % y citrato de plomo. Los cortes semifinos como los ultrafinos se realizaron con un Ultramicrotomo Reichert-J Super Nova. Se realizaron las observaciones en un microscopio Nikon Eclipse E400 equipado con una cámara digital Nikon CoolPix 4500.

## **II.7. Ensayos con plantas.**

### **II.7.a. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.**

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa), ecotipo monarca o supermonarca o *Phaseolus vulgaris* bv. *negro jamapa* como plantas hospedadoras. Las semillas fueron esterilizadas en superficie por inmersión en etanol durante 30 segundos y luego en lavandina comercial al 25 % durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente (10 veces) con H<sub>2</sub>O estéril y se dejaron húmedas en reposo durante 2 hs. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas de Petri con agar-



agua, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C hasta su germinación (24-48 h). Se pudo comprobar el grado de esterilidad extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28°C.

### **II.7.b. 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), 22/16°C de temperatura (día/noche).

### **II.7.c. Cultivo axénico de plantas de alfalfa.**

Cuando las plántulas alcanzaron una longitud de 1-2 cm, se introdujeron en condiciones asépticas en bolsas plásticas que contenían 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro (cinéticas de nodulación/experimentos de competición). Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, las bolsas se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas. Alternativamente las plantas fueron crecidas en macetas con vermiculita y solución nutritiva (fijación de nitrógeno/experimentos de competición).

### **II.7.d. Solución nutritiva.**

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos de alfalfa se utilizó la solución Fåhraeus modificada por Lodeiro, *et al.* (2000).

CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,11 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,12 g
NaCl	0,06 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 g
Citrato Férrico	0,005 g
Micronutrientes	1 ml (solución 1000X)
H <sub>2</sub> O (desionizada)	1000 ml

Composición de los Micronutrientes:

KCl	3,73 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,55 mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,85 mg

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,13 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,58 mg
Na <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,018 mg
H <sub>2</sub> O (desionizada)	1000 ml

El medio fue esterilizado en autoclave 15 minutos a 120°C. El CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O y el MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O fueron adicionados luego desde soluciones 1000 veces concentradas.

#### **II.7.e. Inoculación de los cultivos.**

La inoculación de las plantas de alfalfa con los cultivos bacterianos se hizo tras 5 días de permanencia en la cámara de cultivo. En el caso de las bolsas plásticas se inoculó 100 µl de suspensión bacteriana por planta en medio Fåhraeus (las cuales contenían aproximadamente 10<sup>6</sup> u.f.c. ml<sup>-1</sup>). Se hicieron recuentos en placa de los inóculos preparando diluciones seriadas de los mismos.

#### **II.7.f. Medida de la competitividad para la nodulación.**

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo mediante identificación de cepas marcadas con diferentes resistencias a antibióticos.

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos en fase logarítmica tardía a los que se les estimó el número de bacterias por medida de DO a 600 nm. Se tomó de cada cultivo un volumen adecuado que se diluyó en el medio mineral estéril para conseguir la densidad celular deseada (10<sup>6</sup> u.f.c. ml<sup>-1</sup>, según el experimento).

La inoculación de las plantas se realizó con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de dos cepas en proporción 1:1 y la mezcla se utilizó para inocular las plantas. Se partió para esto de cultivos bacterianos que tenían aproximadamente la misma DO a 600 nm. 28 días después de la inoculación se cortaron las raíces noduladas y se esterilizaron superficialmente los nódulos.

Los patrones diferenciales de resistencia a antibióticos permitieron determinar la ocupación de cada una de las dos cepas inoculadas.

#### **II.7.g. Reaislamiento de rizobios de los nódulos.**

Los nódulos aparecidos en los experimentos de competitividad fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 20 % durante 10 min. Seguidamente se lavaron vigorosamente con agua estéril 5-6 veces y se trituraron individualmente, en

condiciones asépticas, con una varilla de madera. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY con el/los antibiótico/s requeridos para la selección.

## **II.8. Análisis bioinformático.**

### **II.8.a. Anotación.**

Para la anotación de los genes se utilizaron las herramientas disponibles en el sistema *on-line BRF (Bioinformatic Research Facility)* del CeBiTec de la Universidad de Bielefeld. Dichas secuencias han sido pre-anotadas automáticamente vía el módulo *GenDB (Open Source Genome Annotation Framework)* desarrollado para la anotación automática inicial de secuencias derivadas de genomas procariotas. El sistema, además, provee una amplia variedad de herramientas con acceso a diferentes sistemas de asignación funcional (*EC number*, COGs).

### **II.8.b. Genómica comparativa.**

Las comparaciones y los diversos análisis bioinformáticos realizados durante este trabajo fueron realizados con programas disponibles en Internet. Salvo excepciones que se encuentran detalladas, dichos programas fueron utilizados manteniendo sus parámetros normales. Entre ellos se encuentran los servicios de Blast (Altschul, *et al.*, 1990) de NCBI, MUMmer (Kurtz, *et al.*, 2004), EDGAR (Blom, *et al.*, 2009) y ACT (*Artemis Comparison Tool*) (Carver, *et al.*, 2005).

### **II.8.c. Estudios filogenéticos.**

Los diversos estudios filogenéticos fueron realizados utilizando el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1989), MEGA4 (Tamura, *et al.*, 2007) o el paquete online *phylogeny.fr* (Dereeper, *et al.*, 2008). Los parámetros utilizados fueron los predeterminados en dichos programas.

### **II.8.d. Secuencias utilizadas.**

Para la construcción de los árboles de IGS<sub>NOD</sub> se utilizaron los aislamientos descriptos por Bailly *et al.* (2007). Cuyos números de acceso y código de letras son: STM2778, DQ405467.1, AH; STM2782, DQ405471.1, AF; STM2797, DQ405486.1, AE; STM2811, DQ405540.1, G; STM2825, DQ405510.1, S; STM2832, DQ405517.1, R; STM2833, DQ405518.1, U; STM2835, DQ405520.1, V; STM2836, DQ405521.1, W; STM2837, DQ405522.1, Z; STM2840, DQ405525.1, X; STM2841, DQ405526.1, Y; STM2861,

DQ405570.1, L; STM2867, DQ405576.1, D; STM2874, DQ405583.1, E; STM2876, DQ405585.1, A; STM2878, DQ405587.1, C; STM2879, DQ405588.1, B; STM2883, DQ405592.1, K; y STM2889, DQ405492.1, T. El IGS<sub>NOD</sub> de *Rhizobium mongolense* USDA 1844 es DQ406575.1.

Los genomas de diferentes rizobios se encuentran disponibles y fueron obtenidas desde <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi> o [www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi).

# **Capítulo III**

**Secuenciamiento completo de  
*Rhizobium* sp. LPU83**

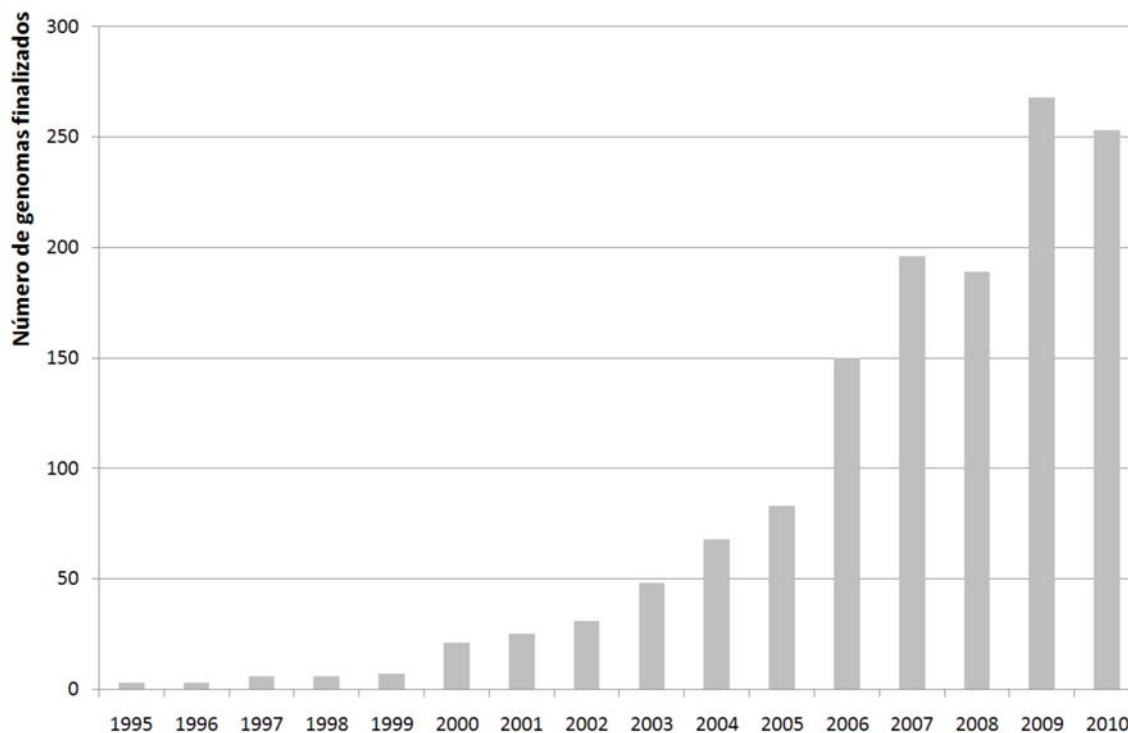


### III.1. *Introducción.*

La secuenciación de ácidos nucleicos comenzó su desarrollo hace aproximadamente 45 años, cuando Holley *et al.* (1965) secuenciaron completamente el ARNt de la alanina de *Escherichia coli*. Sin embargo, la secuenciación de ADN se hizo esperar unos 10 años más, cuando Sanger *et al.* (1977a) en la Universidad de Cambridge, Inglaterra, y Maxam & Gilbert (1977) en la Universidad de Harvard, Estados Unidos, reportaron sendos métodos que revolucionaron dicho campo de estudio. En ese mismo año, el bacteriófago  $\phi$ X174 (cuyo pequeño genoma es de 5,4 Kpb) es el primer genoma de ADN en ser completamente secuenciado (Sanger, *et al.*, 1977b). Con la aparición de los primeros equipos automatizados para el secuenciamiento del ADN (Smith, *et al.*, 1986), los proyectos genómicos tomaron un impulso considerable, comenzando en 1990 cuando el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH, *National Institutes of Health*) proyecta la secuenciación de algunos microorganismos como *E. coli*; así también comienza el Proyecto Genoma Humano. En 1995, Fleischmann *et al.* describen la primera secuencia de un organismo de vida libre, *Haemophilus influenzae* (con un genoma de 1,8 Mpb). Dos años más tarde, el genoma de *E. coli* (4,6 Mbp) es finalizado (Blattner, *et al.*, 1997). El genoma humano es completado en el año 2001 por el Consorcio Internacional de Secuenciamiento del Genoma Humano (Hutchison, 2007).

La aparición del pirosecuenciamiento (Nyren, *et al.*, 1993; Ronaghi, *et al.*, 1998) permitió el desarrollo de nuevas tecnologías, y en Octubre de 2005, *Roche Applied Science* lanza al mercado el secuenciador 454, el primer sistema de secuenciamiento denominado “secuenciador de la próxima generación” (*next-generation sequencing system*). La aparición de estas nuevas tecnologías (Metzker, 2010) a un precio relativamente bajo, generó un considerable aumento en el número de proyectos para la obtención de genomas y con ello un aumento en los genomas disponibles en las bases de datos (Figura III.1). En la actualidad se encuentran en progreso más de 3000 proyectos de genomas procariotes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>).

Hace 10 años que fueron completados los primeros genomas de rizobios, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (7,6 Mpb) (Kaneko, *et al.*, 2000) y *Ensifer meliloti* 1021 (6,6 Mpb) (Galibert, *et al.*, 2001). En los últimos años, diversos rizobios han sido secuenciados completamente (Wood, *et al.*, 2001; González, *et al.*, 2006; Young, *et al.*, 2006; Pinto, *et al.*, 2009; Schmeisser, *et al.*, 2009; Slater, *et al.*, 2009; Reeve, *et al.*, 2010c; Reeve, *et al.*, 2010a; Reeve, *et al.*, 2010b).



**Figura III.1. Comparación del número de genomas procariotas completos publicados por año.** Fuente: *Complete Microbial Genomes* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>).

Como hemos mencionado en la introducción de este trabajo, en nuestro laboratorio se han caracterizado un grupo distintivo de rizobios denominados rizobios tipo Oregon, tolerantes a la acidez, capaces de nodular, al menos, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, y *Leucena leucocephala*, altamente competitivos con *E. meliloti* en acidez e ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno. Además, la constitución genética de los mismos ha impuesto severas restricciones a la taxonomía clásica de estos rizobios (Eardly, *et al.*, 1985; Eardly, *et al.*, 1992; Eardly, *et al.*, 1995; Del Papa, *et al.*, 1999; Wegener, *et al.*, 2001; Del Papa, *et al.*, 2007).

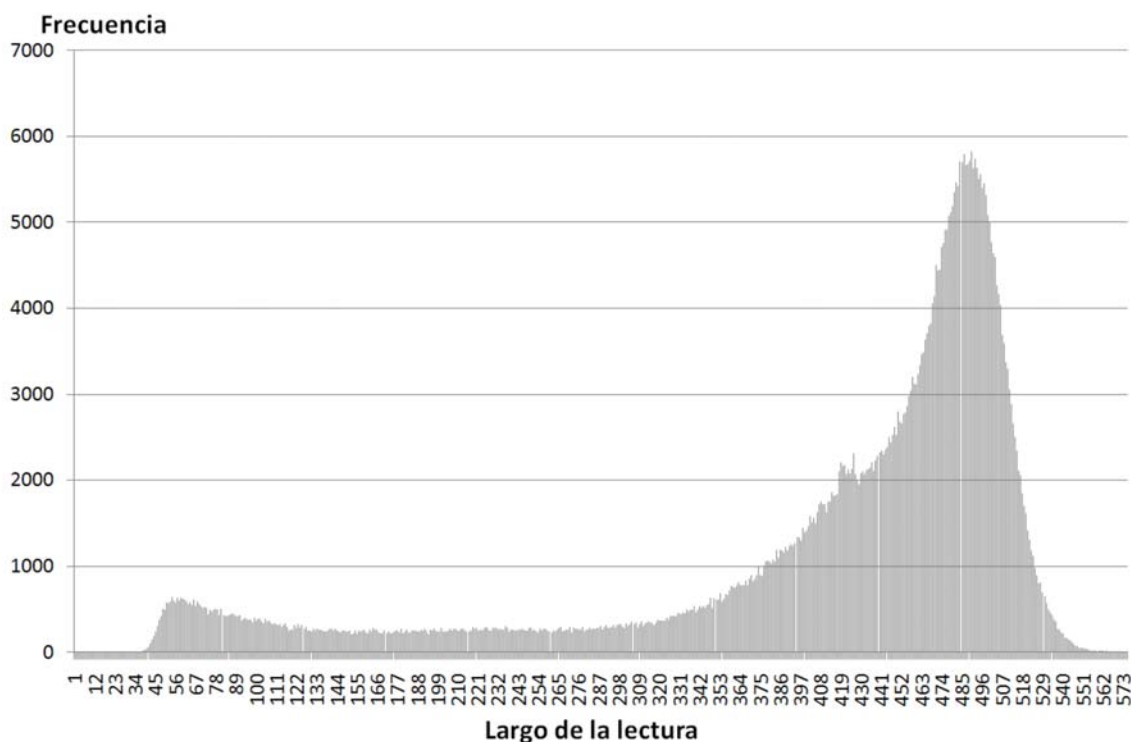
Para profundizar los estudios orientados a conocer mejor la biología de este grupo de rizobios, como primer etapa, nos propusimos la obtención del genoma de la cepa de referencia *Rhizobium* sp. LPU83. En el presente capítulo, presentamos la estrategia utilizada para lograr dicho objetivo.

### III.2. Pirosecuenciamiento del genoma de *Rhizobium* sp. LPU83.

Como primer paso para la obtención del genoma completo de la cepa de referencia *R. sp.* LPU83 se realizó un secuenciamiento *de novo* utilizando el sistema GS FLX (454 Life Sciences, Roche) valiéndonos de la tecnología “Titanium”. El uso de media placa de pirosecuenciamiento nos permitió obtener 553100 lecturas con aproximadamente 227,7

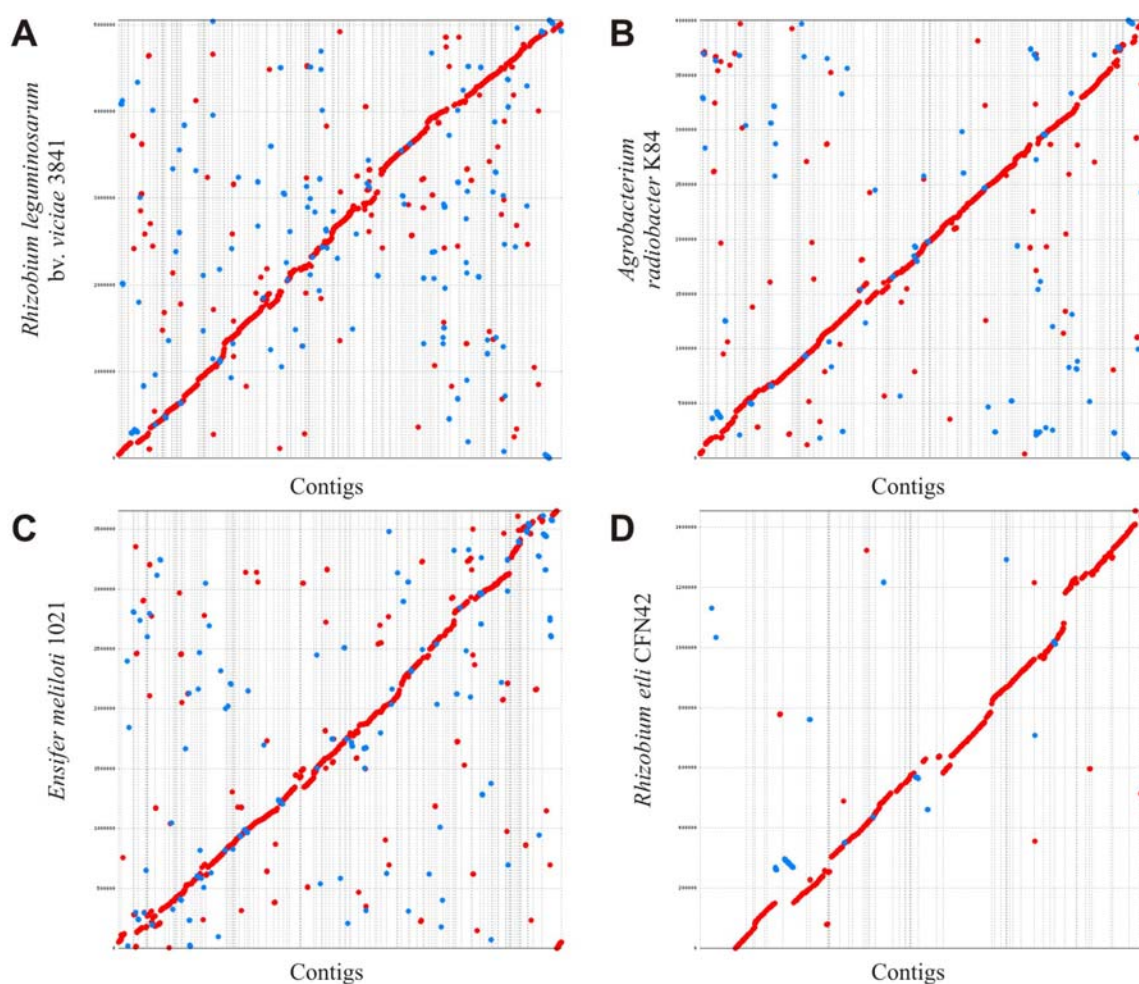


Mpb leídas. En la Figura III.2 se observa la distribución de los tamaños de las lecturas donde la abundancia de secuencias de un largo de entre 450 y 500 pb evidencia que la calidad del secuenciamiento fue satisfactoria. El ensamblado de las lecturas fue realizado utilizando el *gsAssembler* implementado en el *software Newbler (Roche)* y el resultado obtenido fue de 423 *contigs* largos (>500 pb) con un tamaño total de 7378608 bases, lo que representa una cobertura de aproximadamente 30 veces el genoma de *R. sp. LPU83* (Tabla III.1). En el secuenciamiento de genomas por pirosecuenciamiento se obtienen generalmente un número variable de *gaps* que impiden obtener la estructura física completa del mismo; usualmente, los *gaps* se deben a la presencia de secuencias repetitivas en el genoma, que el programa de ensamblado no puede discernir en qué orden se ubican. Cabe aclarar que la imposibilidad de obtener la estructura completa no significa que la información no se encuentre disponible, sino que el ensamblado no puede realizarse de forma certera. Debido al elevado número de *contigs*, se realizó un alineamiento de los *contigs* obtenidos para *R. sp. LPU83* con los cromosomas de cepas de referencia de distintas especies de rizobios secuenciadas para intentar deducir las relaciones que podían existir con los mismos y para intentar predecir el orden de los *contigs*. En el análisis se incluyeron las cepas *E. meliloti* 1021 (AL591688 (Galibert, *et al.*, 2001)), *Rhizobium etli* CFN42 (CP000133 (González, *et al.*, 2006)), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841



**Figura III.2. Frecuencia del largo de las lecturas obtenidas de *R. sp. LPU83* del primer pirosecuenciamiento.** Se puede observar una lectura promedio de 413 y una moda en el largo de las lecturas de 491 pb, estos datos indican la calidad satisfactoria del pirosecuenciamiento.

(AM236080 (Young, *et al.*, 2006)) y *Agrobacterium radiobacter* K84 (CP000628 (Slater, *et al.*, 2009)) (Figura III.3). Como se observa en la Figura III.3, ninguna de las cepas utilizadas pudo ser usada como patrón para ordenar los distintos *contigs* debido al número y longitud de los *gaps* y a la dispersión de los puntos. Al ampliar el ensayo a otras cepas de rizobios secuenciadas tampoco fue posible encontrar un genoma para usar como referencia. Del mismo modo, los *contigs* obtenidos de *R. sp.* LPU83 fueron comparados con diversos plásmidos de rizobios secuenciados, pero tampoco se encontraron indicios para completar los mapas físicos de los plásmidos de *R. sp.* LPU83. Es interesante destacar la gran dispersión que se puede observar en los gráficos de sintenia (Figura III.3). Estos resultados indican que esta cepa posee una organización genómica diferente con respecto a otros rizobios secuenciados. Más adelante profundizaremos en el análisis filogenético que nos ayudarán a clarificar la posición de los rizobios tipo Oregon.



**Figura III.3. Alineamientos de los *contigs* obtenidos de *R. sp.* LPU83 con diferentes genomas de referencia.** Los *contigs* de *Rhizobium sp.* LPU83 (eje x) fueron alineados a los cromosomas de organismos de referencia seleccionados (eje y) mediante el uso del programa MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004). Las configuraciones predeterminadas fueron utilizadas a excepción del “mínimo largo del *match*” (el valor predeterminado 20) que fue configurado en un valor de 30. Los puntos rojos indican un apareamiento en la hebra directa, los puntos azules en la hebra complementaria.

### **III.3. Pirosecuenciamiento del genoma de *R. sp. LPU83* por la metodología de pares de extremos cercanos y análisis de los resultados obtenidos.**

Debido a la dispersión de secuencias obtenidas se decidió realizar una segunda pirosecuenciación utilizando la tecnología de *Paired-End* (pares de extremos cercanos) de 3 Kpb de separación. Para ello se realizó la preparación de una biblioteca de ADN independiente compuesta por pequeños insertos que se encuentran, uno de otro, a una distancia (aproximada) conocida en la muestra original (en nuestro caso 3 Kpb), por lo que al realizar el secuenciamiento se obtienen lecturas que en la muestra original se encuentran, en promedio, a la distancia elegida. Cuando las dos lecturas se ubican en dos *contigs* diferentes, se obtiene el orden, orientación y distancia de los mismos en el genoma, quedando un *gap* entre ellos. Realizamos el secuenciamiento utilizando el sistema GS FLX (454 Life Sciences, Roche) y la tecnología “3 Kpb Paired-End Titanium”. El uso de un cuarto de placa de pirosecuenciamiento nos permitió obtener 199483 lecturas con aproximadamente 74,88 Mpb leídas. La distribución de los tamaños de las lecturas obtenidas fue similar a la observada en la Figura III.2, mostrando nuevamente que la calidad del secuenciamiento era adecuada. La información obtenida del “3 Kpb Paired-End” nos permite ordenar los *contigs* en *scaffolds*, pero estos *scaffolds* contienen *gaps* en su interior que deben ser secuenciados por el método de Sanger para obtener el mapa físico completo.

Luego de realizado el ensamblado de las lecturas (incluyendo la información del primer pirosecuenciamiento) se obtuvieron 344 *contigs* largos (>500 pb) con un tamaño total de 7542622 bases, lo que representa una cobertura cercana a 40 veces el genoma de *R. sp. LPU83* (Tabla III.1). De los 344 *contigs* largos que fueron obtenidos, 252 de ellos formaron un total de 56 *scaffolds*.

Si bien esta información contribuyó a conocer el orden de los *contigs* en los diferentes replicones de *R. sp. LPU83*, el alto número de *scaffolds* obtenido no permitió de manera práctica la finalización del genoma y nuevas etapas debieron ser consideradas en la finalización del mismo: A) la búsqueda de alternativas para unir los *scaffolds* correspondientes y completar los *gaps* entre ellos y, B) la determinación de las secuencias correspondientes a los *gaps* que existían dentro los *scaffolds*.

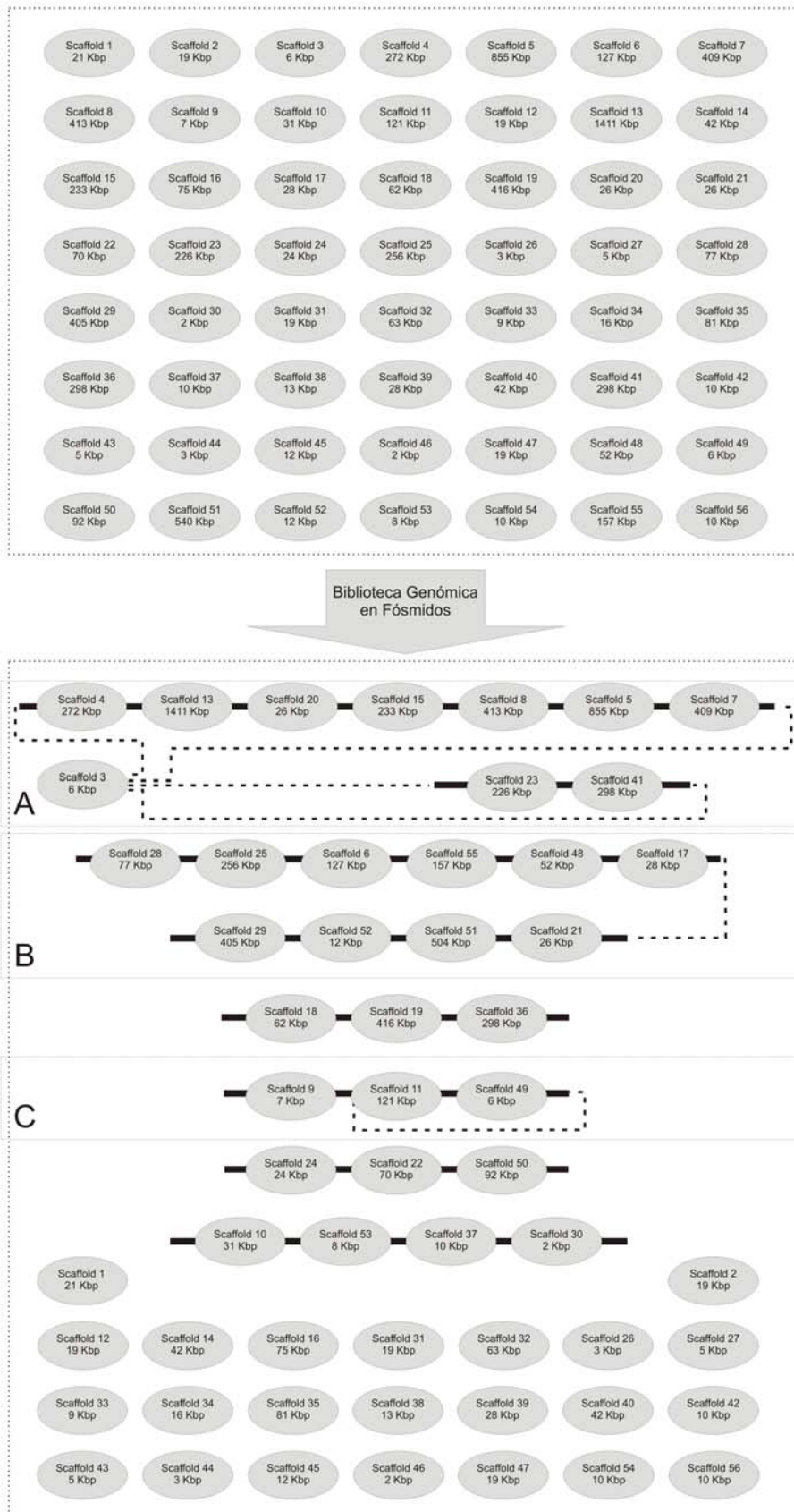
**Tabla III.1. Resultados obtenidos del pirosecuenciamiento.**

Características	Resultados Obtenidos	
	0,5 x “Titanium”	0,5 x “Titanium” + 0,25 x “Paired-End Titanium”
Número de lecturas	553100	876622
Número de bases	227730022	295688904
Número de <i>contigs</i> (>500 bps)	423	344
Número de bases ensambladas	7378608	7542622
Cobertura	~ 30	~ 40
Largo de la Lectura Promedio	413	394
<i>Scaffolds</i>	No corresponde	56

### III.4. Construcción de una biblioteca genómica en fósidos y utilización de la misma para determinar las estructuras genómicas de *R. sp. LPU83*.

Con el objetivo de completar la estructura física de los replicones se decidió realizar una biblioteca genómica de la cepa *R. sp. LPU83* en fósidos. A partir de la biblioteca obtenida hemos secuenciado 720 clones desde los extremos de los mismos. De este modo se identificó a qué sector del genoma correspondían los clones obtenidos. Si los extremos secuenciados correspondían a *scaffolds* diferentes, dicho clon nos permitía saber el orden de los mismos y, además, nos permitía completar *gaps* mediante la secuenciación por “caminata” sobre el fósido correspondiente. Si ambos extremos correspondían al mismo *scaffold*, sólo podríamos utilizarlos para el cierre de *gaps* dentro de un *scaffold*. De los 56 *scaffolds* obtenidos a partir de la información del “3 Kbp Paired-End”, mediante el uso de la información obtenida de la biblioteca genómica se pudieron ordenar los *scaffolds* como se observa en la Figura III.4. Pudimos ordenar 29 de los *scaffolds*, mientras que el resto (27) quedaron sin poder ser ubicados. Algunas de las uniones obtenidas debieron ser evaluadas y confirmadas por PCR y secuenciamiento del producto obtenido. A partir de esta información se comenzó a organizar y dilucidar el orden final de los *scaffolds* en los replicones de *R. sp. LPU83*.

En el recuadro A de la Figura III.4, puede observarse la unión de los *scaffolds* 4-13-20-15-8-5-7, 23-41 y 3, con un tamaño total aproximado de 4,1 Mpb (cromosoma). Debido a que el *scaffold* 3 se encontraba varias veces en el genoma, las uniones fueron confirmadas por PCR y secuenciación. Cabe aclarar que en dicho *scaffold* se encuentra el 16S rDNA.



**Figura III.4. Ordenamiento de los scaffolds con la información de la biblioteca genómica.** En el recuadro inferior se observan los scaffolds ordenados. Las uniones con líneas punteadas debieron ser confirmadas por PCR y secuenciamento.

De la misma manera, se pudo observar la unión de los *scaffolds* 28-25-6-55-48-17 y 21-51-52-29 (Figura III.4, recuadro B), con un tamaño estimado de 1,7 Mpb. Debido a este tamaño, estos *scaffolds* deberían pertenecer al plásmido de mayor tamaño, pLPU83c. Igualmente, no se podía descartar si algún otro *scaffold* podría ser parte de pLPU83c.

Como se puede ver en la Figura III.4 (recuadro C), los *scaffolds* 9-11-49 se encuentra unidos y a su vez aparece una unión entre sus extremos, constituyendo el plásmido más pequeño, pLPU83a, con un tamaño similar al esperado.

La mayoría de los *scaffolds* restantes deberían pertenecer al plásmido pLPU83b, pero no teníamos manera de determinar fehacientemente el orden de los *scaffolds*. Si bien quedaron algunos *scaffolds* ordenados, esto no fue suficiente para determinar la estructura final de dicho replicón.

### **III.5. Estrategias generales para la finalización de los replicones de *R. sp. LPU83*.**

Luego de ordenar los *scaffolds* a partir de la información obtenida de la biblioteca genómica, se redujo el número de *scaffolds* (de 56 a 29), pero todavía persistían dos inconvenientes: ordenar los *scaffolds* restantes y cerrar los *gaps*. Para completar el primer objetivo, se llevaron a cabo las siguientes estrategias experimentales:

*i PCR combinatoria y secuenciación:* Se diseñaron oligonucleótidos que se aparean a los extremos de cada uno de los *scaffolds* cuyo orden se deseaba determinar y se realizaron las PCR combinatorias, para lo cual cada uno de los cebadores se ensayó contra los cebadores de los extremos de los otros *scaffolds*. Aproximadamente 1100 combinaciones fueron evaluadas; en los casos que se obtuvieron productos, éstos fueron secuenciados.

*ii Caminata por integración genómica:* Esta estrategia consistió en la amplificación de un fragmento de entre 250 a 700 pb de los extremos de cada *scaffold* y el clonado de los productos obtenidos en el vector pK18mob (ver II.4.j). Con los vectores resultantes se realizaron una serie de integraciones sitio específicas. A partir de los mutantes obtenidos, se aisló ADN total, se digirió con enzimas de restricción, se religó y recuperó el vector con los fragmentos que flanqueaban a la región buscada. Luego se secuenciaron los extremos del ADN recuperado para determinar el *scaffold* adyacente a la secuencia utilizada para la inserción. A partir de esa información se secuenció el inserto en cuestión hasta obtener la secuencia faltante entre los *scaffolds* sucesivos.

Con estas dos estrategias se pudo determinar el orden de los *scaffolds*, pero todavía era necesario cubrir los *gaps* dentro de los *scaffolds*, para lo cual se realizaron los siguientes procedimientos:

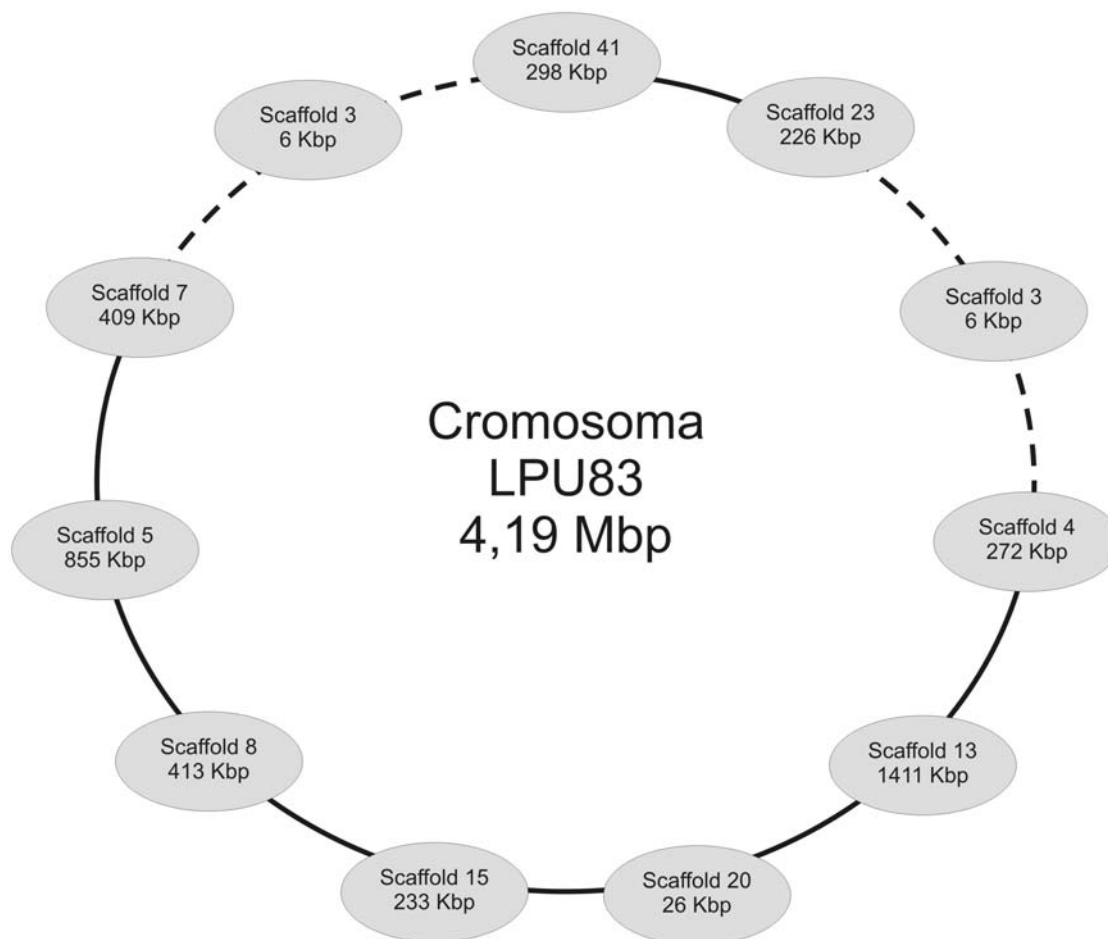
*iii* *Secuenciación por “caminata” sobre clones de la biblioteca genómica*: Para esta estrategia se sintetizaron cebadores flanqueando los *gaps* de regiones que se encontraran contenidas en la biblioteca y con ellos se procedió a secuenciar los clones en cuestión.

*iv* *Secuenciación de productos de PCR*: En los casos en los que los *gaps* no se encontraran cubiertos por clones de la biblioteca, pero se conocían los extremos flanqueantes de los mismos por la información del pirosecuenciamiento mediante la técnica de “3 Kbp Paired-End”, se diseñaron cebadores con los que se amplificó por PCR y se secuenció el producto resultante.

A continuación se presenta cómo cada una de las distintas estrategias se han utilizado para obtener la secuencia completa de cada uno de los replicones presentes en la cepa *R. sp.* LPU83.

### **III.5.a. Cromosoma.**

Este replicón estaba representado, luego de los dos pirosecuenciamientos y las lecturas de los extremos de los fósmidos, por 4 “estructuras” (el *scaffold* 3 se encontraba repetido) con un orden posible como el que se observar en la Figura III.4 (recuadro A). Las cuatro líneas discontinuas, indican las uniones de *scaffolds* que debieron ser confirmadas. Estas regiones fueron amplificadas por PCR combinando solamente los cebadores implicados. Luego de estas reacciones de PCR y la secuenciación de los productos obtenidos se obtuvo el orden completo de los *scaffolds* correspondientes al cromosoma (Figura III.5). Mediante las técnicas mencionadas en *iii* y *iv* se completaron las uniones entre los 80 *contigs* cromosomales (en este procedimiento apareció un nuevo *scaffold* 3, coincidiendo con la redundancia observada en el pirosecuenciamiento) y se obtuvo el replicón cromosomal de *R. sp.* LPU83 completo cuyo tamaño es de 4195305 pb, con un contenido GC de 60,19 %.

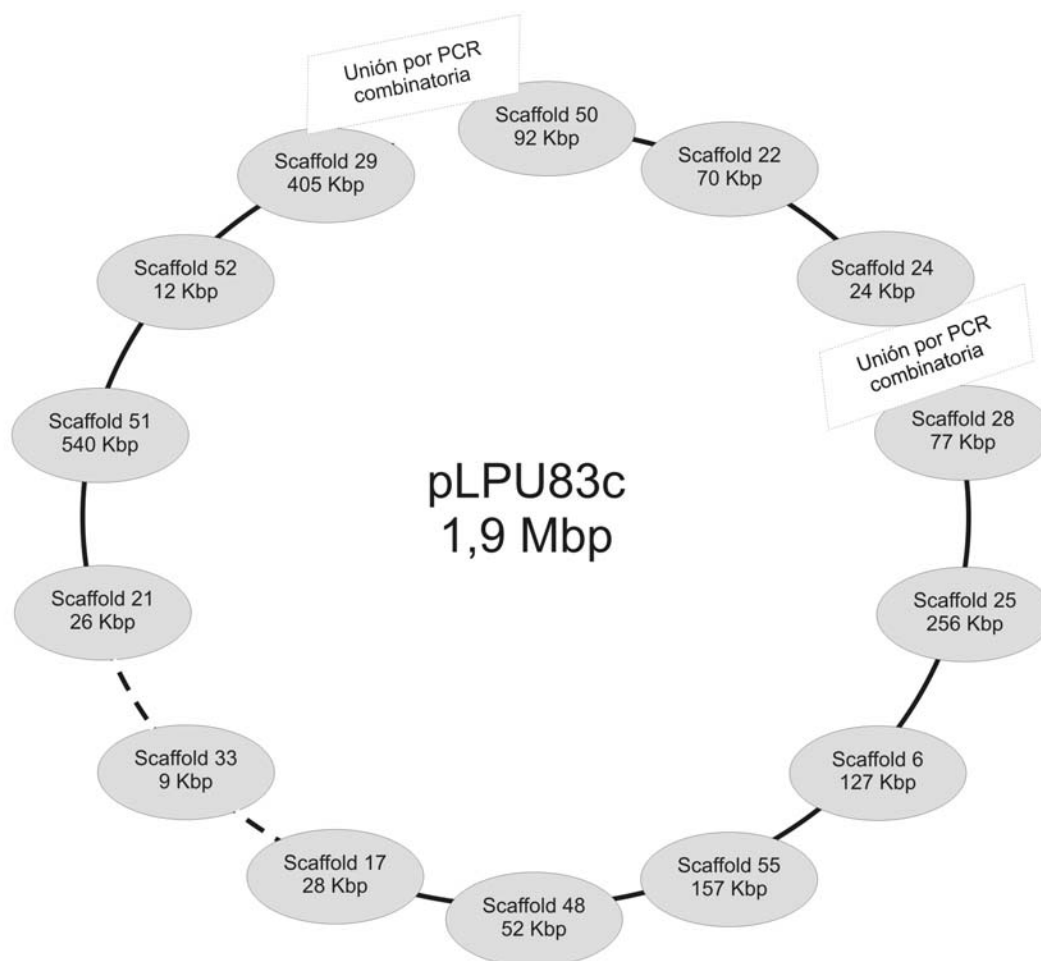


**Figura III.5. Esquema del orden de los *scaffolds* del cromosoma de *R. sp.* LPU83.** En el esquema se observa el orden definitivo de los *scaffolds*, con líneas continuas las uniones obtenidas de la biblioteca genómica y con líneas discontinuas las confirmadas por PCR y posterior secuenciación.

### III.5.b. Plásmido pLPU83c.

Como mencionamos previamente la unión de varios *scaffolds* (Figura III.4, recuadro B) dio como resultado un tamaño estimado de 1,7 Mpb. Estos *scaffolds* deberían pertenecer al plásmido pLPU83c. Así, comenzamos por confirmar la unión entre los *scaffolds* 17 y 21, al realizar dicho secuenciamiento encontramos que el *scaffold* 33 se encontraba entre ellos. Luego se realizaron las PCR combinatorias utilizando los extremos de los *scaffolds* 29 y 28 (ambos extremos de la unión de todos los *scaffolds*). Al realizar dichas PCR, obtuvimos como resultado la unión con los *scaffolds* 50-22-24, previamente unidos por la biblioteca genómica. De esta manera se completó el orden de los *scaffolds* en el pLPU83c (Figura III.6). Por último, se cerraron los *gaps* restantes (técnicas *iii* y *iv*) para obtener la estructura final de un tamaño de 1,92 Mpb y un contenido GC de 59,16 %.

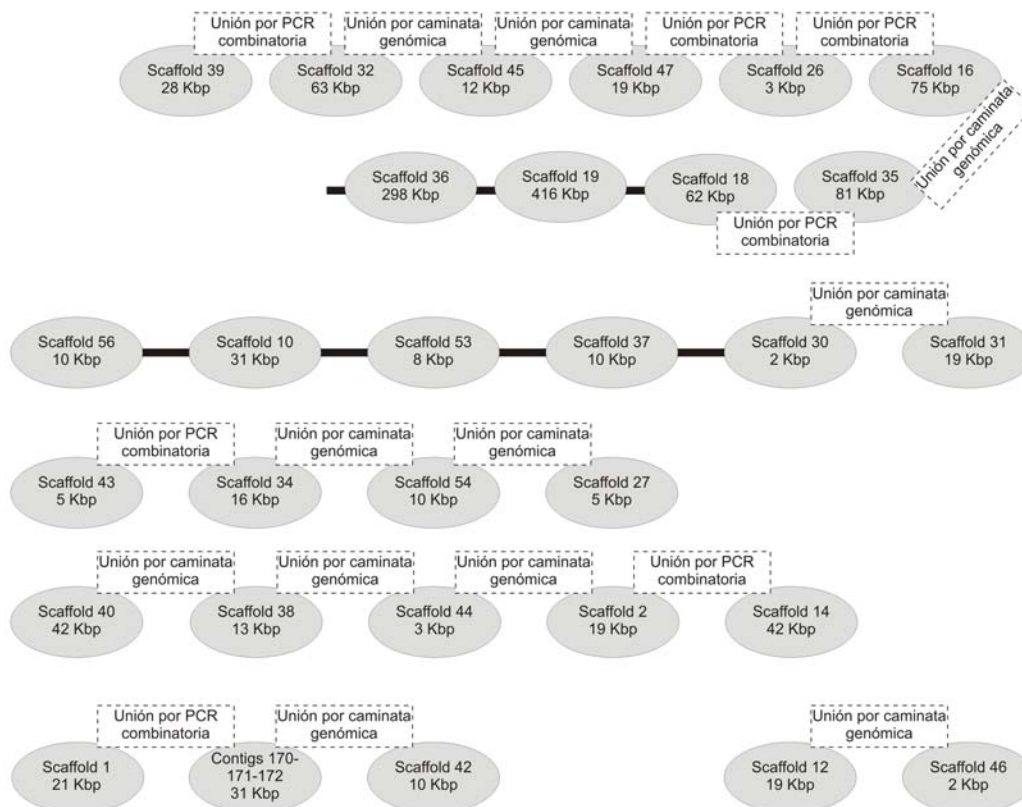




**Figura III.6. Orden de los scaffolds que conforman el plásmido pLPU83c.** En la figura se muestra el orden definitivo de los scaffolds en pLPU83c, con líneas continuas las uniones obtenidas de la biblioteca genómica, con líneas discontinuas las confirmadas por PCR y posterior secuenciación. Los recuadros indican las uniones por PCR combinatoria.

### III.5.c. Finalización del plásmido pLPU83b.

El plásmido pLPU83b, ha sido (en realidad es) el más complicado para finalizar debido al elevado número de scaffolds sin ordenar que posee. Para intentar finalizar este replicón hemos utilizado todas las técnicas mencionadas previamente sin lograr su finalización. Sin embargo, pudimos reducir el número de scaffolds de 23 a 6. Si bien no tenemos el orden definitivo, al conocer el resto de los replicones podemos estimar su tamaño en 1,3 Mpb. En la Figura III.7 se pueden observar la situación actual de los scaffold que conforman este plásmido.



**Figura III.7. Orden parcial de los scaffolds en pLPU83b.** Se observa el orden parcial de los scaffolds tras las estrategias mencionadas en el texto. Con líneas continuas las uniones obtenidas de la biblioteca genómica. Los recuadros indican las uniones por PCR combinatoria y posterior secuenciación o las uniones mediante la caminata por integración genómica.

#### III.5.d. Plásmido pLPU83a.

El plásmido más pequeño, pLPU83a fue conformado por 3 scaffolds (10 contigs), como se mencionó en la Figura III.4, recuadro C. Los gaps presentes fueron finalizados mediante las técnicas mencionadas en *iii* y *iv*. El tamaño final de este plásmido es de 151687 pb con un contenido GC de 59,65 %.

En el presente capítulo hemos descrito la obtención del genoma completo de la cepa *Rhizobium* sp. LPU83 por pirosecuenciamiento y los pasos posteriores para completar cada uno de los replicones. Sin embargo, obtener cada una de ellas no fue una tarea sencilla debido al elevado número de secuencias sobrerrepresentadas que dificultan el correcto ensamblado. Es por esto que el plásmido pLPU83b no ha sido finalizado, mientras que el secuenciamiento del cromosoma, el megaplásmido pLPU83c y el plásmido pLPU83a han sido concluidos exitosamente. En el siguiente capítulo estudiaremos el genoma de *R. sp.* LPU83 en profundidad mediante estudios bioinformáticos de genómica comparativa.

# **Capítulo IV**

## **Estudios de genómica comparativa de *Rhizobium* sp. LPU83**



## IV.1. *Introducción.*

La familia *Rhizobiaceae* de las  $\alpha$ -*proteobacterias* incluyen a microorganismos fijadores de nitrógeno en asociación con plantas, como también a patógenos de plantas del género *Agrobacterium*. Varios miembros de esta familia han sido completamente secuenciados, revelando estructuras genómicas con múltiples cromosomas, replicones lineales y plásmidos de varios tamaños (Kaneko, *et al.*, 2000; Galibert, *et al.*, 2001; Goodner, *et al.*, 2001; Kaneko, *et al.*, 2002; González, *et al.*, 2006; Young, *et al.*, 2006; Slater, *et al.*, 2009; Gonzalez, *et al.*, 2010; Reeve, *et al.*, 2010c; Reeve, *et al.*, 2010a; Reeve, *et al.*, 2010b; Schneiker-Bekel, *et al.*, 2011).

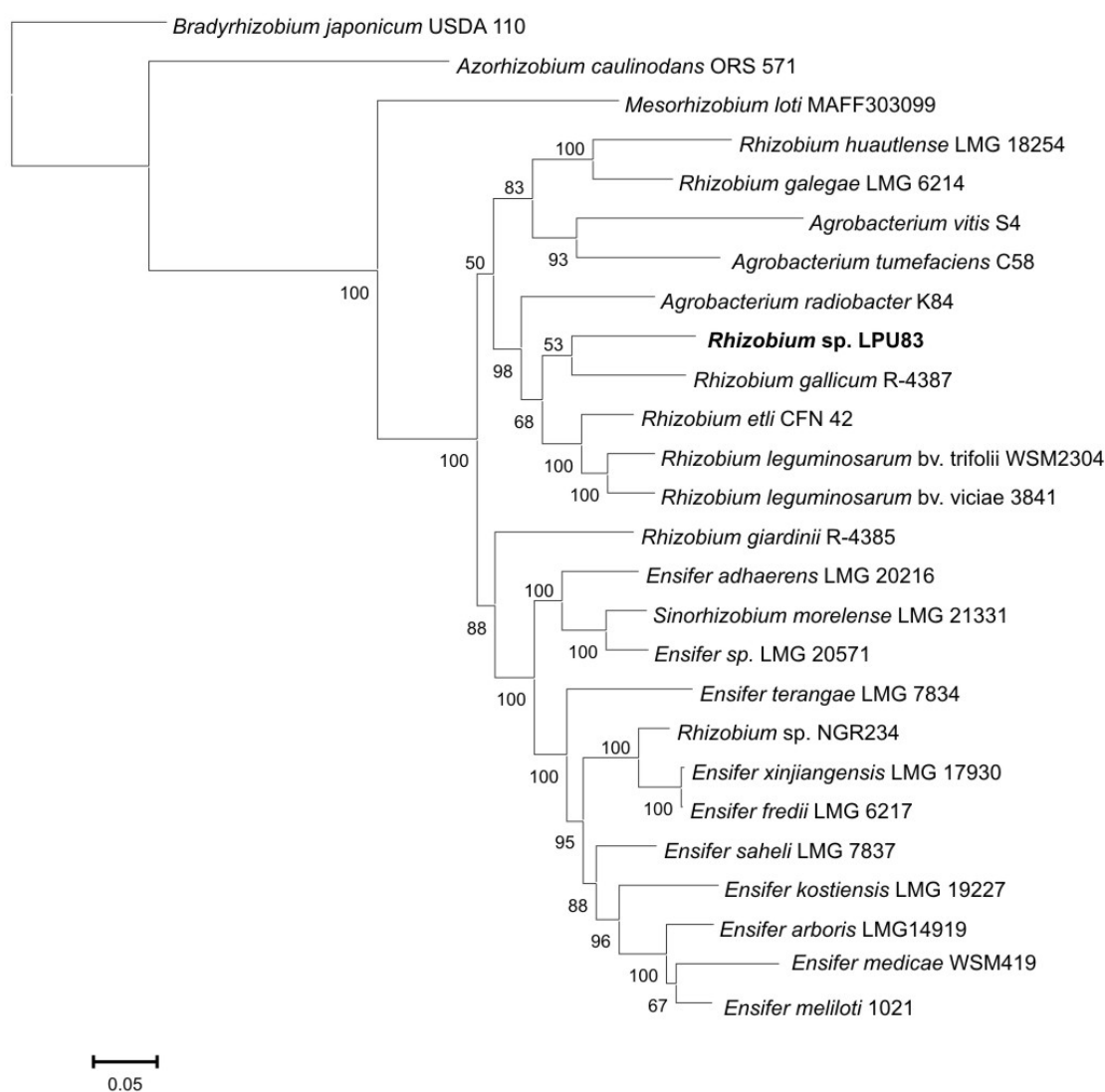
En el capítulo previo hemos descripto la obtención del genoma de la cepa *Rhizobium* sp. LPU83. En este capítulo analizaremos el genoma de dicho microorganismo y realizaremos genómica comparativa con otras bacterias para caracterizar el contenido genético que poseen los rizobios tipo Oregon.

## IV.2. *Estudios filogenéticos para evaluar las relaciones genómicas de R. sp. LPU83.*

Como hemos mencionado previamente (Capítulo I, sección 6.d), el análisis del 16S rADN de los rizobios tipo Oregon evidenció una cercanía a *Rhizobium etli* (Eardly, *et al.*, 1992). Recientemente, Bromfield *et al.* (2010) han descripto otros genes de *funciones basales (housekeeping)* de los rizobios tipo Oregon que los ubican relacionados a *R. etli* y también a *Rhizobium leguminosarum*, entre otros. Diferentes estudios han sido realizados sobre los genes simbióticos, demostrando una notable sintenia entre los genes de nodulación de los rizobios tipo Oregon y de *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae*. Sin embargo, al analizar la región intergénica entre *nodE* y *nodG*, un estudio específico de los rizobios noduladores de alfalfa, se encuentra una alta similitud con *Rhizobium mongolense* (ver Capítulo V sección V.4).

Martens *et al.* (2007, 2008) han descripto un grupo de siete genes adecuados para realizar un análisis filogenético robusto en rizobios. Así, concatenando los genes *dnaK*, *glnA*, *gltA*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, y *thrC*, pudieron estudiar los datos aplicando los métodos del “Vecino más cercano” (NJ, *Neighbor-Joining*), “Máxima Parsimonia” (MP, *Maximum-Parsimony*) y “Máxima Verosimilitud” (ML, *Maximum-Likelihood*). En cada caso, la topología de los árboles resultó similar (Martens, *et al.*, 2007, 2008). Con esta información, y como una primera aproximación para ubicar la posición filogenética de los rizobios tipo

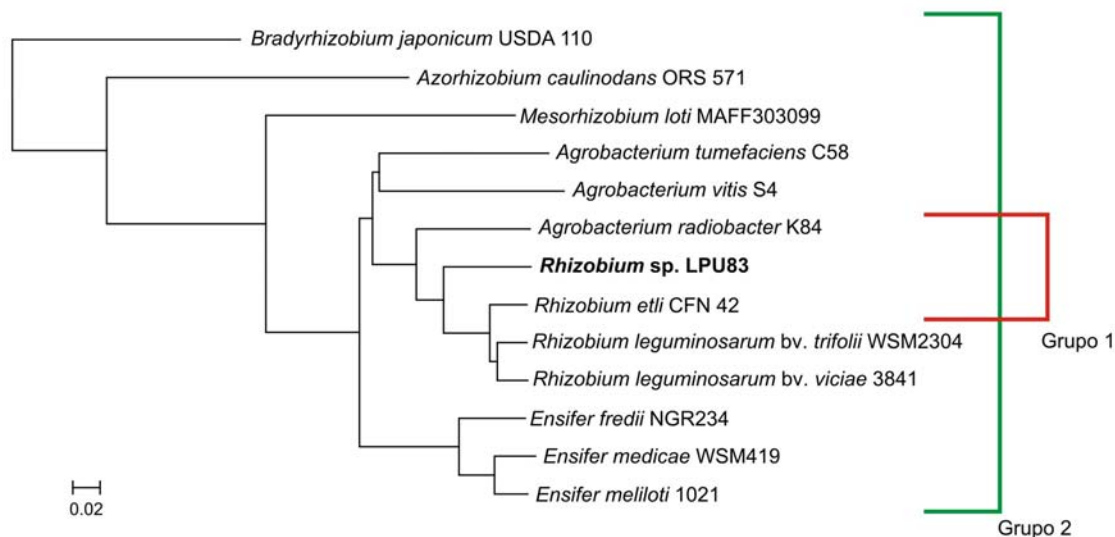
Oregon, buscamos dichos genes en el genoma de *R. sp.* LPU83 y en numerosos miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Con cada gen se realizó, en primer lugar, árboles filogenéticos individuales por los métodos de NJ, MP y ML, encontrando congruencia en los resultados. Para realizar el análisis filogenético de manera extensiva, dichos genes fueron concatenados y se realizaron los análisis por los métodos de NJ, MP y ML del nuevo conjunto de datos. Como se puede observar en la Figura IV.1, *R. sp.* LPU83 se encuentra próxima a *R. etli* y *R. leguminosarum*, como había sido observado previamente.



**Figura IV.1. Análisis filogenético mediante el uso de siete genes concatenados.** Reconstrucción filogenética a través del uso de los genes *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *dnaK*, *glnA*, *gltA* y *thrC* concatenados. El análisis de la figura fue realizado por el método de Máxima Verosimilitud. Los valores de *bootstrap* mayores a 50 se encuentran indicados en los nodos. La barra indica 0,05 sustituciones/sitio.

Para profundizar este análisis, se realizó un análisis filogenético concatenando todos los genes compartidos (*core genome*) entre los cromosomas de otros miembros de la familia

*Rhizobiaceae* y *R. sp. LPU83* (Figura IV.2). Este análisis resultó congruente con el análisis previo de siete genes, validando la utilización de dichos genes como marcadores para determinar la posición filogenética de esta familia de bacterias. Es interesante destacar que en este árbol *R. sp. LPU83* parece ser precursora de este linaje. Asimismo, se definieron dos grupos para posteriores análisis.



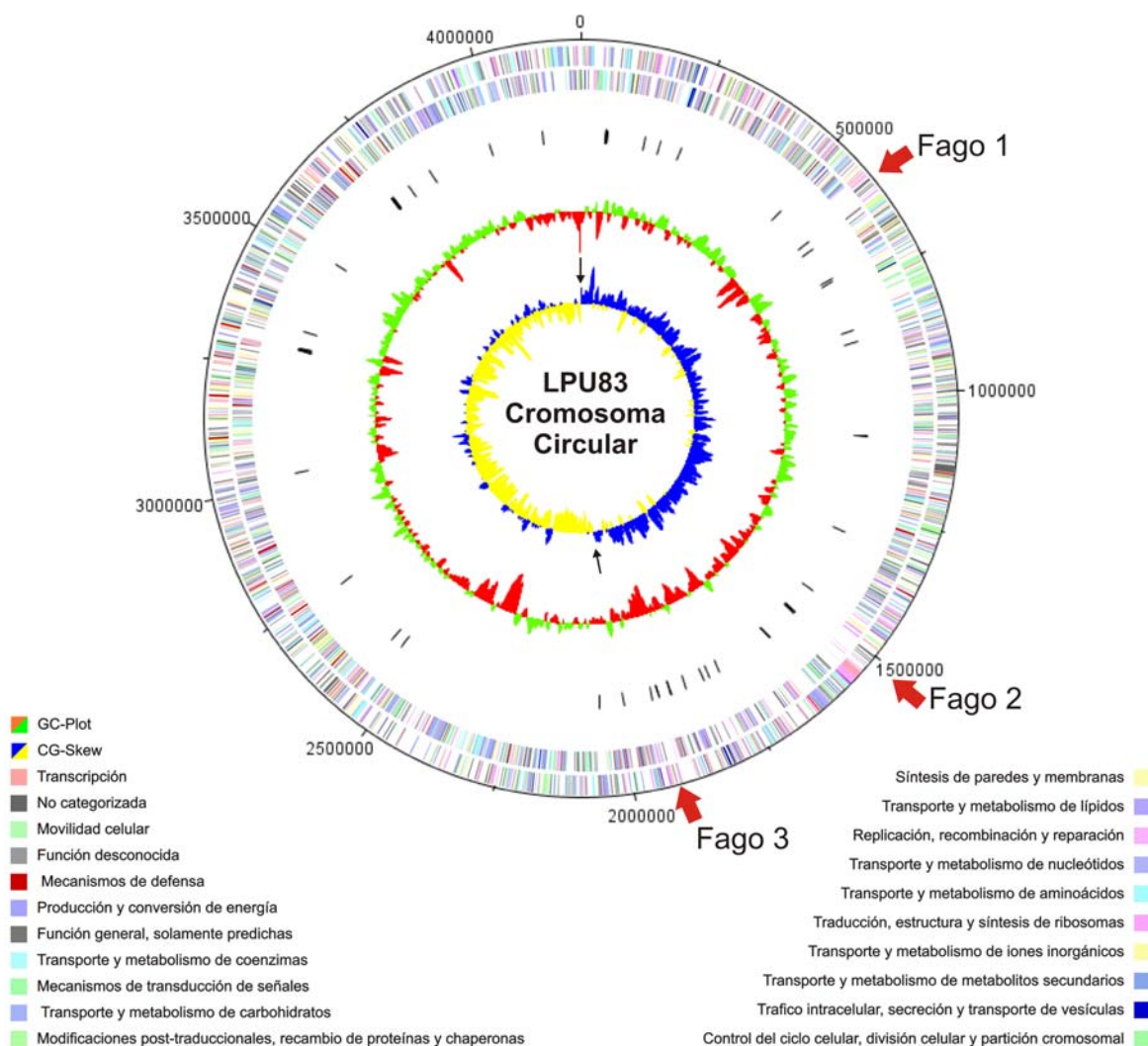
**Figura IV.2. Análisis filogenético de rizobios completamente secuenciados.** El árbol filogenético fue realizado con los genes compartidos entre los rizobios mencionados (*core genome*), los cuales fueron concatenados y alineados. El análisis se realizó por el método del “Vecino más cercano” (NJ, Neighbor-Joining). La barra indica 0,02 sustituciones/sitio.

### IV.3. Características generales del genoma de *Rhizobium sp. LPU83*.

La cepa *R. sp. LPU83* contiene cuatro replicones con un tamaño total de 7,63 Mpb con un contenido GC de 59,64 %. El cromosoma de la misma posee un tamaño de 4195305 pb, que codifica para 4150 marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) (densidad genética de 0,99 genes por Kpb) y un contenido GC de 60,19 %. El plásmido pLPU83c, de 1,92 Mpb, codifica para 2008 ORFs (densidad genética de 1,05 genes por Kpb) y tiene un contenido GC menor al del cromosoma, de 59,16 %. Los *scaffolds* del plásmido simbiótico, pLPU83b, tienen un contenido GC de 58,64 %; dicho replicón tiene un tamaño aproximado de 1,37 Mpb y codifica para 1567 ORFs, revelando una densidad genética levemente superior a las previamente mencionadas (1,14 genes por Kpb). Por último, el plásmido pLPU83a, de 151,68 Kpb, tiene un contenido GC de 59,65 % y codifica para 174 ORFs, con una densidad genética similar al pLPU83b (1,14 genes por Kpb) (Tabla IV.1). En las Figuras IV.3, IV.4 y IV.5 pueden observarse los esquemas del cromosoma circular, pLPU83c y pLPU83a, respectivamente.

En el genoma de *R. sp.* LPU83 se encuentran tres operones de ARNr, todos ubicados en el cromosoma, y 52 ARNt, de los cuales solamente uno no se encuentra en el cromosoma y se halla en el plásmido pLPU83c. Al analizar el diagrama del cromosoma (Figura IV.3) se observan regiones donde el contenido GC está por debajo del promedio, tres de esas regiones coinciden con la presencia de fagos integrados en *R. sp.* LPU83 (Figura IV.3, señalado con flechas rojas).

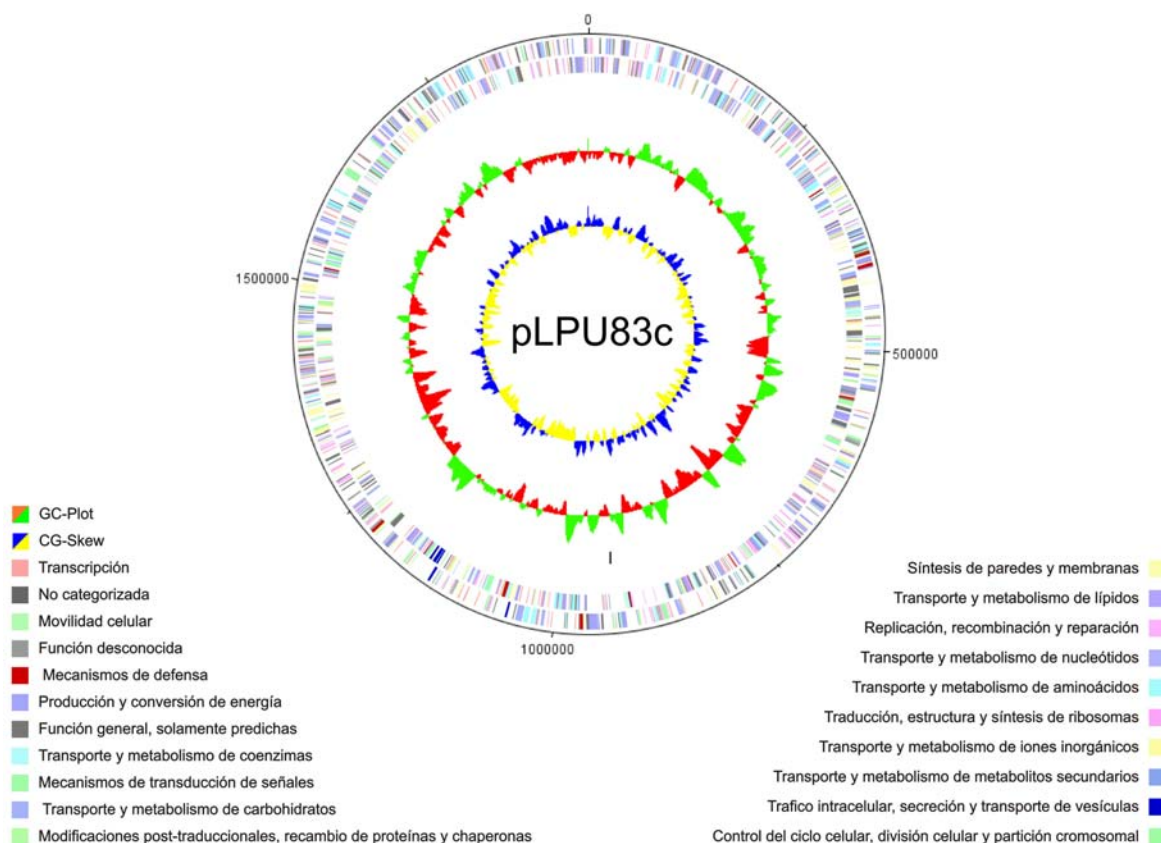
Un análisis comúnmente realizado en los genomas bacterianos es analizar la diferencia de contenido de G entre las dos hebras (*GC-skew*). En general, al analizar la composición de bases de una de las hebras de ADN en los cromosomas se observa una distribución no aleatoria, donde suelen acumularse G en la hebra líder de la replicación. El *GC-skew* se



**Figura IV.3. Esquema del cromosoma de *R. sp.* LPU83.** El cromosoma de *R. sp.* LPU83 tiene un tamaño de 4,19 Mpb. Referencias de los círculos del exterior al interior: ORFs en la hebra directa (5' a 3' en sentido horario); ORFs en la hebra complementaria; distribución de ARNt (barras negras); esquema del contenido GC; *GC-skew*. Los ORFs se encuentran coloreados de acuerdo a su COGs y según las referencias en la figura. Las flechas rojas indican el lugar de los fagos integrados. Las flechas negras indican los supuestos sitios de inicio y terminación de la replicación.



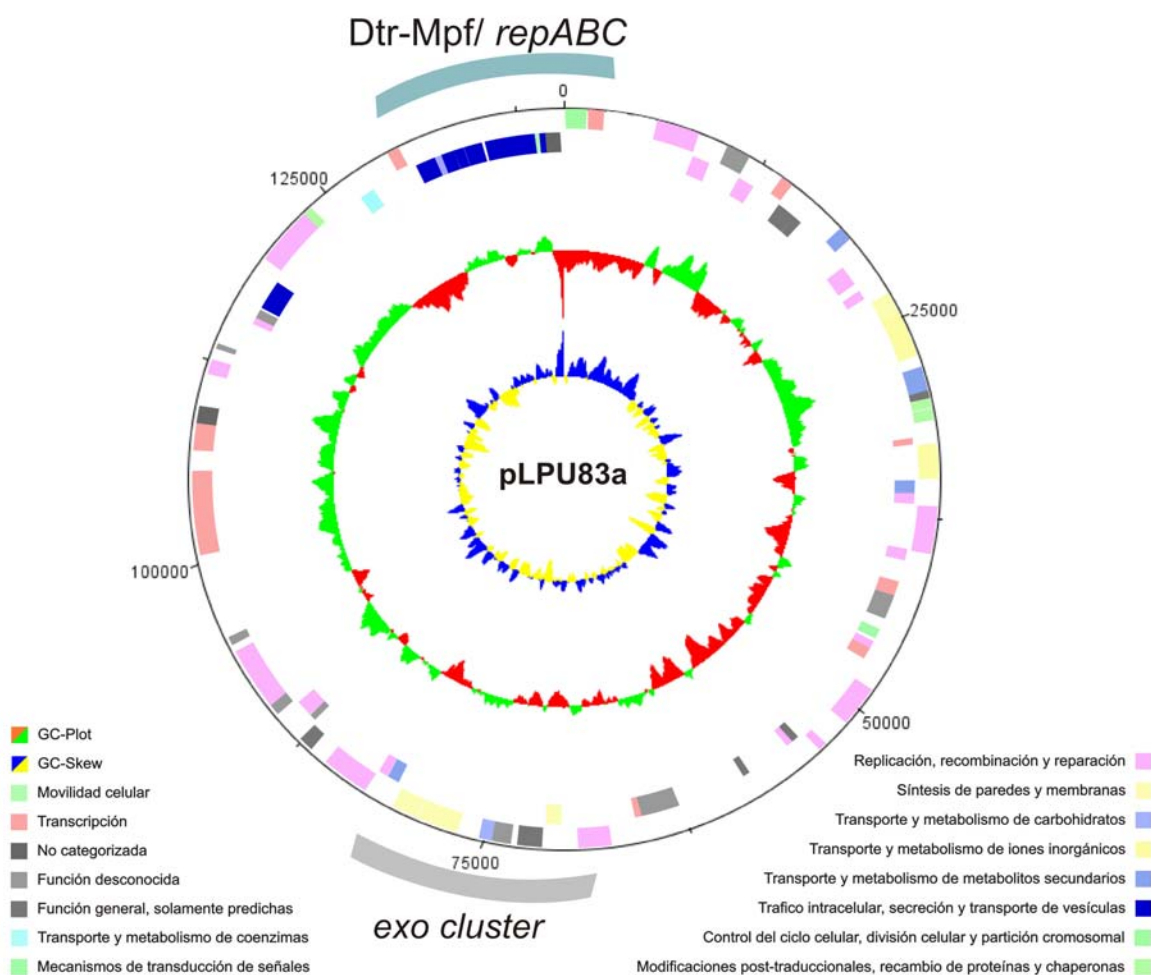
calcula como  $(G-C)/(G+C)$  de una cantidad de nucleótidos (ventana) de la hebra estudiada, y proporciona un porcentaje del exceso de G sobre C. Este cálculo se realiza a lo largo de una de las hebras de la molécula de ADN. Es por esto que en la región donde la hebra líder de la replicación es la hebra estudiada, la cantidad de G suele ser mayor que la de C, y así el valor de *GC-skew* es positivo, mientras que cuando la hebra estudiada es la hebra retrasada, se acumulan C y el valor de *GC-skew* se vuelve negativo. El *GC-skew* permite determinar rápidamente cuáles serían los sitios de origen y terminación de la replicación en los cromosomas bacterianos, mientras que este hecho no prevalece en arqueas. El *GC-skew* se encuentra sujeto a cambios que tienden a la acumulación de G en la hebra líder con el paso del tiempo, por lo que rearrreglos recientes en la estructura del ADN pueden ser detectados de acuerdo a los patrones obtenidos (Lobry, 1996; Bentley & Parkhill, 2004). En las Figuras IV.3, IV.4 y IV.5 se observa el *GC-skew* para los replicones de la cepa *R. sp.* LPU83. En el cromosoma se pueden observar los supuestos sitios de inicio y terminación de la replicación, donde cambia en la representación el signo de este indicador (sitios indicados



**Figura IV.4. Mapa físico del megaplásmido pLPU83c.** El plásmido pLPU83c tiene un tamaño de 1,92 Mpb. Referencias de los círculos del exterior al interior: ORFs en la hebra directa (5' a 3' en sentido horario); ORFs en la hebra complementaria; distribución de ARNt (barras negras); esquema del contenido GC; *GC-skew*. Los ORFs se encuentran coloreados de acuerdo a su COGs y según las referencias en la figura.

con flechas negras). Los genes *parAB-gidB* se ubican próximos al sitio de inicio de la replicación indicados por el análisis *GC-skew* en *R. sp.* LPU83. Si miramos con detenimiento el sitio de terminación de la replicación se puede observar que no se encuentra situado simétricamente, por lo cual podríamos estar en presencia de algún tipo de rearrreglo reciente. De manera similar a lo descrito en los plásmidos de *R. etli* CFN42 (González, et al., 2006), en los plásmidos de *R. sp.* LPU83 no se detecta un *GC-skew* considerable.

Se ha evidenciado que en los replicones de una misma cepa pueden existir grandes duplicaciones de secuencias (Stiens, et al., 2006). Con el fin de determinar si la cepa *R. sp.* LPU83 presentaba este tipo de rearrreglos evaluamos la presencia de grandes secuencias repetitivas en el genoma. Luego de realizar dicho análisis no hemos logrado identificar tales repeticiones entre los replicones, y sólo hemos detectado pequeñas regiones menores a 4 Kpb, entre ellas, algunas transposasas.



**Figura IV.5. Esquema del plásmido pLPU83a.** El plásmido pLPU83a tiene un tamaño de 151,68 Kpb. Referencias de los círculos del exterior al interior: ORFs en la hebra directa (5' a 3' en sentido horario); ORFs en la hebra complementaria; Esquema del contenido GC; *GC-skew*. Los ORFs se encuentran coloreados de acuerdo a su COGs y según las referencias en la figura. Se detalla la posición de los genes involucrados en la transferencia y replicación plasmídica como la posición del *cluster* de genes *exo*.

**Tabla IV.1. Análisis general del genoma de *R. sp.* LPU83.**

	pLPU83a	pLPU83b	pLPU83c	Cromosoma	Genoma
Tamaño (Mpb)	0,15	1,37	1,92	4,19	7,63
Contenido GC (%)	59,65	58,64	59,16	60,19	59,64
Operones ARNr	-	-	-	3	3
ARNt	-	-	1	51	52
Total de secuencias codificantes	174	1567	2008	4150	7899
Secuencias codificantes con clases funcionales	93	966	1396	3186	5641
Secuencias codificantes hipotéticas	81	601	612	964	2258
Densidad genética (genes/Kpb)	1,15	1,14	1,05	0,99	1,04

#### **IV.3.a. Funciones asociadas a los diferentes replicones. Distribución de grupos de *clusters* ortólogos.**

Para entender las funciones asociadas al conjunto genético de cada replicón, las proteínas predichas fueron clasificadas en diferentes grupos de *clusters* ortólogos (COGs, *Clusters of Orthologous Groups*) de acuerdo a Tatusov *et al.*(1997). De las 7899 proteínas encontradas, nos fue posible asignarle una categoría funcional a 5641 (Tabla IV.1). La distribución de los COGs en *R. sp.* LPU83 puede observarse en la Tabla IV.2. Es interesante destacar el elevado número de proteínas clasificadas en el COG de replicación, recombinación y reparación en el plásmido pLPU83b. Dentro de este grupo funcional se encuentran incluidas las transposasas y derivados de ellas. Las secuencias de las mismas, por su alto número de copias, dificultan el ensamblado de los genomas. En los genomas de otros rizobios secuenciados este grupo funcional no se encuentra tan sobrerrepresentado (Tabla IV.3). Por otro lado, los COGs involucrados en el metabolismo y transporte de carbohidratos, el metabolismo y transporte de aminoácidos y los genes involucrados en la transcripción, también se encuentran sobrerrepresentados como en otros rizobios (Galibert, *et al.*, 2001; González, *et al.*, 2006). De la misma manera, los genes involucrados en el transporte y metabolismo de nucleótidos, en la traducción, estructura y síntesis de ribosomas se encuentran principalmente en el cromosoma (Tabla IV.3).

**Tabla IV.2. Distribución de COGs en *R. sp.* LPU83.**

	pLPU83a	pLPU83b	pLPU83c	Cromosoma	Genoma
<b><i>Procesamiento y almacenamiento de la información</i></b>					
Traducción, estructura y síntesis de ribosomas	-	10	8	163	181
Transcripción	8	109	185	306	605
Replicación, recombinación y reparación	35	251	114	196	579
<b><i>Señalización y procesos celulares</i></b>					
Control del ciclo celular, división celular y partición cromosomal	1	6	7	23	37
Mecanismos de defensa	-	13	13	42	67
Mecanismos de transducción de señales	1	37	80	175	292
Síntesis de paredes y membranas	7	31	91	194	321
Movilidad celular	1	3	5	62	71
Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas	11	12	14	59	96
Modificaciones post-traduccionales, recambio de proteínas y chaperonas	3	13	33	138	187
<b><i>Metabolismo</i></b>					
Producción y conversión de Energía	1	61	109	182	348
Transporte y metabolismo de carbohidratos	1	100	206	270	575
Transporte y metabolismo de aminoácidos	-	111	184	376	669
Transporte y metabolismo de nucleótidos	-	6	6	80	92
Transporte y metabolismo de coenzimas	-	18	41	118	176
Transporte y metabolismo de lípidos	-	39	64	133	234
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	3	63	77	189	331
Transporte y metabolismo de metabolitos secundarios	5	49	65	92	207
<b><i>Pobremente Caracterizados</i></b>					
Función general, solamente predichas	13	140	242	504	895
Función desconocida	10	54	116	367	546

**Tabla IV.3. Comparación de los COGs sobrerrepresentados en los rizobios**

COG	<i>E. meliloti</i> 1021 <sup>1</sup>	<i>R. etli</i> CFN42 <sup>2</sup>	<i>R. sp.</i> LPU83
Metabolismo y transporte de carbohidratos	605	554	575
Metabolismo y transporte de aminoácidos	725	571	669
Replicación, recombinación y reparación	314	230	579
Transcripción	534	479	605

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/cogenome.cgi?g=382>

<sup>2</sup> <http://www.pnas.org/content/suppl/2006/02/22/0508502103.DC1/08502Table4.pdf>

#### IV.3.b. Estudios de genómica comparativa.

Para detectar eventos de delección o inversión en el genoma de las cepas tipo Oregon, hemos comparado las secuencias de los replicones de la cepa *R. sp.* LPU83 con los genomas de otros rizobios utilizando varios programas, como Blastn (Altschul, *et al.*, 1990), MUMmer (Kurtz, *et al.*, 2004) y ACT (Artemis Comparison Tool) (Carver, *et al.*, 2005). Los rearrreglos genómicos en rizobios han sido descritos entre distintas cepas de *R. etli* (Crossman, *et al.*, 2008) y evidencian la dinámica evolutiva de los genomas.

En primer lugar se realizó una búsqueda mediante Blastn de los replicones que presentaban más similitud. Así, cada uno de los replicones de *R. sp.* LPU83 fue evaluado en las bases de datos públicas encontrando que el cromosoma de *R. sp.* LPU83 presentaba una similitud significativa con los cromosomas de otros miembros de la familia *Rhizobiaceae*, por lo que para su posterior análisis y comparación elegimos los dos más cercanamente relacionados por los estudios filogenéticos previamente descritos, *R. etli* CFN42 y *Agrobacterium radiobacter* K84.

Al evaluar los plásmidos, los resultados fueron más dispares, sin haber conseguido encontrar grandes similitudes con otros replicones. El plásmido pLPU83c, posee una región de aproximadamente 10 Kpb con similitud significativa con los plásmidos pRLG202 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304, pRL11 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841y p42e de *R. etli* CFN42. El plásmido simbiótico pLPU83b tampoco presenta regiones con elevada similitud, a excepción del *cluster* de genes de nodulación y los genes de FBN con los presentes en *E. meliloti* y *E. medicae*, los cuales se analizarán en el Capítulo V (ver sección V.2). Por último, el análisis del plásmido críptico pLPU83a, mostró que posee regiones de alta similitud con los plásmidos pRL8 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y pSmeSM11b de *E.*

*meliloti* SM11 y además lleva un *cluster* de genes posiblemente involucrados en la síntesis de exopolisacáridos similar al de *E. meliloti*.

#### IV.3.b.i. *Evaluación de la estructura del cromosoma de R. sp. LPU83.*

El análisis del cromosoma de *R. sp. LPU83* comparado a los cromosomas de las bacterias más relacionadas filogenéticamente nos permitió observar una alta colinealidad en los mismos, sin embargo, se pueden observar cuatro pequeñas inversiones y una gran inversión al medio de dicha molécula (Figura IV.6). Esta última inversión se encuentra ubicada en la zona de terminación de la replicación. Al comparar estos resultados con el gráfico de *GC-skew* del cromosoma de *R. sp. LPU83*, puede observarse que la terminación de la replicación no se encuentra a la mitad de la molécula, sino que se encuentra desplazada levemente, lo que evidenciaría que esta inversión ha sido reciente.

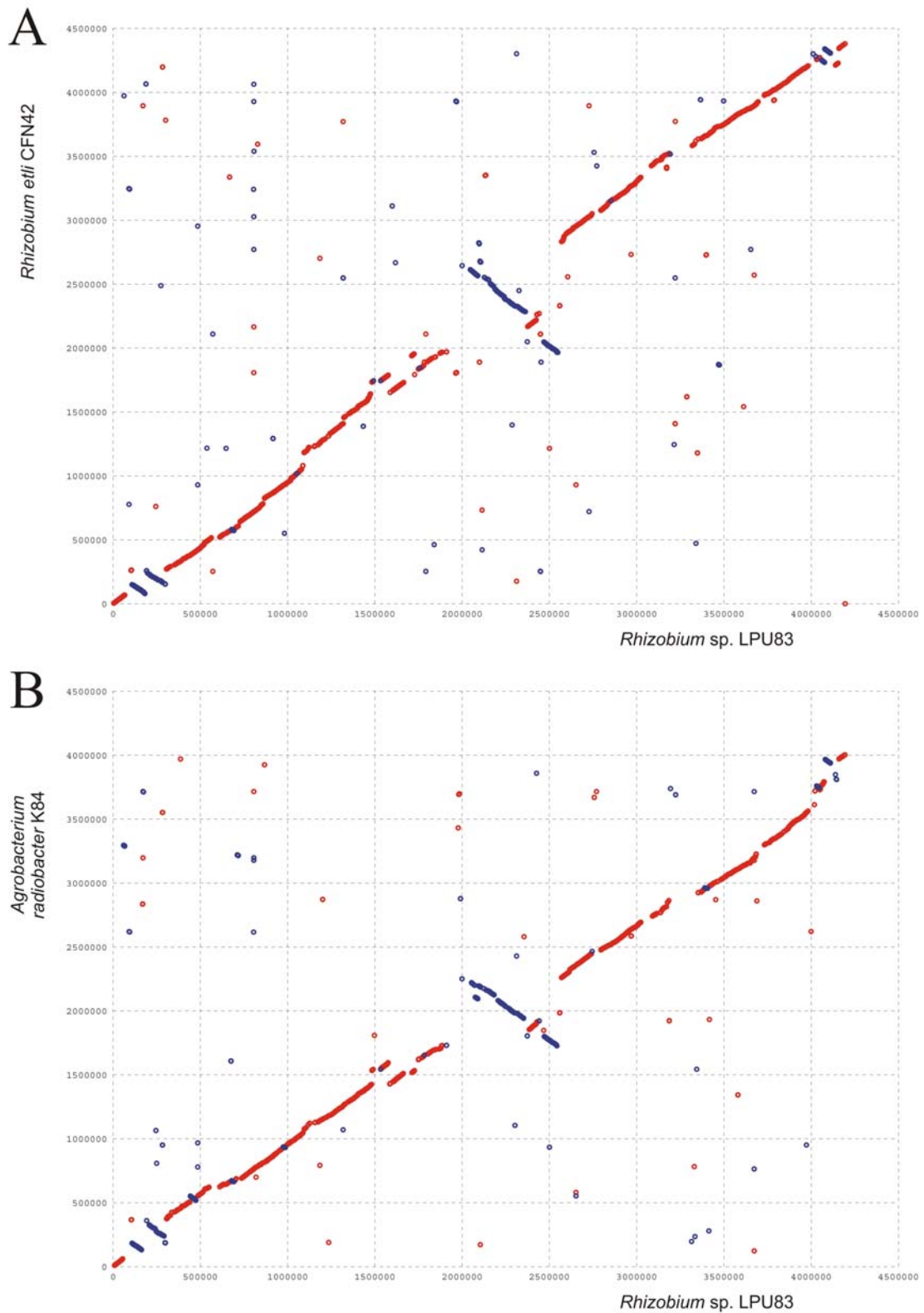
#### IV.3.b.ii. *Evaluación de las zonas conservadas del plásmido de pLPU83a.*

Como mencionamos con anterioridad el plásmido pLPU83a posee una región con elevada similitud con los plásmidos crípticos pSmeSM11b de *E. meliloti* SM11 o con pRL8 of *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Las regiones conservadas entre estos plásmidos pueden observarse en la Figura IV.7. Las mismas se corresponden con los genes involucrados en la transferencia conjugativa y la replicación. El análisis de las mismas se presenta en el Capítulo VI (ver sección VI.3).

### IV.3.c. **Análisis comparativo del contenido genético de los rizobios tipo Oregon.**

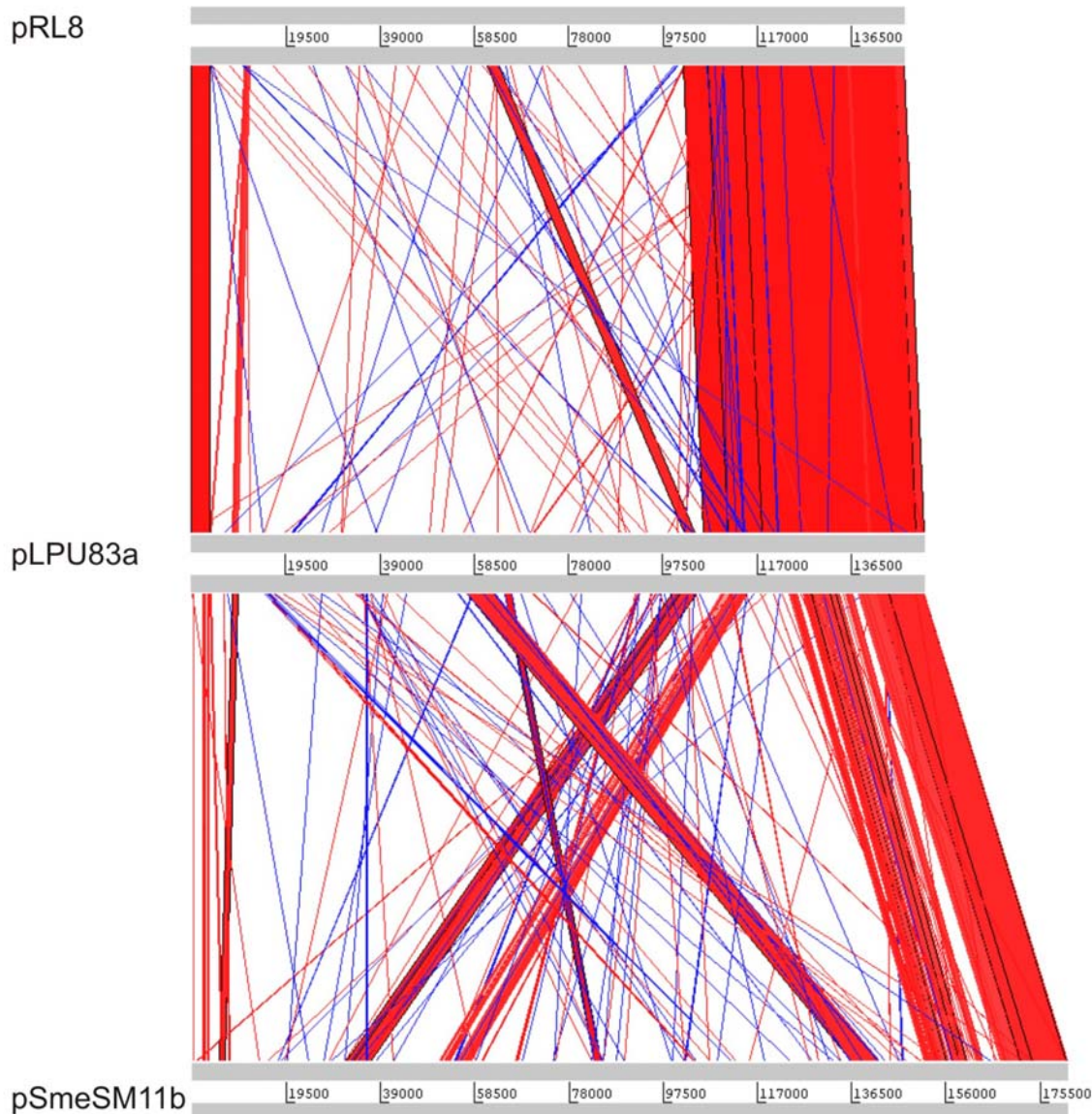
Recientemente se ha definido el *pan genome* (pan, de la palabra griega *παν*, que significa todo) como todos los genes presentes en un cierto grupo de bacterias. El *pan genome* consiste en el *core genome* (los genes compartidos en todas las cepas bacterianas evaluadas) y el genoma prescindible (los genes ausentes en una o más de las cepas) (Tettelin, *et al.*, 2005). Dentro del genoma prescindible se encuentran los genes “únicos” (*singletons*), genes que se encuentran solamente en una bacteria (Blom, *et al.*, 2009). Utilizando estas definiciones y las herramientas de genómica comparativa implementadas por el programa EDGAR (Blom, *et al.*, 2009), evaluamos el contenido genético de la cepa *R. sp. LPU83* por medio de la búsqueda de genes ortólogos en los rizobios relacionados (definidos previamente como grupos 1 y 2 en la Figura IV.2).

En primer lugar evaluamos todos los genes presentes en *R. sp. LPU83* contra todos los genes presentes en los rizobios de los grupos 1 y 2. El *pan genome* del grupo 2 se eleva a



**Figura IV.6. Evaluación de la sintenía genética del cromosoma de *Rhizobium* sp. LPU83.** El cromosoma de *Rhizobium* sp. LPU83 fue comparado con el cromosoma de (A) *R. etli* CFN42 y (B) *A. radiobacter* K84 mediante el uso del programa MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004). Para dicho programa se utilizaron los parámetros predeterminados por el mismo a excepción del mínimo largo del *match*, cuyo valor fue de 30 (el predeterminado es 20). Los puntos rojos representan regiones conservadas en el mismo sentido, los puntos azules en la hebra complementaria.



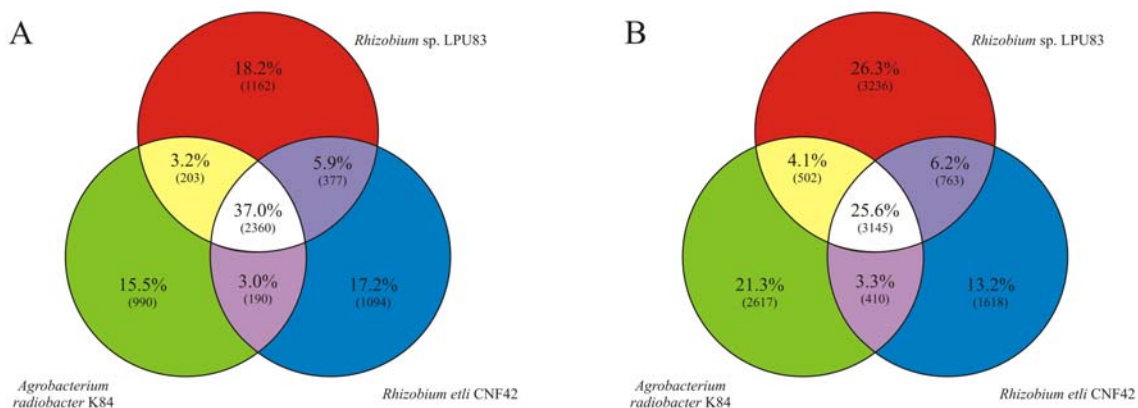


**Figura IV.7. Genética comparativa del plásmido pLPU83a.** Un elevado número de genes fueron encontrados relacionados a pRL8 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y a pSmeSM11b de *E. meliloti* SM11. Las líneas rojas representan regiones conservadas en el mismo sentido, las azules en la hebra complementaria. Las regiones altamente conservadas poseen los genes involucrados en la transferencia conjugativa.

33668 genes, de los cuales 1539 genes (4,6 %) se encuentran únicamente en *R. sp.* LPU83, los denominados genes “únicos” (*singletons*), mientras que 918 genes (2,7 %) conforman el *core genome* (los genes presentes en todos los rizobios comparados). Por otro lado comparamos el contenido genético del cromosoma de *R. sp.* LPU83 contra los cromosomas de los rizobios del grupo 1 (*R. etli* CFN42 y *A. radiobacter* K84) (Figura IV.8.A). En este análisis, de los 6376 genes que conforman el *pan genome* de *R. sp.* LPU83, *R. etli* CFN42 y *A. radiobacter* K84, un 37 % (2360 genes) conforman el *core genome*, mientras que los genes que se encuentra únicamente en cada una de las bacterias evaluadas varían entre el 15



al 18 %. También puede observarse que *R. sp.* LPU83 comparte un número mayor de genes con *R. etli* CFN42 que con *A. radiobacter* K84 (Figura IV.8.A). Si ampliamos este análisis al genoma completo de dichas bacterias, podemos observar que los genes que aportan los plásmidos de *R. sp.* LPU83 y *A. radiobacter* K84 aumentan el número de genes “únicos” (*singletons*) de manera considerable. Esto significa que no poseen ortólogos en las otras cepas, mientras que genes ortólogos a los genes de *R. etli* CFN42 se encuentran presentes en *R. sp.* LPU83 y *A. radiobacter* K84.



**Figura IV.8. Comparación del contenido genético mediante diagramas de Venn.** A partir de los genomas de las cepas *R. sp.* LPU83, *A. radiobacter* K84 y *R. etli* CFN42 se calcularon los genes ortólogos entre los cromosomas (A), y el genoma completo (B).

#### IV.4. *Búsqueda y análisis de regiones y genes de interés en R. sp. LPU83.*

La disponibilidad del genoma completo de una bacteria nos brinda la posibilidad de evaluar un amplio espectro de propiedades. Debido a las características de vida de los rizobios nos concentraremos en los genes que han sido descritos previamente como involucrados en la interacción planta-bacteria, como los *clusters* de genes involucrados en la síntesis de componentes superficiales, en la fijación de nitrógeno y en la producción de factores de nodulación (estudiado en detalle en el Capítulo V, sección V.2). Asimismo, debido a la importancia que juegan los plásmidos en los rizobios, evaluaremos los genes involucrados en la replicación y transferencia plasmídica.

##### IV.4.a. **Genes involucrados en la interacción planta-bacteria.**

Los rizobios tipo Oregon presentan un amplio rango de hospedadores, una alta competitividad frente al simbionte natural de alfalfa (*E. meliloti*) en suelos ácidos y un pobre rendimiento en la fijación de nitrógeno con alfalfa. Para evaluar similitudes y

diferencias analizamos los *clusters* de genes implicados en la interacción simbiótica comparándolos con los de otros rizobios eficientes en la fijación de nitrógeno con su planta hospedadora.

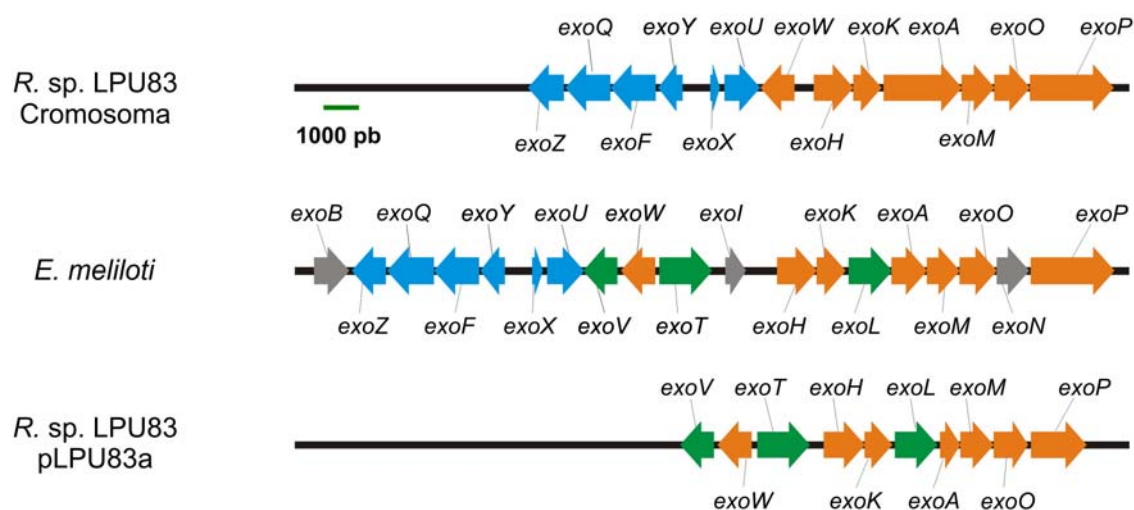
#### IV.4.a.i. *Determinantes de la síntesis de componentes superficiales.*

Los rizobios producen numerosos polisacáridos superficiales, incluyendo los exopolisacáridos (EPS), los polisacáridos capsulares (KPS) y lipopolisacáridos (LPS), los cuales se encuentran involucrados en el desarrollo de la simbiosis con la leguminosa hospedadora (Hozbor, *et al.*, 2004; Quelas, *et al.*, 2006; Jones, *et al.*, 2007). *E. meliloti* produce dos EPS (EPS1 y EPS2). El succinoglicano (EPS1) es requerido para la penetración por el hilo de infección; mutantes en los genes involucrados en la síntesis del EPS1 producen nódulos pequeños, blancos y vacíos, incapaces de producir la FBN (Leigh, *et al.*, 1985; Barnett, *et al.*, 1998). Sin embargo, la producción de otro EPS, el galactoglucano (EPS2) resulta en una supresión de los defectos simbióticos por la falta de EPS1 durante la simbiosis con alfalfa (Glazebrook & Walker, 1989; Zhan, *et al.*, 1989; Ozga, *et al.*, 1994).

##### IV.4.a.i.1. Exopolisacáridos.

Ha sido descrito que mutantes que alteran los EPS pueden verse afectados en su relación con la planta (Cheng & Walker, 1998). Debido a que la interacción de la cepa *R. sp.* LPU83 con plantas de alfalfa no desarrolla una simbiosis fijadora de nitrógeno decidimos comparar el *cluster* de síntesis de exopolisacárido con el *cluster* presente en *E. meliloti*. Al realizar la búsqueda encontramos dos *clusters*, uno presente en el cromosoma (*exoZQFYXUWHKAMOP*) y otro en el plásmido pLPU83a (*exoVWTHKLAMOP*). Los dos *clusters* hallados no son exactamente iguales, encontrándose algunos genes sólo en uno de ellos. En el caso de *E. meliloti* estos genes se hallan formando un único *cluster* (*exoBZQFYXUVWTIHKLAMONP*) en el plásmido pSymB. En *R. etli* se encuentra un *cluster* en el cromosoma (*exoYFP*), mientras que algunos otros genes se encuentran dispersos en el genoma. Si se compara entonces los genes *exo* de la cepa *R. sp.* LPU83 con los presentes en *E. meliloti* surge que la mayoría de los genes se encuentran presentes entre los *clusters* mencionados, a excepción de *exoBIN* (Figura IV.9). Genes ortólogos a *exoB* y *exoN* se encuentran en el cromosoma de *R. sp.* LPU83, pero no se halló un ortólogo a *exoI*. Sin embargo, resultados obtenidos en colaboración con el grupo del Prof. Dr. Karsten Niehaus (CeBiTec, Bielefeld, Alemania) han demostrado que el EPS1 producido por *R. sp.* LPU83 es idéntico al producido por *E. meliloti* (resultados sin publicar). Surge así la

pregunta de si la división de los genes *exo* entre plásmido y cromosoma hacen del plásmido pLPU83a un elemento esencial para la infección de alfalfa por *R. sp. LPU83*.

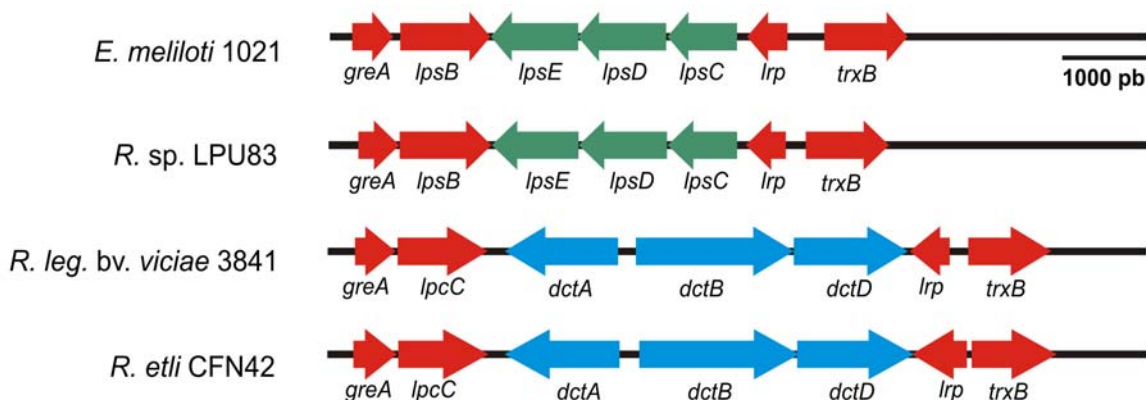


**Figura IV.9. Comparación de la organización de los genes *exo*.** En la figura se muestra la comparación de los *clusters* de los genes *exo* en *E. meliloti*, de los genes *exo* en pLPU83a y de los genes *exo* en el cromosoma de *R. sp. LPU83*. En gris se encuentran marcados los genes ausentes en *R. sp. LPU83*, en naranja los compartidos por los tres *clusters*, en celeste los compartidos por el cromosoma de *R. sp. LPU83* y *E. meliloti*, y en verde los compartidos por pLPU83a y *E. meliloti*.

#### IV.4.a.i.2. Lipopolisacáridos.

Lagares *et al.* (2001) demostraron que el gen *lpsB* de *E. meliloti* se encuentra involucrado en la síntesis de la estructura del LPS y que mutantes en este gen son deficientes en la simbiosis. Las comparaciones realizadas por Lagares *et al.* (2001) demostraron que existen genes homólogos a *lpsB* de *E. meliloti* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (denominado *lpcC*). Como puede observarse en la Figura IV.10, los genes *greA-lpsB* son contiguos y se transcriben en igual dirección en *E. meliloti*. En el caso de los genes homólogos a ellos, *greA-lpcC* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, se observa una situación similar. Ambos rizobios poseen el factor de transcripción *lpr* posicionado a unos 3-5 Kpb corriente abajo en la hebra complementaria. La diferencia significativa entre estos *clusters* es que en medio de los genes *greA-lpsB* y *lpr* en *E. meliloti* se encuentran tres genes homólogos a glicosiltransferasas, *lpsCDE*, mientras que en *R. leguminosarum* bv. *viciae* se encuentra el *cluster* *dctA-dctBD*, involucrado en el transporte de ácidos dicarboxílicos. Mientras que estos genes en *R. leguminosarum* bv. *viciae* están ubicados en el cromosoma, en *E. meliloti* se encuentran en el megaplásmido pSymB. En la cepa *R. sp. LPU83* se hallan en el cromosoma y presentan la misma estructura génica que la que se observa en *E. meliloti*. Esta similitud es extraña al pensar que el cromosoma de *R. sp. LPU83* se encuentra más estrechamente relacionado con los cromosomas de *R. etli* y *R. leguminosarum* bv.

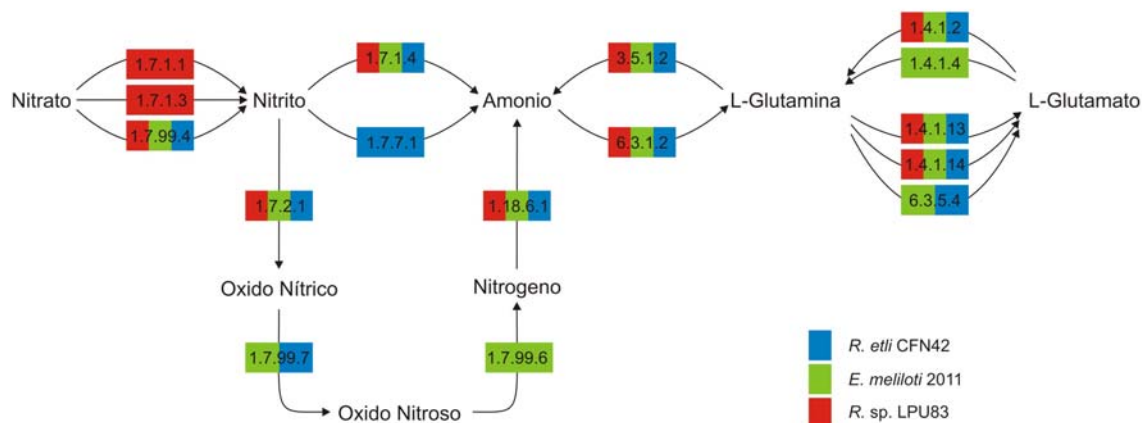
*viciae*. Sin embargo, refuerza la idea de que los cromosomas también sufren de procesos dinámicos que modifican su información y este cambio podría haber surgido como necesidad de los rizobios tipo Oregon para establecer una interacción con alfalfa.



**Figura IV.10.** Comparación de los *clusters* de genes involucrados en la síntesis de LPS.

#### IV.4.a.ii. Comparación de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno.

Un aspecto importante de los rizobios tipo Oregon es la baja eficiencia en la FBN. Es por esto que decidimos evaluar la presencia de los genes involucrados en dicho proceso. En primer lugar, buscamos los genes *nifHDK* encontrando dichos genes en el plásmido pLPU83b, el plásmido simbiótico que también porta los genes *nod* (serán analizado en el Capítulo V). En segunda instancia, evaluamos la presencia de las enzimas que están involucradas en la conversión de nitrógeno a amonio, como también otras enzimas involucradas en el metabolismo del N, y las comparamos con las enzimas del simbionte eficiente de alfalfa, *E. meliloti*, y el simbionte eficiente de poroto, *R. etli*. Con dicho objetivo, buscamos en la base de datos KEGG (KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg>) el metabolismo del nitrógeno en las mencionadas cepas y, a través del módulo GenDB (Meyer, *et al.*, 2003), buscamos los ortólogos presentes en *R. sp.* LPU83. Como resultado de dicha búsqueda pudimos observar la existencia de los genes ortólogos que codificarían para las enzimas necesarias para transformar el nitrógeno atmosférico a amonio (Figura IV.11), como también los necesarios para utilizar nitritos como fuente de N. Las vías para convertir amonio a glutamina y glutamato también se encuentran representadas. Asimismo, genes ortólogos a los genes *fix* presentes en *E. meliloti* fueron encontrados en el genoma de *R. sp.* LPU83.



**Figura IV.11. Metabolismo del nitrógeno en *R. sp. LPU83*, *R. etli CFN42* y *E. meliloti 1021*.** Los números en los recuadros corresponden al *EC number* de cada enzima, los colores representan en que bacterias se encuentra presente cada una. Referencias de los *EC number*: 1.7.1.1, nitrato reductasa dependiente (NADH); EC 1.7.1.3, nitrato reductasa (NADPH); EC 1.7.99.4, nitrato reductasa; EC 1.7.1.4, nitrito reductasa; EC 1.7.7.1, ferredoxin-nitrito reductasa; EC 1.7.2.1, nitrito reductasa formadora de oxido nítrico; EC 1.7.99.7, oxido nítrico reductasa; EC 1.7.99.6, oxido nitroso reductasa; EC 1.18.6.1, nitrogenasa; EC 3.5.1.2, glutaminasa; EC 6.3.1.2, glutamina sintetasa; EC 1.4.1.2, glutamato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>); EC 1.4.1.4, glutamato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>); EC 1.4.1.13, glutamato sintasa (NADPH); EC 1.4.1.14, glutamato sintasa (NADH); EC 6.3.5.4, asparagina sintetasa.

Recientemente, Masson-Boivin *et al.* (2009) compararon la presencia de varios genes involucrados en la FBN utilizando como modelo una bacteria que puede fijar en vida libre nitrógeno atmosférico, *Klebsiella pneumoniae*. A este análisis, incluimos nuestra cepa de interés, y observamos la presencia de algunos genes más involucrados en la FBN que en *E. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae*, generándonos la pregunta de si los rizobios tipo Oregon serían capaces de fijar nitrógeno en vida libre.

#### IV.4.b. Genes involucrados en la replicación y transferencia plasmídica.

##### IV.4.b.i. Estudio de las funciones replicativas de los distintos replicones.

Los plásmidos de las  $\alpha$ -proteobacterias presentan, principalmente, dos tipos de operones de replicación: *repABC* y *repC*. La familia *repABC*, es la más ampliamente distribuida. Los tres genes *repA*, *repB* y *repC* se encuentran siempre en el mismo orden relativo: *repA* río arriba de *repB* y *repC* río abajo de este último, separado por una región intergénica que codifica para un ARN pequeño y antisentido (ctARN). Los productos de los genes *repA* y *repB* codifican para proteínas involucradas en la segregación de plásmidos y cromosomas, mientras que *repC* codifica para una proteína que inicia la replicación (Ramírez-Romero, *et al.*, 2001; Pappas & Winans, 2003). La familia, *repC*, evolutivamente relacionada a las *repABC* debido a que comparte la proteína iniciadora de la replicación *repC*, no posee las

**Tabla IV.4. Presencia de los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* en cepas de rizobios secuenciadas completamente.**

Involucrado en	Gen	Kp	BTA	ORS 278	Ac	Bj	MI	Ct	Em	RI	LPU83
Regulación	<i>nifA</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifB</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Genes estructurales de la Nitrogenasa	<i>nifH</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Genes estructurales de la Nitrogenasa	<i>nifD</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Genes estructurales de la Nitrogenasa	<i>nifK</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifE</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifN</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Función Desconocida	<i>nifT</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifX</i>	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifQ</i>	X	X	X	X	X	X	X			X
Función Desconocida	<i>nifW</i>	X	X	X	X	X	X	X			
Maduración de la Nitrogenasa	<i>nifZ</i>	X	X	X	X	X	X	X			X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifS</i>	X	X	X	X	X	X				X
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifU</i>	X	X	X	X						
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifV</i>	X	X	X	X			X			X
Regulación	<i>nifL</i>	X									
Donador de electrones	<i>nifF</i>	X									
Donador de electrones	<i>nifJ</i>	X									
Biosíntesis del complejo FeMo-co	<i>nifY</i>	X									
Maduración de la Nitrogenasa	<i>nifM</i>	X									

Abreviaturas: Kp, *Klebsiella pneumoniae*; BTA, *Bradyrhizobium* sp. BTAi1; ORS278, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Ac, *Azorhizobium caulinodans* ORS571; Bj, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110; MI, *Mesorhizobium loti* MAFF303099; Ct, *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424; Em, *Ensifer meliloti* 1021; RI, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841; LPU83, *Rhizobium* sp. LPU83. En los rizobios, FixU reemplaza funcionalmente a NifT.

*repA* y *repB* (Barran, *et al.*, 2001; Watson & Heys, 2006; Cevallos, *et al.*, 2008). Otros sistemas de replicación han sido descritos en los rizobios (Barran, *et al.*, 2001; Watson & Heys, 2006).

Mediante la comparación con datos disponibles de la familia *Rhizobiaceae* hemos buscado los sistemas replicativos en los diferentes replicones de las cepas tipo Oregon. Así hemos encontrado cinco módulos *repABC* presentes en los plásmidos. Uno de ellos en el plásmido pLPU83a, otro en pLPU83c y tres en el plásmido pLPU83b. No hemos realizado todavía estudios para saber si los tres módulos presentes en pLPU83b son funcionales. Además, hemos encontrado un módulo *repAB* extra en el plásmido pLPU83c sin la correspondiente *repC*.

Hasta el momento han sido propuestos dos modelos para explicar el origen y la evolución de los replicones *repABC* y la aparición de nuevos grupos de incompatibilidad. El primero está basado en la aparición de bireplicones y el segundo en la transferencia horizontal de genes (Cevallos, *et al.*, 2002; Castillo-Ramírez, *et al.*, 2009). Para dilucidar qué modelo se observa en la cepa *R. sp.* LPU83, realizamos estudios filogenéticos de cada uno de los genes *repABC* por separado. A partir de estos análisis podemos ver que el módulo *repABC* presente en el plásmido pLPU83a se agrupa en cada uno de los genes con el *repABC* de pRL8 (Figuras IV.12, IV.13 y IV.14, grupo D). De los módulos *repABC* presentes en pLPU83b y pLPU83c se observa, como ha sido descrito en otros rizobios (Cevallos, *et al.*, 2008), que la evolución de *repAB* es independiente de *repC*. Por último, es interesante destacar que el módulo *repAB* del plásmido pLPU83c se agrupa con los *repAB* presentes en los plásmidos p42e de *R. etli* CFN42, pRLG202 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304 y pRL11 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, los cuales han sido propuestos como segundos cromosomas (Landeta, *et al.*, 2011).

#### IV.4.b.ii. Identificación de genes implicados en funciones conjugativas.

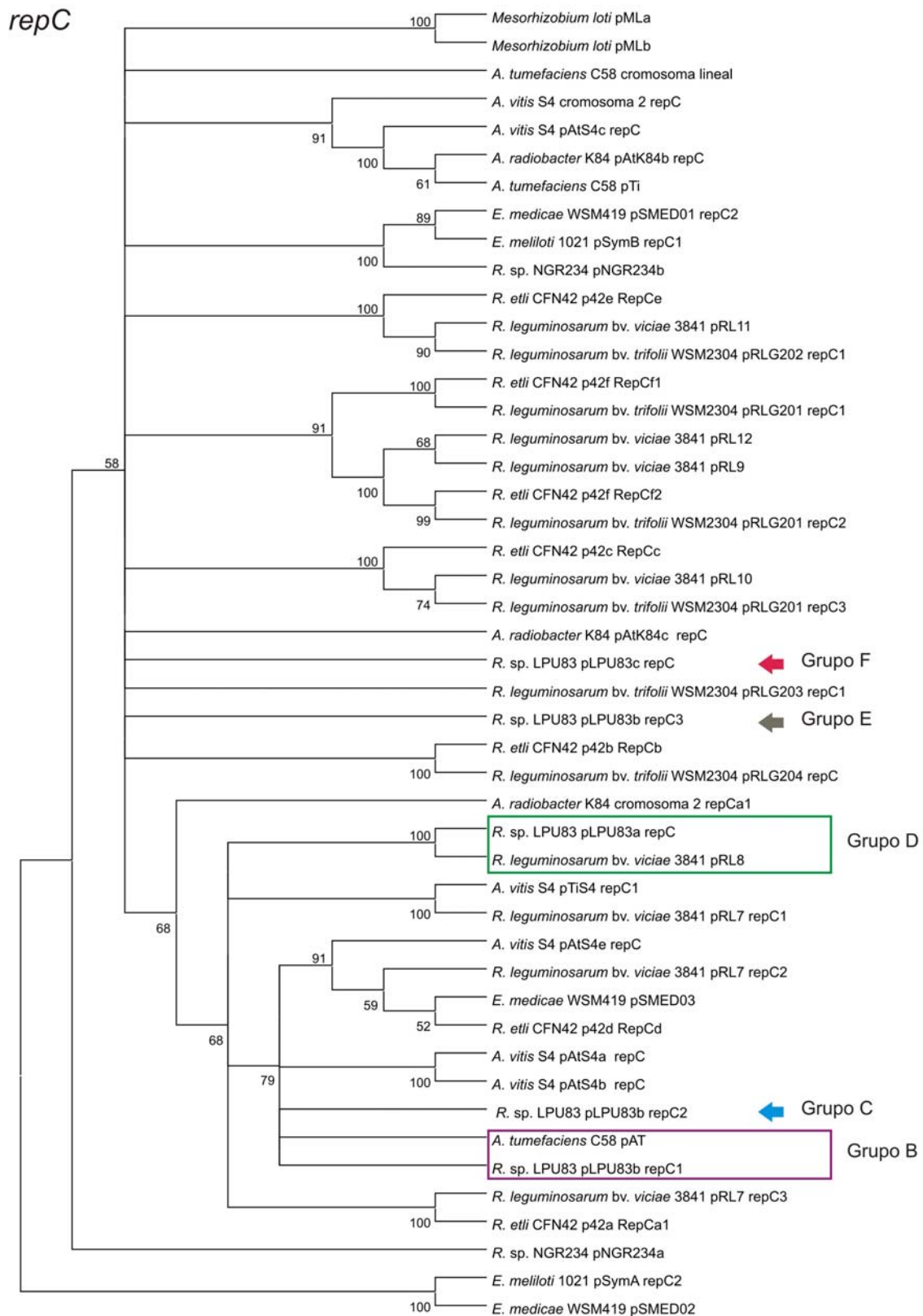
Recientemente, Ding & Hynes (2009) han clasificado las regiones involucradas en el Dtr y en el Mpf encontradas en diferentes rizobios, de acuerdo a la organización genética de las mismas (Figura IV.15). Las regiones Dtr fueron organizadas utilizando como referencia el gen *traA* y de acuerdo a ello se formaron tres grupos. El grupo I conformado por plásmidos en los que se encuentran los genes *traCDG* y *traAFBH* como dos operones divergentes (por ejemplo p42a, de *R. etli* CFN42). El grupo II, en el cual los plásmidos poseen los genes *traCDG* y *traA* como operones divergentes (con p42d como plásmido modelo). El grupo III, donde los plásmidos poseen la estructura genética *VirD4-MobC* y *traA* como operones







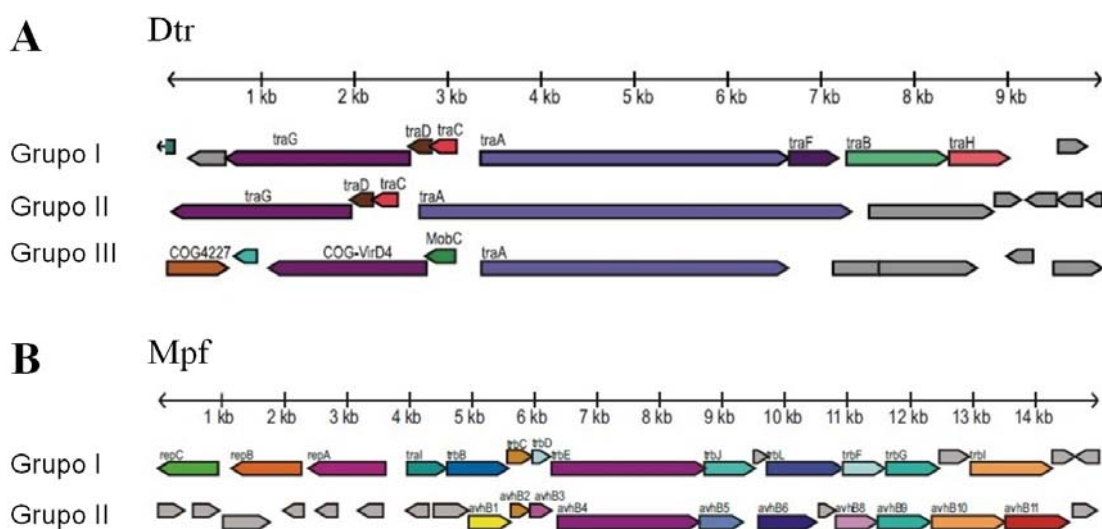




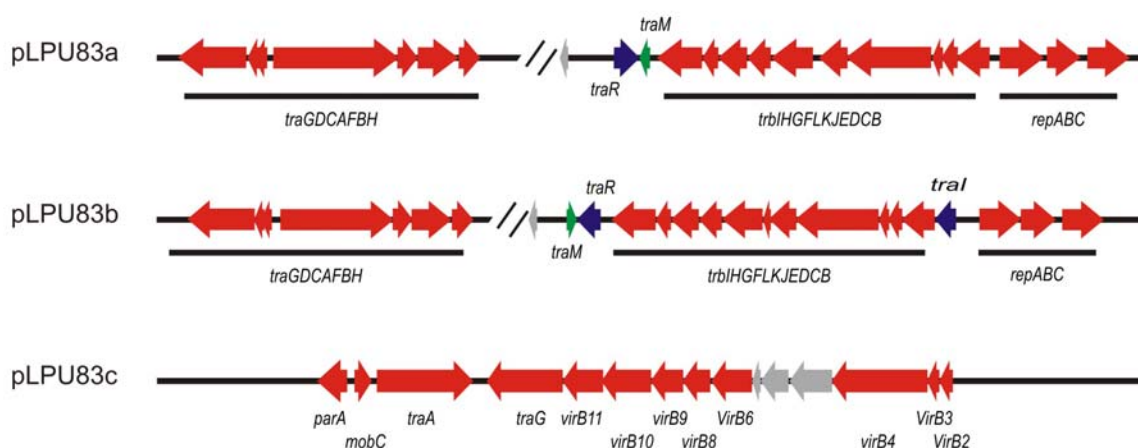
**Figura IV.14. Análisis filogenético de genes *repC* de rizobios.** Los estudios filogenéticos se realizaron utilizando el método de máxima verosimilitud, con 100 *bootstrap*. Los agrupamientos con valores mayores a 50 *bootstrap* se encuentran indicados en los nodos.

divergentes (como pRL10 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3481). Los Mpf fueron agrupados en dos grupos: el grupo I cuyos genes son nombrados como *trbBCDEJLFGI* (por ejemplo, p42a), y el grupo II, donde encontramos el operón *virB1-11* (con p42d como ejemplo) (Figura IV.15.B).

Utilizando la misma metodología que en las secciones anteriores, realizamos la búsqueda *in silico* de operones/genes relacionados a la transferencia plasmídica conjugativa. En los distintos plásmidos de la cepa *R. sp.* LPU83 hemos encontrado regiones que presentan genes relacionados a sistemas de transferencia conjugativa (Figura IV.16).



**Figura IV.15. Esquemas de la organización de los genes involucrados en la transferencia conjugativa descritos en rizobios. A.** Sistemas de transferencia y replicación del ADN (Dtr) **B.** Sistemas de apareamiento del par conjugativo (Mpf). Modificado de Ding & Hynes, 2009.



**Figura IV.16. Mapas de las regiones involucradas en la transferencia conjugativa halladas en los plásmidos de *R. sp.* LPU83.** Las regiones de Dtr halladas en los plásmidos pLPU83a y pLPU83b son similares a las del Grupo I. Las regiones de Mpf encontradas en pLPU83a y pLPU83b son similares a las de Grupo I. La región de Mpf encontrada en pLPU83c es similar a las de Grupo II.

Los *clusters* hallados en los plásmidos pLPU83a y pLPU83b presentaron regiones Dtr que se corresponden con el grupo I descrito previamente por Ding & Hynes (2009). Sin embargo, las estructuras de los Mpf son más diversas. Los sistemas Mpf de los plásmidos pLPU83a y pLPU83b pertenecen al grupo I y serán analizados en el Capítulo VI (ver sección VI.3). En el plásmido pLPU83c, hemos encontrado un sistema Dtr no incluido en la clasificación realizada por Ding & Hynes (2009). Este sistema se encuentra próximo a un sistema Mpf perteneciente al grupo II. En el Capítulo VI estudiamos las propiedades de transferencia de los tres plásmidos presentes en la cepa *R. sp.* LPU83.

---

En este capítulo analizamos el genoma de *Rhizobium sp.* LPU83, cepa de referencia de los rizobios tipo Oregon. El genoma consiste en un cromosoma de 4,19 Mpb y tres plásmidos, pLPU83c de 1,92 Mpb, pLPU83b de aproximadamente 1,37 Mpb y pLPU83a de 151,68 Kpb. Al igual que en otras especies de rizobios los plásmidos constituyen un porcentaje importante del genoma (45 %). Los estudios filogenéticos realizados con el cromosoma de *R. sp.* LPU83 han develado una estrecha relación con *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304 y *A. radiobacter* K84. Esta estrecha relación, a su vez, se ve apoyada debido a que el cromosoma de *R. sp.* LPU83 presenta una elevada colinealidad a los cromosomas de los rizobios previamente mencionados. Por el contrario, el contenido plasmídico que posee *R. sp.* LPU83 es altamente divergente, salvo para el plásmido pLPU83a que mostró regiones con una elevada similitud con los plásmidos pRL8 y pSM11a. Es interesante destacar que los tres plásmidos presentaron elementos relacionados con sistemas de transferencia conjugativa. El estudio de los genes involucrados en la partición y replicación plasmídica nos ha demostrado una dinámica genómica compleja.

La evaluación de los genes involucrados en la simbiosis mostró una relación evolutiva a los genes de los rizobios noduladores de alfalfa (genes *nod*, *lps*, *exo*). Este hecho ya había sido descrito evaluando sólo los genes *nifH*, *nodC* y *nodH* (Laguerre, *et al.*, 2001; Del Papa, *et al.*, 2007). La presencia de genes *exo* en el plásmido críptico pLPU83a lo posiciona como un elemento de interés en la interacción de *R. sp.* LPU83 con alfalfa.

En el capítulo siguiente extenderemos el análisis a la caracterización de la región que contiene los genes *nod* en el plásmido pLPU83b y avanzaremos en el estudio bioquímico de la comunicación planta-bacteria.

# **Capítulo V**

**Estructura química y  
determinantes genéticos de los  
factores de nodulación de  
*Rhizobium* sp. LPU83**



## V.1. *Introducción.*

Las plantas leguminosas pueden desarrollar una interacción simbiótica con los rizobios, y así, formar nuevos órganos en sus raíces, los nódulos, donde la bacteria puede residir en forma de bacteroide y realizar la fijación biológica de nitrógeno, un proceso de vital importancia ya que convierte el nitrógeno atmosférico en amonio, que puede ser utilizado por la planta hospedadora.

La nodulación es una interacción usualmente muy específica, entre huésped y hospedador, en la cual, con algunas excepciones, cepas determinadas de rizobios pueden infectar un número limitado de plantas. Esta interacción comienza con un intercambio de señales en el cual en primera instancia la planta secreta flavonoides o isoflavonoides que, en la bacteria compatible, desencadenan la inducción de los genes de nodulación que codifican para las enzimas responsables de la síntesis, modificación y secreción de los Factores de Nodulación (NFs). La inducción de la formación de nódulos en las raíces por los rizobios, en la mayoría de los casos, tiene un requerimiento estricto en la secreción de NFs específicos para la simbiosis. Cuando los NFs alcanzan la planta hospedadora inducen una serie de cambios bioquímicos y morfológicos acompañados por una modificación significativa en los genes expresados en ese momento en la raíz (ver Capítulo I, sección I.3.a.i) (Roche, *et al.*, 1992; Denarie & Cullimore, 1993; D'Haese & Holsters, 2002).

Recientemente, Del Papa *et al.* (2007) han demostrado la presencia de un ortólogo al gen *nodH*, que codifica para una sulfotransferasa de NFs, funcional en la cepa *Rhizobium* sp. LPU83. Dicho gen se presenta en una única copia en el genoma. Los mismos autores han demostrado también que el gen ortólogo al *nodH* es capaz de restablecer la sulfatación y el fenotipo fijador de nitrógeno al complementar un mutante *nodH* de *Ensifer meliloti*. Sin embargo, el mutante *nodH* de la cepa *R.* sp. LPU83 es capaz de nodular alfalfa. Así, se propuso que en la cepa *R.* sp. LPU83 podría existir otra enzima que lleve a cabo la sulfatación de los NFs.

En este capítulo analizaremos la estructura genética del *cluster* de genes de nodulación y la estructura química de los factores de nodulación de la cepa *R.* sp. LPU83. Asimismo, caracterizaremos los NFs del mutante *R.* sp. LPU83 *nodH* a fin establecer la necesidad o no de los rizobios tipo Oregon de poseer NFs sulfatados.

## V.2. Estructura genética del cluster de genes de nodulación en el plásmido pLPU83b.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la estructura de los genes de nodulación en la cepa *R. sp.* LPU83, se buscaron los genes de nodulación en el genoma y se analizó dicha región mediante herramientas bioinformáticas. Se encontraron 13 posibles marcos de lectura abiertos designados como *nodABCD1D3EFGHIJPQ*; el análisis de las proteínas para las que codifican mostró que son similares a las proteínas Nod conocidas de otras especies de rizobios. El análisis comparativo de las secuencias obtenidas con los correspondientes ortólogos de rizobios completamente secuenciados reveló una similitud significativa con los genes de nodulación de los rizobios noduladores de alfalfa *E. meliloti* 1021 y *Ensifer medicae* WSM419. Es interesante mencionar que las secuencias disponibles de los genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodE*, y *nodG* de *Rhizobium mongolense* USDA1844 obtienen la mayor identidad con los genes correspondientes de *R. sp.* LPU83 (92, 94, 97, 96, y 93 %, respectivamente), pero el *cluster* completo de dicha cepa no se encuentra secuenciado.

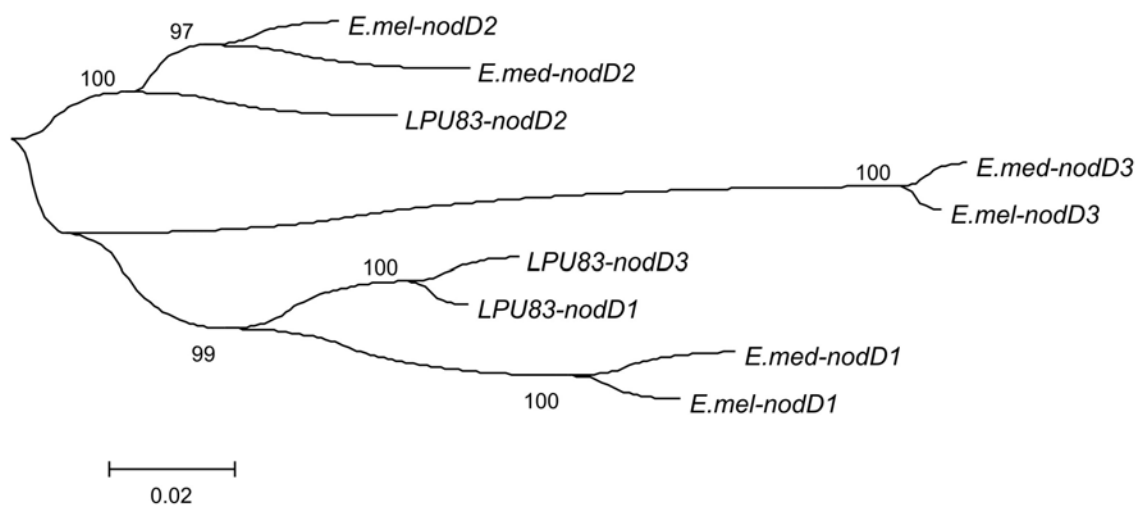
También observamos que el gen *nodG*, el cual codifica para una proteína transportadora de ácidos grasos, en la cepa *R. sp.* LPU83 se encuentra truncado: presenta una interrupción que le permitiría expresar solamente los 52 aminoácidos del extremo N-terminal de sus proteínas ortólogas en *E. meliloti* y *E. medicae*. López-Lara & Geiger (2001) han sugerido que el gen *nodG* es una duplicación de un gen del tipo *housekeeping*, *fabG*, esto implica que la proteína NodG en la cepa *R. sp.* LPU83 puede ser funcionalmente remplazada por otro gen presente en este rizobio, del cual hemos encontrado parálogos en el genoma de *R. sp.* LPU83.

La localización y orientación de los genes de nodulación de la cepa *R. sp.* LPU83 (Figura V.1.A) muestran una marcada y alta conservación con los *clusters* homólogos del pSymA de *E. meliloti* 1021 (Barnett, *et al.*, 2001) y del pSmed02 de *E. medicae* WSM419 (Reeve, *et al.*, 2010c). En la región *nod*, se encuentran tres elementos promotores dependientes de NodD, altamente conservados (cajas *nod*). No se han observado grandes diferencias entre la secuencia consenso de las cajas Nod de *R. sp.* LPU83 y aquellas presentes en otros rizobios noduladores de alfalfa (Figura V.1.B).





*nodD2*, y *nodD3*). En *E. meliloti*, *nodD1* es activada por exudados complejos de plantas o por el flavonoide luteolina, *nodD2* es activada sólo por exudados de plantas, y *nodD3* fue propuesta como modulador de la expresión de los genes *nod* en ausencia de exudados (Mulligan & Long, 1989). En la cepa *R. sp.* LPU83 la designación de *nodD1* y *nodD3* fue realizada en base de la sintenia observada con *E. meliloti*. A pesar de esta designación, el gen *nodD3* de *R. sp.* LPU83 posee una mayor identidad con el gen *nodD1* de *R. sp.* LPU83 que con el gen *nodD3* de *E. meliloti* 1021 (Figura V.2). Los alelos *nodD1*, *nodD2* y *nodD3* de *E. meliloti* y *E. medicae* agrupan como ramas separadas al realizar un árbol filogenético (Figura V.2). El gen *nodD2* de *R. sp.* LPU83 se posiciona en el mismo grupo que sus ortólogos en *Ensifer*, sin embargo, el gen *nodD1* y el gen *nodD3* de *R. sp.* LPU83 forman un agrupamiento independiente dentro del grupo de los genes *nodD1* de *E. meliloti* y *E. medicae* (Figura V.2). Esta estructura genética presente en los genes *nod* de la cepa *R. sp.* LPU83 podría ser la consecuencia de una temprana duplicación del gen sin una diferenciación en su secuencia para generar *nodD1* y *nodD3* en las cepas tipo Oregon. De esta manera, mediante el análisis de la estructura de estos genes se puede plantear una posible explicación al origen de los genes *nodD1* y *nodD3* en *Ensifer*. Dichas observaciones dan lugar a preguntarnos si las actuales formas de *nodD3* presente en *E. meliloti* y *E. medicae* representan variantes genéticas no evolucionadas (¿aún?) en los rizobios tipo Oregon.



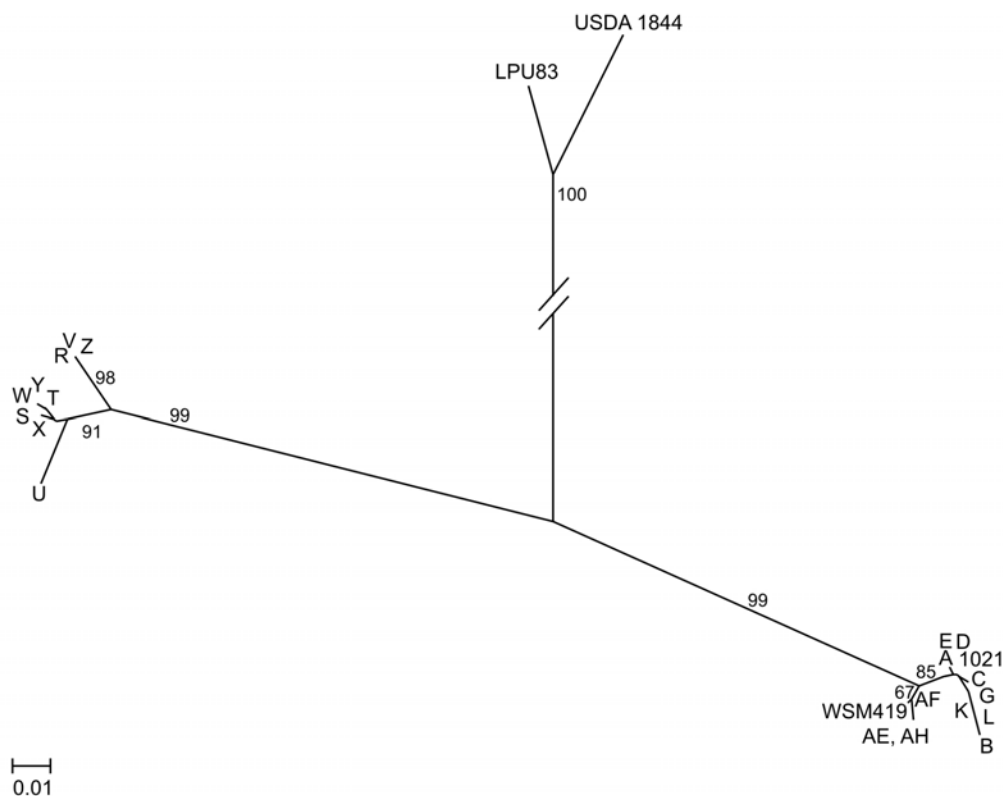
**Figura V.2. Árbol filogenético mediante el método de Neighbor-joining de los genes *nodD*.** Construcción de un árbol filogenético utilizando los alelos *nodD1*, *nodD2* y *nodD3* pertenecientes a *R. sp.* LPU83, *E. medicae* y *E. meliloti*. Los alelos *nodD1/nodD3* de *R. sp.* LPU83 agrupan en una misma rama mostrando un evento de duplicación sin una marcada diferenciación. La barra indica 0,02 sustituciones/sitio.

#### **V.4. Inferencia de la posición filogenética de la cepa *R. sp.* LPU83 dentro de los rizobios noduladores de alfalfa a partir de la región intergénica *nodEG* ( $IGS_{NOD}$ ).**

En trabajos previos, Bailly *et al.* (2007) obtuvieron árboles filogenéticos de diferentes rizobios noduladores de alfalfa concatenando secuencias parciales de los genes *nodABC-nodEG*. En dicho análisis, los autores antes mencionados observan que las cepas de *R. mongolense* aparecen como las primeras ramas emergentes entre los simbiosites de *Medicago spp.*. Una segunda rama del mismo árbol incluye cepas de *E. medicae*, *E. meliloti* bv. *medicaginis*, y *E. meliloti* bv. *meliloti* (Bailly, *et al.*, 2007). Utilizando los genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodE*, *nodG* o la región intergénica  $IGS_{NOD}$  de manera independiente, es posible obtener árboles de estructuras similares al previamente mencionado (Bailly, *et al.*, 2007). Trabajos previos de otros laboratorios (Laguerre, *et al.*, 2001) y del nuestro (Del Papa, *et al.*, 2007) sostienen la hipótesis de que los rizobios de tipo Oregon poseen información genética relacionada a la simbiosis cercana evolutivamente a la de los rizobios noduladores de alfalfa. Con el objetivo de determinar con precisión el origen y la posición filogenética de los genes simbióticos de *R. sp.* LPU83 se realizaron árboles filogenéticos utilizando la región  $IGS_{NOD}$ , incluyendo rizobios representativos de los grupos previamente descritos por Bailly *et al.* (2007). Los resultados muestran que *R. sp.* LPU83 se encuentra muy próxima a la cepa representativa *R. mongolense* USDA 1844, conformando así una de las primeras ramas que se diferencian en la evolución de los rizobios noduladores de alfalfa (Figura V.3).

#### **V.5. Estudio de la inducción de los genes de nodulación en la cepa *R. sp.* LPU83.**

Con el objetivo de obtener las estructuras químicas de los NFs de las cepas tipo Oregon, fue necesario encontrar las condiciones en las cuales se induce la producción de NFs en estas cepas. Debido a que en la bibliografía no se encontraban datos acerca de dichas condiciones, en primer lugar se estudió el efecto de diferentes flavonoides en la transcripción de los genes *nod* y en la producción de NFs. La inducción de los genes *nod* fue evaluada con 20 flavonoides mediante la construcción de una fusión trascricional *nodC-lacZ* como se describe en Materiales y Métodos (ver sección II.4.k). Como control positivo de la construcción realizada, el plásmido pMP604, que contiene un activador

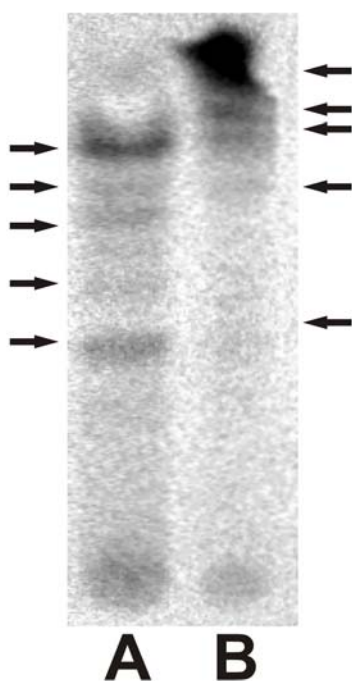


**Figura V.3. Árbol filogenético mediante el método de NJ para  $IGS_{NOD}$  de los rizobios noduladores de alfalfa.** Los alelos pertenecientes a *E. medicae*, *E. meliloti* bv. *medicaginis*, *E. meliloti* bv. *meliloti* agrupan en diferentes clados. *R. sp.* LPU83 y *R. mongolense* USDA 1844 agrupan juntas en una rama independiente. Las letras indican los grupos previamente descritos por Bailly *et al.* (2007) (Ver sección II.8.d). La barra indica 0,01 sustituciones/sitio.

transcripcional independiente de flavonoides (*Flavonoid-Independent Transcription-Activation*,  $nodD_{FITA}$ ), fue introducido en la cepa reportera *R. sp.* LPU83- $nodC::lacZ$ . En este caso se pudo observar una inducción de aproximadamente 20 veces comparada con la cepa isogénica sin el plásmido pMP604, demostrando la funcionalidad de la construcción. Ninguno de los 20 flavonoides ensayados mostró una inducción significativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *R. sp.* LPU83- $nodC::lacZ$ . También fueron ensayados exudados de alfalfa y poroto pero ninguno logró activar los genes *nod* en la cepa *R. sp.* LPU83. Estos resultados nos indican que la variante NodD provista por el plásmido pMP604 es capaz de activar la transcripción de los genes *nod*, aunque ninguno de los flavonoides ensayados fue capaz de inducir la correcta interacción entre la proteína NodD de la cepa *R. sp.* LPU83 y sus correspondientes cajas Nod.

De manera similar, los cultivos de la cepa *R. sp.* LPU83 fueron crecidos utilizando glucosamina marcada radioactivamente y los flavonoides correspondientes para evaluar la inducción en la producción de NFs mediante el uso de cromatografía de capa fina en fase reversa (RP-TLC, *Reverse Phase - Thin Layer Chromatography*). El análisis genético de la transcripción de los genes *nod* fue congruente con la ausencia de cantidades detectables de

NFs marcados radioactivamente utilizando los previamente mencionados flavonoides como posibles inductores. En correlación con la inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *R. sp. LPU83::nodC-lacZ* cuando posee el plásmido pMP604, la producción de NFs fue detectada por RP-TLC en la cepa *R. sp. LPU83* (pMP604). De la misma manera, el mutante *nodH* denominado *R. sp. LPU83-H* previamente descrito por Del Papa *et al.* (2007) fue también evaluado al introducirle el plásmido pMP604. El resultado obtenido mostró que la cepa *R. sp. LPU83-H* (pMP604) presentaba un patrón de bandas diferentes que la cepa *R. sp. LPU83* (pMP604) cuando se realizó la RP-TLC (Figura V.4). Estas últimas cepas nos dieron la posibilidad de preparar NFs en cantidades suficientes para realizar la determinación de sus estructuras químicas.



**Figura V.4. Análisis de los NFs producidos por *R. sp. LPU83* y *R. sp. LPU83-H* mediante el uso de RP-TLC.** Línea A, *R. sp. LPU83*, y línea B, *R. sp. LPU83-H*. Ambas cepas poseen el plásmido pMP604 que contiene un activador transcripcional independiente de flavonoides (*nodD<sub>FITA</sub>*). Las flechas indican especies de NFs en cada cepa.

### **V.6. Análisis estructural de los factores de nodulación producidos por la cepa *R. sp. LPU83*.**

Luego de encontrar las condiciones para inducir la producción de NFs en la cepa *R. sp. LPU83*, los mismos fueron purificados para las cepas *R. sp. LPU83* (pMP604) y *R. sp. LPU83-H* (pMP604) desde cultivos inducidos con luteolina (la producción de NFs se ve levemente estimulada por el agregado de luteolina). Una vez obtenido el extracto conteniendo los NFs (Ver Materiales y Métodos, sección II.5.c), los análisis mediante HPLC y MS/MS fueron realizados según Crespo-Rivas *et al.* (2009). De esta manera, pudimos identificar 9 tipos diferentes de NFs en la cepa salvaje *R. sp. LPU83* y 24 tipos en

el mutante *R. sp.* LPU83-H. En la Tabla V.1 se realiza un resumen de las estructuras químicas de los diferentes NFs identificados, y en la Figura V.5 se observan los espectros MS/MS de NFs representativos de cada cepa. Los NFs identificados fueron trímeros, tetrámeros y pentámeros de N-acetil-glucosamina y mostraron diferentes sustituyentes químicos en sus residuos terminales, tanto en el extremo reductor como en el no reductor. Las cadenas unidas al extremo no reductor del oligómero de glucosamina mostraron diferentes longitudes y número de insaturaciones (Tabla V.1). La mayoría de los NFs aislados de la cepa *R. sp.* LPU83 se encontraron sulfatados en el residuo del extremo reductor.

Llamativamente, ninguno de los NFs aislados del mutante *nodH* de la cepa *R. sp.* LPU83 se encontraba sulfatado. La carencia de sulfato en los NFs de la cepa *R. sp.* LPU83-H claramente sugiere que no hay homólogos funcionales de *nodH* (sulfotransferasas) en estos rizobios. Previamente se demostró que el mutante *nodH* de la cepa *R. sp.* LPU83 era capaz de nodular alfalfa (Del Papa, *et al.*, 2007), así, podemos afirmar que este mutante es capaz de nodular alfalfa con NFs que no se hallan sulfatados, lo cual es de vital importancia para la interacción entre el simbiote eficiente, *E. meliloti*, y alfalfa (Faucher, *et al.*, 1988; Cloutier, *et al.*, 1996; Wais, *et al.*, 2002).

Es interesante observar que la mayoría de los NFs se encontraron N-metilados en el residuo del extremo no reductor, una característica típica de los rizobios noduladores de poroto (Poupot, *et al.*, 1993; Poupot, *et al.*, 1995). Esta modificación de los NFs es llevada a cabo por una proteína codificada por el gen *nodS* (Geelen, *et al.*, 1995). Krishnan *et al.* (1992), demostraron que el gen *nodS* es capaz de extender el rango de hospedadores de ciertos rizobios. La presencia de NFs metilados en los rizobios tipo Oregon podría explicar la capacidad de los mismos para nodular poroto y *Leucaena leucocephala* (Folch-Mallol, *et al.*, 1996). En estos rizobios no ha sido reportada la presencia de ortólogos de *nodS* y no los hemos encontrado *in silico*. Tampoco se han encontrado NFs metilados en *E. meliloti* (Perret, *et al.*, 2000). La N-metilación de los NFs en los rizobios tipo Oregon refleja, a nivel químico, la relación conocida entre estas bacterias y los rizobios noduladores de poroto. En la Tabla V.2 se puede observar la comparación entre los NFs de diversos rizobios, incluyendo los noduladores de poroto o alfalfa. Claramente se puede observar que los NFs de los rizobios tipo Oregon comparten características de ambos grupos. La longitud y el número de insaturaciones de las cadenas de ácidos grasos, como la presencia de un grupo metilo en la posición R1, son similares a las presentes en *Rhizobium tropici* o *Rhizobium etli*; mientras que los sustituyentes en las posiciones R2 a R6 son similares a los presentes en *E. meliloti*.

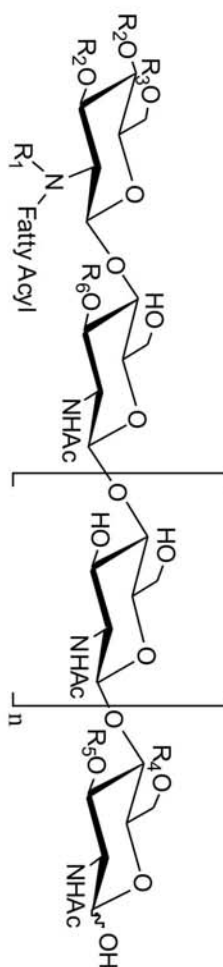
Tabla V.1. Estructuras de los factores de nodulación producidos por *R. sp. LPU83* y su mutante *nodH\**.

<i>R. sp. LPU83</i> (nMMP604)		<i>R. sp. LPU83 nodH</i> -(pMMP604)	
Estructura	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Estructura	[M+H] <sup>+</sup> m/z
V(C18:1,NMe,S)	1350	V(C18:1-OH,NMe)	1286
	iones b: 440, 643, 846, 1049 [M-80] <sup>+</sup> =1270	V(C18:0,NMe)	iones b: 456, 659, 862 iones b: 442, 645, 848, 1051
V(C18:2,NMe,S)	1348	V(C18:1,NMe)	iones b: 440, 643, 846, 1049
	iones b: 438, 641, 844, 1047 [M-80] <sup>+</sup> =1268	V(C18:2,NMe)	iones b: 438, 641, 844, 1047
V(C18:2,NMe)dNAc	1226	V(C18:0,NMe)dNAc	iones b: 442, 645, 848, 1009
IV(C20:0,NMe)	1098	V(C16:1)	iones b: 398, 804, 1007
IV(C20:1,NMe,S)	1175	V(C18:2,NMe)dNAc	iones b: 438, 641, 844, 1005
	iones b: 468, 671, 874 [M-80] <sup>+</sup> =1095	IV(C20:0,NMe)	iones b: 470, 673,
		IV(C20:1,NMe)	iones b: 468, 671, 874
		IV(C20:2,NMe)	iones b: 466, 669, 872
IV(C18:0,NMe,S)	1149	IV(C18:1-OH,NMe)	iones b: 456, 649, 862
IV(C18:1,NMe,S)	1147	IV(C18:0,NMe)	iones b: 442, 645, 848
IV(C18:2,NMe,S)	1145	IV(C18:1,NMe)	iones b: 440, 643, 846
		IV(C18:2,NMe)	iones b: 438, 641, 844
		IV(C16:0,NMe)	iones b: 414, 617, 820
		IV(C16:0)	iones b: 400, 603, 806
		IV(C16:1)	iones b: 398, 601, 804
		IV(C16:2)	iones b: 396, 599
		III(C20:1,NMe)	iones b: 468, 671
		III(C20:2,NMe)	iones b: 466, 669, 872
		III(C18:0,NMe)	iones b: 442, 645, 848
III(C20:0,NMe)	894	III(C18:1,NMe)	iones b: 440, 643
	iones b: 470, 673	III(C18:2,NMe)	iones b: 438, 641, 844
		III(C16:2)	iones b: 396, 599

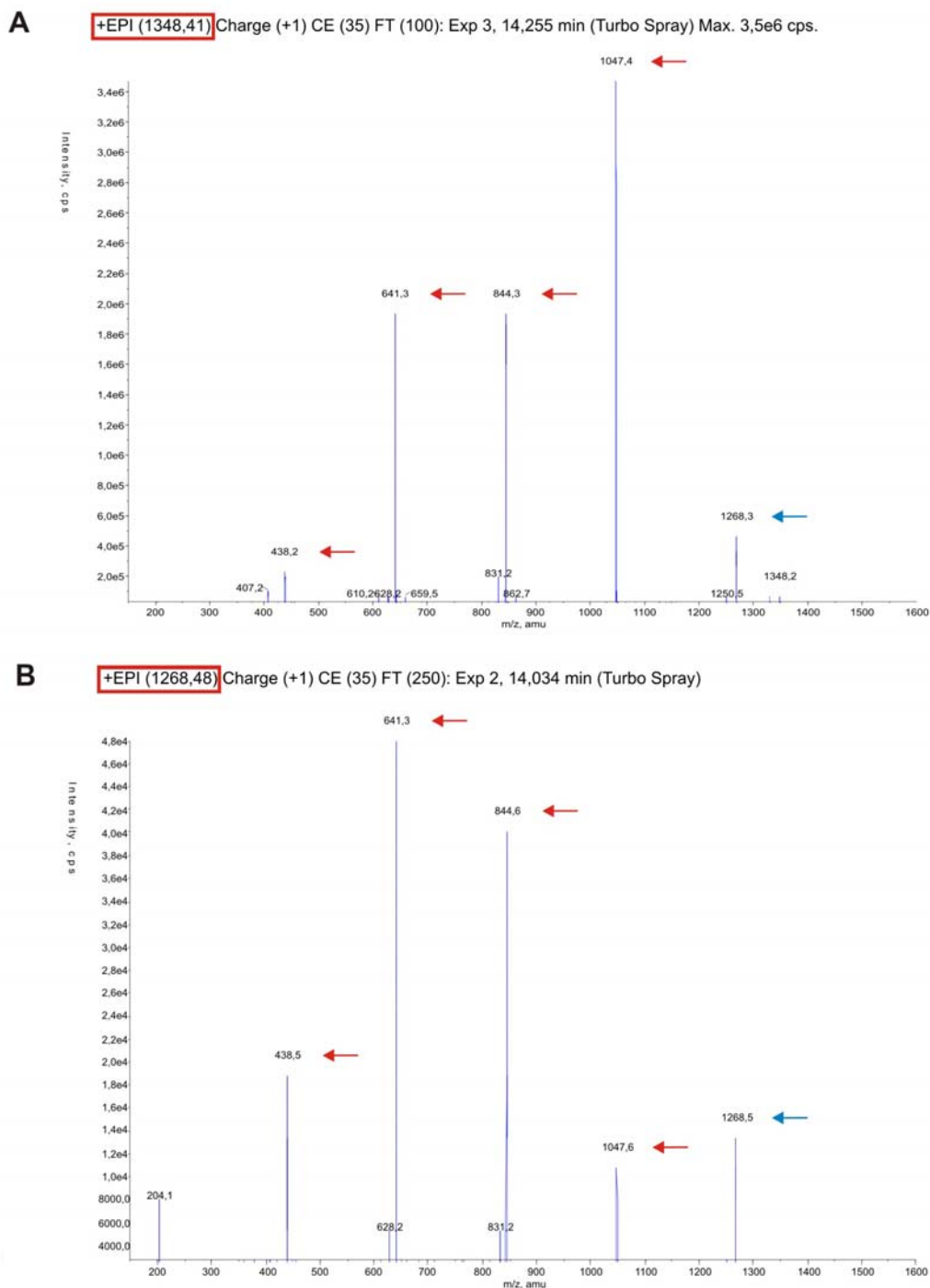
\* Las estructuras de los NFs son representadas siguiendo la convención (Spaink, 1992) que indica el número de residuos de N-acetil-glucosamina en el núcleo (indicado en números romanos), el largo y grado de insaturaciones de la cadena de ácidos grasos, y otros sustituyentes enumerados en orden de aparición en sentido horario desde la cadena de ácidos grasos.

Tabla V.2. Comparación de los factores de nodulación y sus decoraciones.

Ceda	Ácidos Grasos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n	Referencia
<i>B. japonicum</i> USDA110	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:1</sub>	H	H	H	MeFuc	H	H	2	Sanjuan, <i>et al.</i> , 1992
<i>R. etli</i> CE3	C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>	Me	Ch, H	H	AcFuc	H	H	2	Poupot, <i>et al.</i> , 1995
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ANU843	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub> , C <sub>20:3</sub>	H	H	H, Ac	H	H	H	0, 1, 2	Orgambide, <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhizobium</i> sp. LPU83	C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub> , C <sub>20:0</sub> , C <sub>20:1</sub> , C <sub>20:2</sub>	Me	H	H	S, H	H	H	0, 1, 2	Este trabajo
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>	Me	Ch, H	Ch, H	MeFuc, AcMeFuc, SMeFuc	H	H	2	Price, <i>et al.</i> , 1992
<i>R. tropici</i> CIAT 899	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>20:0</sub> , C <sub>20:1</sub>	Me, H	H	H	S, H	H	H	1, 2	Folch-Mallol, <i>et al.</i> , 1996
<i>Ensifer meliloti</i> RCR2011	C <sub>16:1</sub> , C <sub>16:2</sub> , C <sub>16:3</sub>	H	H	H, Ac	S	H	H	1, 2	Lerouge, <i>et al.</i> , 1990, Ardourel, <i>et al.</i> , 1994







**Figura V.5. Análisis por HPLC y espectrometría MS/MS de los LCOs purificados.** La figura muestra los perfiles de ruptura para un NF característico de las preparaciones. En el panel A se muestra el espectro de un NF sulfatado de *R. sp.* LPU83 (pMP604), el ion evaluado posee una relación  $m/z = 1348,4$  (marcado con un recuadro rojo), obtenido a un tiempo de retención de 14,2 min (Correspondiente a V(C18:2,NMe,S)). Mientras que el primer pico, marcado en celeste presenta  $m/z = 1268,48$ . La diferencia entre estas relaciones coincide con la pérdida del sulfato antes de la ruptura, lo que suele suceder por lo lábil del enlace. En el panel B se muestra el espectro de masa de un NF de la cepa *R. sp.* LPU83-H (pMP604), el ion evaluado posee una relación  $m/z = 1268,48$  (marcado con un recuadro rojo), obtenido a un tiempo de retención de 14,0 min (Correspondiente a V(C18:2,NMe)). El primer pico, marcado en celeste presenta  $m/z = 1268,48$ , demostrando que no ha cambiado su estructura al momento de la ruptura. Con flechas rojas se indica los picos correspondientes a las rupturas características de los NFs.

### V.7. Efecto de la sobreproducción de NFs en el comportamiento simbiótico de la cepa *R. sp. LPU83*.

Los rizobios tipo Oregon tienen un fenotipo de nodulación peculiar. Como se mencionó previamente, la cepa *R. sp. LPU83-H* no requiere variantes sulfatadas de NFs para nodular alfalfa. *R. sp. LPU83-H* también posee la capacidad de nodular *Phaseolus vulgaris* y *L. leucocephala*. Estudios previos demostraron que los rizobios tipo Oregon no son capaces de inducir una simbiosis eficiente con alfalfa, y luego de haber observado la pobre inducción en la producción de NFs en esta cepa (ver sección V.5), nos preguntamos si este efecto podría ser el responsable de la deficiencia en la simbiosis. Para evaluar esta cuestión, se comparó el comportamiento simbiótico de la cepa *R. sp. LPU83* y de la cepa sobreproductora de NFs, *R. sp. LPU83 (pMP604)*. En la figura V.6 se observa la cinética de nodulación de ambas cepas. La cepa *R. sp. LPU83 (pMP604)* comienza a nodular entre 2 y 3 días antes que la cepa *R. sp. LPU83*, y también se observa que el número de nódulos formados por planta por la cepa sobreproductora de NFs es mayor. Si bien se observó una leve mejoría en la cinética de nodulación inducida por la presencia del plásmido pMP604 y la sobreproducción de NFs, no se encontraron diferencias significativas en el peso seco de las plantas, indicando que la deficiencia en la fijación de nitrógeno en alfalfa deriva de deficiencias en otras señales y/o determinantes simbióticos diferentes de los NFs.

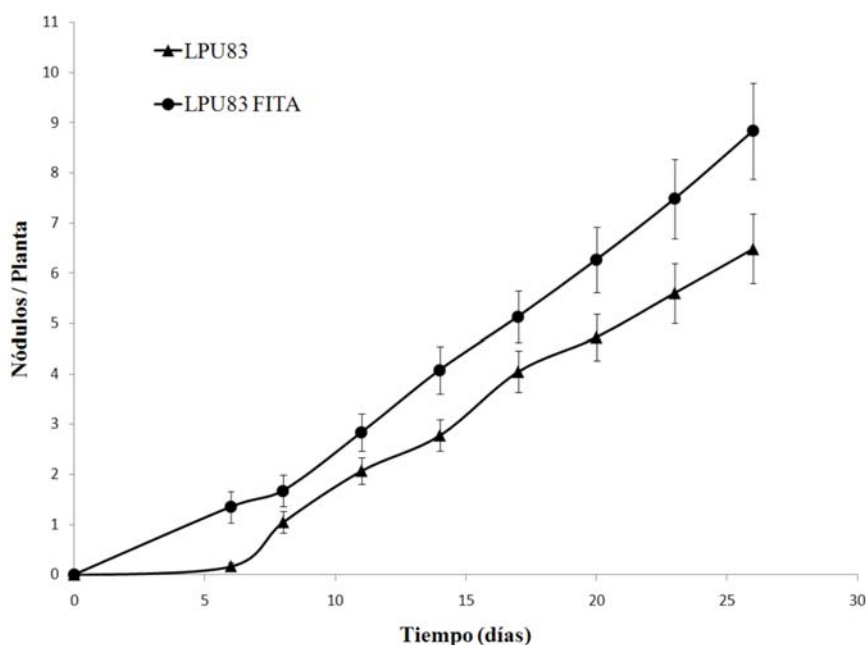


Figura V.6. Cinéticas de aparición de nódulos en raíces de alfalfa de las cepas *R. sp. LPU83* y la sobreproductora de NFs, *R. sp. LPU83 (pMP640)*. Las plantas fueron inoculadas con aproximadamente  $10^5$  bacterias por planta. La aparición de nódulos fue evaluada en los tiempos mencionados. Los resultados se indican como el número promedio de nódulos por planta. Las barras de error indican la desviación estándar.

Con el objetivo de caracterizar la interacción entre los rizobios tipo Oregon y la alfalfa, en este capítulo hemos realizado la caracterización y el estudio de la organización genética del *cluster* de genes de nodulación, como así la determinación de la estructura química de los factores de nodulación de la cepa de amplio rango de hospedadores *Rhizobium* sp. LPU83.

Uno de los aspectos centrales del análisis genético y simbiótico de los rizobios tipo Oregon es recabar información para ayudar a desentrañar la evolución de los rizobios noduladores de *Medicago* spp., y sus mecanismos de diversificación y evolución. Recientemente, Bailly *et al.* (2007) han sugerido que la especie *Ensifer* adquirió la capacidad de nodular plantas del género *Medicago* a través de la incorporación de los genes de nodulación por transferencia horizontal desde un rizobio predecesor; esta hipótesis ha sido sustentada por la falta de congruencia entre la filogenia de genes *housekeeping* y genes simbióticos. Así, han propuesto a *Rhizobium mongolense* como el posible antecesor, debido a que esta especie aparece como el primer linaje entre los simbiotes de *Medicago* en los análisis filogenéticos de genes *nodABC* y *nodEG*. En nuestros análisis de IGS<sub>NOD</sub>, la cepa *R.* sp. LPU83 se ubica en el mismo grupo que *R. mongolense* USDA1844 indicando que los rizobios tipo Oregon pueden representar un genotipo temprano de bacterias noduladoras de alfalfa. Una similitud, aún mayor entre los rizobios tipo Oregon y *R. mongolense* es soportada por la cercana relación de su 16S rDNA (Laguerre, *et al.*, 2001). Como ya mencionamos, estas bacterias forman un clado independiente en los rizobios capaces de nodular alfalfa.

Las diferencias observadas en los genes *nodD* junto a la ausencia de *syrM* en la cepa *R.* sp. LPU83 pueden estar relacionadas a la falta de transcripción observada en la fusión transcripcional ya sea con flavonoides o exudados de semilla. La inducción de la producción de NFs también fue estudiada por RP-TLC, donde los resultados previamente obtenidos fueron corroborados. No es posible descartar que un flavonoide no evaluado pueda ser capaz de inducir la producción de NFs.

Por otro lado, la idea de que las deficiencias en la transcripción del cluster *nod* estén relacionadas con impedimentos en la estructura/activación de la proteína NodD fue reforzada ya que la inducción de la transcripción pudo ser observada por la introducción del *nodD*<sub>FITA</sub>.

Más allá de estas consideraciones, las señales producidas por los rizobios tipo Oregon son capaces de promover la nodulación de *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala* y otras leguminosas. Debido a esto es que estudiamos las señales involucradas en la interacción temprana entre planta y bacteria. Así, aislamos los NFs producidos por *R.*

sp. LPU83 y analizamos su estructura química por HPLC-MS/MS, encontrando características comunes entre los sustituyentes de los NFs de *R. sp. LPU83* y las cepas noduladoras de alfalfa o poroto. Además de la caracterización de los NFs de la cepa salvaje *R. sp. LPU83*, es importante el resultado del análisis de los NFs del mutante *nodH* de la cepa *R. sp. LPU83*. Este mutante previamente descrito posee la capacidad de nodular alfalfa (Del Papa, *et al.*, 2007). En nuestros estudios hemos podido demostrar que la nodulación de alfalfa por el mutante *nodH* no necesita de NFs sulfatados. En el contexto de que los NFs sulfatados son esenciales para a nodulación de alfalfa (Faucher, *et al.*, 1988; Cloutier, *et al.*, 1996; Wais, *et al.*, 2002), los resultados presentados abren un nuevo campo para explorar otras señales que estén involucradas en la nodulación de alfalfa.

# **Capítulo VI**

**Estudios de la transferencia  
conjugativa de los plásmidos  
de *Rhizobium* sp. LPU83**



## **VI.1. *Introducción.***

Los plásmidos se encuentran presentes en todas las ramas de los linajes bacterianos y han sido encontrados en todas las comunidades bacterianas estudiadas hasta el momento, incluyendo ambientes terrestres, marinos y clínicos (Sorensen, *et al.*, 2005). Al presentar características únicas que contribuyen a la plasticidad genómica, los plásmidos se han convertido en elementos clave en el proceso de adaptación y divergencia de las poblaciones de bacterias. Un plásmido se puede perder, recuperar, e incluso puede cambiar el contenido de su información genética o su número de copias. Esta capacidad es consistente con el papel de los plásmidos como mediadores de los cambios evolutivos dentro de una población o una especie dada (Smets & Barkay, 2005).

Una característica distintiva de los rizobios es la extensa cantidad de información genética codificada en plásmidos de gran tamaño y bajo número de copias, que constituyen un alto porcentaje del genoma bacteriano. El número de plásmidos y el tamaño de los mismos varía de acuerdo a la especie. La transferencia conjugativa de plásmidos naturales de rizobios ha sido reportada desde hace décadas, tanto para los plásmidos simbióticos como para los crípticos, siendo algunos de ellos auto-transmisibles y otros movilizables (Johnston, *et al.*, 1978; Hooykaas, *et al.*, 1982; Kondorosi, *et al.*, 1982; Truchet, *et al.*, 1984; Hooykaas, *et al.*, 1985; Mercado-Blanco & Olivares, 1993; Rao, *et al.*, 1994; Pistorio, *et al.*, 2003; Pérez-Mendoza, *et al.*, 2004). El estudio de la transmisibilidad de los plásmidos constituye una manera efectiva de evaluar sus roles funcionales y evolutivos. Debido a lo anteriormente mencionado, en este capítulo evaluaremos la transmisibilidad de los plásmidos de los rizobios tipo Oregon.

## **VI.2. *Marcación de los plásmidos de Rhizobium sp. LPU83 por medio de un transposón Tn5-B10.***

Como ya hemos mencionado la cepa de referencia *R. sp.* LPU83 contiene 3 plásmidos denominados pLPU83a de 150 kpb, pLPU83b de 1,37 Mpb y pLPU83c de 1,92 Mpb. El plásmido pLPU83b ha sido identificado como el plásmido simbiótico, ya que porta los genes de nodulación y fijación de nitrógeno. Con el objetivo de estudiar las características conjugativas de los replicones extracromosomales de la cepa *R. sp.* LPU83, se realizó una mutagénesis generalizada con el transposón Tn5B10 (Nm-mob) (Simon, *et al.*, 1989) para marcar cada uno de los plásmidos (Figura VI.1.A). Mediante geles de lisis *in situ* e

hibridación de los mismos con una sonda IS50, los transconjugantes obtenidos ( $Sm^r Nm^r$ ) fueron evaluados para ubicar en qué replicón se insertó el transposón. Los mutantes Tn5 que mostraron una señal positiva de hibridación en los plásmidos fueron evaluados nuevamente para confirmar los resultados (Figura VI.1.B). Para verificar que los mutantes eran independientes unos de otros, de cada uno de ellos se preparó ADN total, se lo digirió con *BamHI* y se realizó un *Southern-blot* con una sonda IS50. Los mutantes que mostraron diferentes patrones de hibridación fueron seleccionados para posteriores estudios.

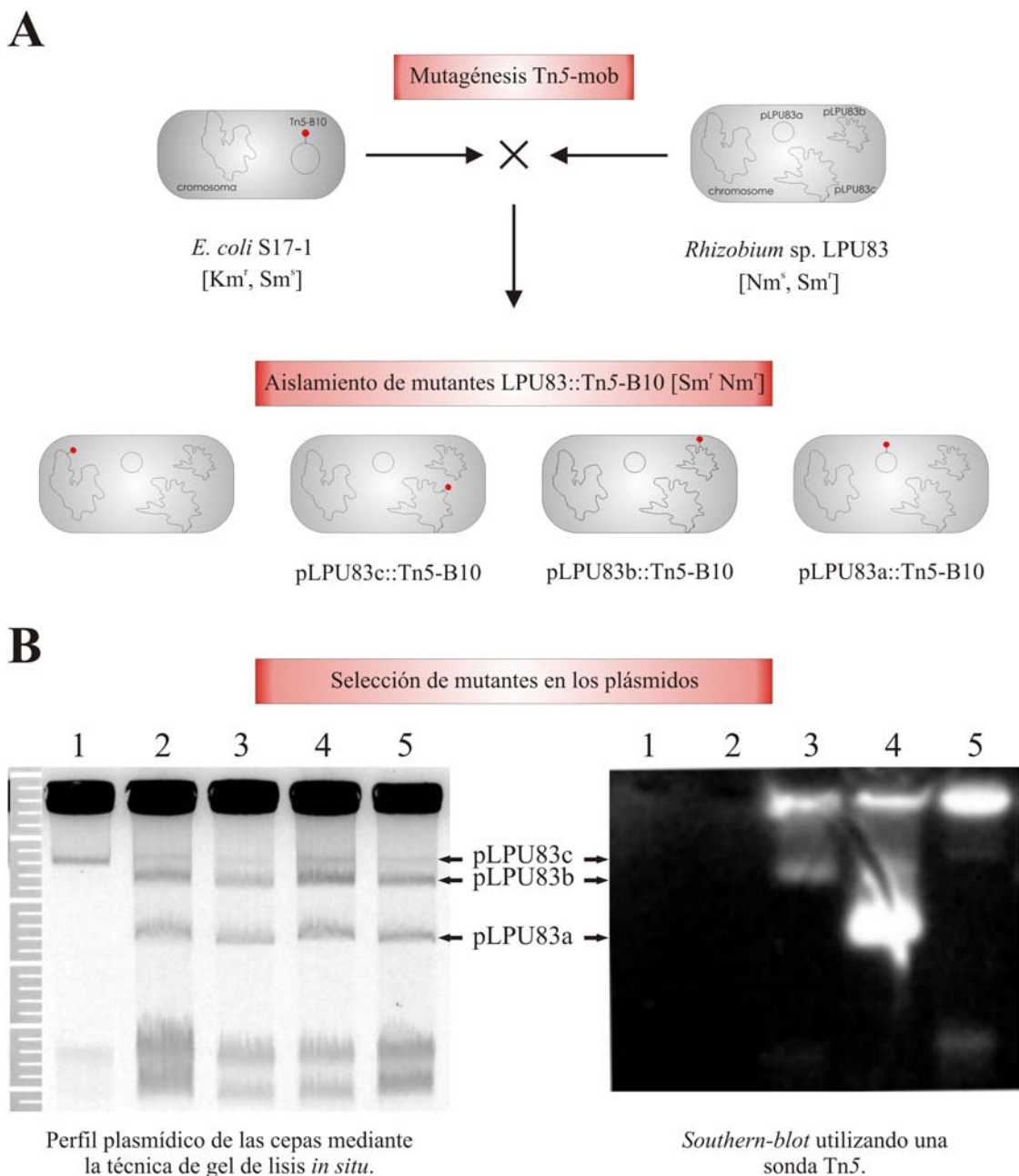
Con los mutantes identificados que poseían los plásmidos marcados realizamos ensayos de conjugación usando dichos mutantes como donadores y la cepa *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2 ( $Rifa^r$ ) como receptora. El plásmido pLPU83a fue transferido a UBAPF2 con una frecuencia de *ca.*  $2 \times 10^{-6}$  por célula receptora (Figura VI.2; Tabla VI.1). El plásmido pLPU83a también pudo ser transferido a *Ensifer meliloti* 2011-Sp, *E. meliloti* SmA818R y *Rhizobium etli* CFNX89R. Para determinar si dicho plásmido era auto-transmisible (conjugativo) o requería funciones de ayuda presentes en *trans* (movilizable), se realizaron conjugaciones usando como donadoras las cepas 2011-Sp (pLPU83a::Tn5B10), SmA818R (pLPU83a::Tn5B10) o CFNX89R (pLPU83a::Tn5B10) y como receptora, UBAPF2, *A. tumefaciens* UBAPF2G ( $Gm^r$ ) o *E. meliloti* 20MP6 ( $Tc^r$ , GFP) (Pistorio, *et al.*, 2002). Las frecuencias de conjugación obtenidas para el plásmido pLPU83a usando como donadoras a 2011-Sp, SmA818R o CFNX89R fueron similares a las frecuencias obtenidas desde la cepa *R. sp.* LPU83 (Tabla VI.1). Llamativamente, no pudimos detectar la transferencia del plásmido cuando la cepa UBAPF2 (pLPU83a) fue utilizada como cepa donadora.

Los dos mutantes Tn5B10 independientes en el plásmido pLPU83b pudieron ser transferidos a UBAPF2, pero la frecuencia obtenida fue muy baja, *ca.*  $8 \times 10^{-10}$  transconjugantes por célula receptora (Figura VI.2, Tabla VI.1). En este caso, también investigamos las propiedades conjugativas de este plásmido desde diferentes entornos genéticos. Cuando fueron utilizadas como cepas donadoras UBAPF2 (pLPU83b::Tn5) o SmA818 (pLPU83b::Tn5), denominada SmA818B, y como receptora UBAPF2G, no fue posible la obtención de transconjugantes (Tabla VI.1). De esta manera, pudimos concluir que el plásmido pLPU83b no es auto-transmisible en los contextos genéticos brindados por las cepas UBAPF2 o SmA818.

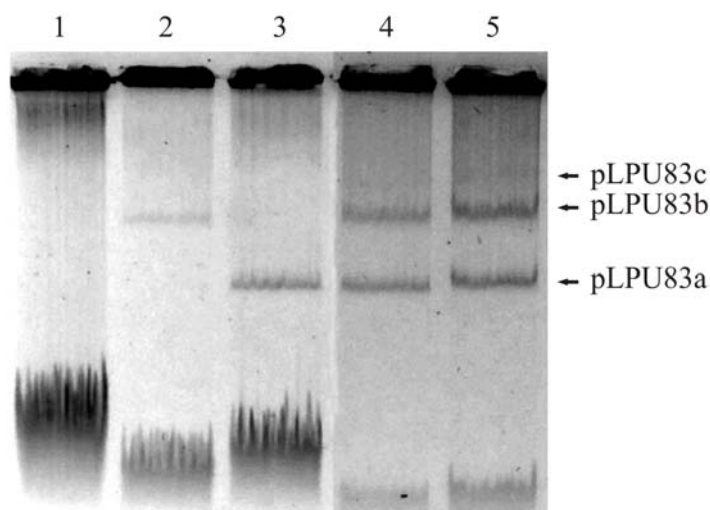
La presencia de funciones de ayuda para la conjugación ha sido descripta previamente en rizobios (Herrera-Cervera, *et al.*, 1996; Pistorio, *et al.*, 2003), por lo que evaluamos si las funciones necesarias para movilizar el plásmido pLPU83b se encontraban presentes en pLPU83a. Con dicho objetivo, utilizamos como donadora una cepa conteniendo ambos



plásmidos en un entorno genético distinto a la cepa *R. sp.* LPU83. La cepa Sma818 (pLPU83b::Tn5, pLPU83a), denominada Sma818AB, fue ensayada en la capacidad de transferencia del plásmido simbiótico y obtuvimos transconjugantes usando como receptora la cepa UBAPF2G. A partir de estas evidencias podemos concluir que el plásmido pLPU83a es necesario para la transferencia conjugativa de pLPU83b.



**Figura VI.1 Esquema de la estrategia general utilizada para la marcación e identificación de mutantes en los distintos plásmidos de la cepa *R. sp.* LPU83.** En el panel A se observan las diferentes posibles inserciones del transposón en el genoma de nuestra bacteria de interés. En el panel B, a la izquierda se observan los perfiles plasmídicos obtenidos de diferentes transconjugantes. En el panel B, a la derecha se observa el resultado de la hibridación y revelado con una sonda para identificar la presencia del transposón. Línea 1, *E. meliloti* Sma818. Línea 2, *R. sp.* LPU83. Línea 3, *R. sp.* LPU83 (pLPU83b::Tn5-B10). Línea 4, *R. sp.* LPU83 (pLPU83a::Tn5-B10). Línea 5, *R. sp.* LPU83 (pLPU83c::Tn5-B10).



**Figura VI.2 Perfiles plasmídicos en gels de lisis *in situ*.** Perfiles plasmídicos de los transconjugantes obtenidos de las conjugaciones de *R. sp.* LPU83-5 y *R. sp.* LPU83-13 con *A. tumefaciens* UBAPF2. Línea 1, UBAPF2. Línea 2, UBAPF2 (pLPU83b::Tn5). Línea 3, UBAPF2 (pLPU83a::Tn5). Línea 4, *R. sp.* LPU83-5 (pLPU83b::Tn5). Línea 5, *R. sp.* LPU83-13 (pLPU83a::Tn5).

**Tabla VI.1. Frecuencias de conjugación de los plásmidos de LPU83 en diferentes entornos genómicos <sup>a</sup>.**

Cepa Donadora	Cepa Receptora	Frecuencia de Conjugación <sup>b</sup>
<i>R. sp.</i> LPU83 (pLPU83a::Tn5-B10)	UBAPF2.	$2,07 \pm 1,45 \times 10^{-06}$
2011-Sp (pLPU83a::Tn5-B10)	20MP6	$5,58 \pm 2,06 \times 10^{-06}$
Sma818 (pLPU83a::Tn5-B10)	20MP6	$2,48 \pm 0,38 \times 10^{-06}$
CFNX89 (pLPU83a::Tn5-B10)	UBAPF2	$4.84 \pm 5,74 \times 10^{-05}$
UBAPF2 (pLPU83a::Tn5-B10)	20MP6	n.d. <sup>c</sup>
<i>R. sp.</i> LPU83 (pLPU83b::Tn5-B10)	UBAPF2G	$7,8 \pm 7,6 \times 10^{-10}$
Sma818 (pLPU83b::Tn5-B10)	UBAPF2G	n.d. <sup>c</sup>
Sma818 (pLPU83b::Tn5-B10, pLPU83a)	UBAPF2G	$5,7 \pm 4,4 \times 10^{-10}$
<i>R. sp.</i> LPU83 (pLPU83c::Tn5-B10)	UBAPF2	n.d. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Todas las conjugaciones fueron repetidas al menos 4 veces.

<sup>b</sup> Las frecuencias de conjugación se encuentran expresadas en transconjugantes por célula receptora.

<sup>c</sup> n.d., no detectable (debajo de  $1 \times 10^{-10}$ ).

Al utilizar dos mutantes Tn5B10 independientes en el plásmido pLPU83c como cepas donadoras, no nos fue posible obtener transconjugantes, concluyendo así que el plásmido no es transmisible en las condiciones de laboratorio o lo es a una frecuencia menor a nuestro límite de detección (menor que  $10^{-10}$  transconjugantes por receptora).

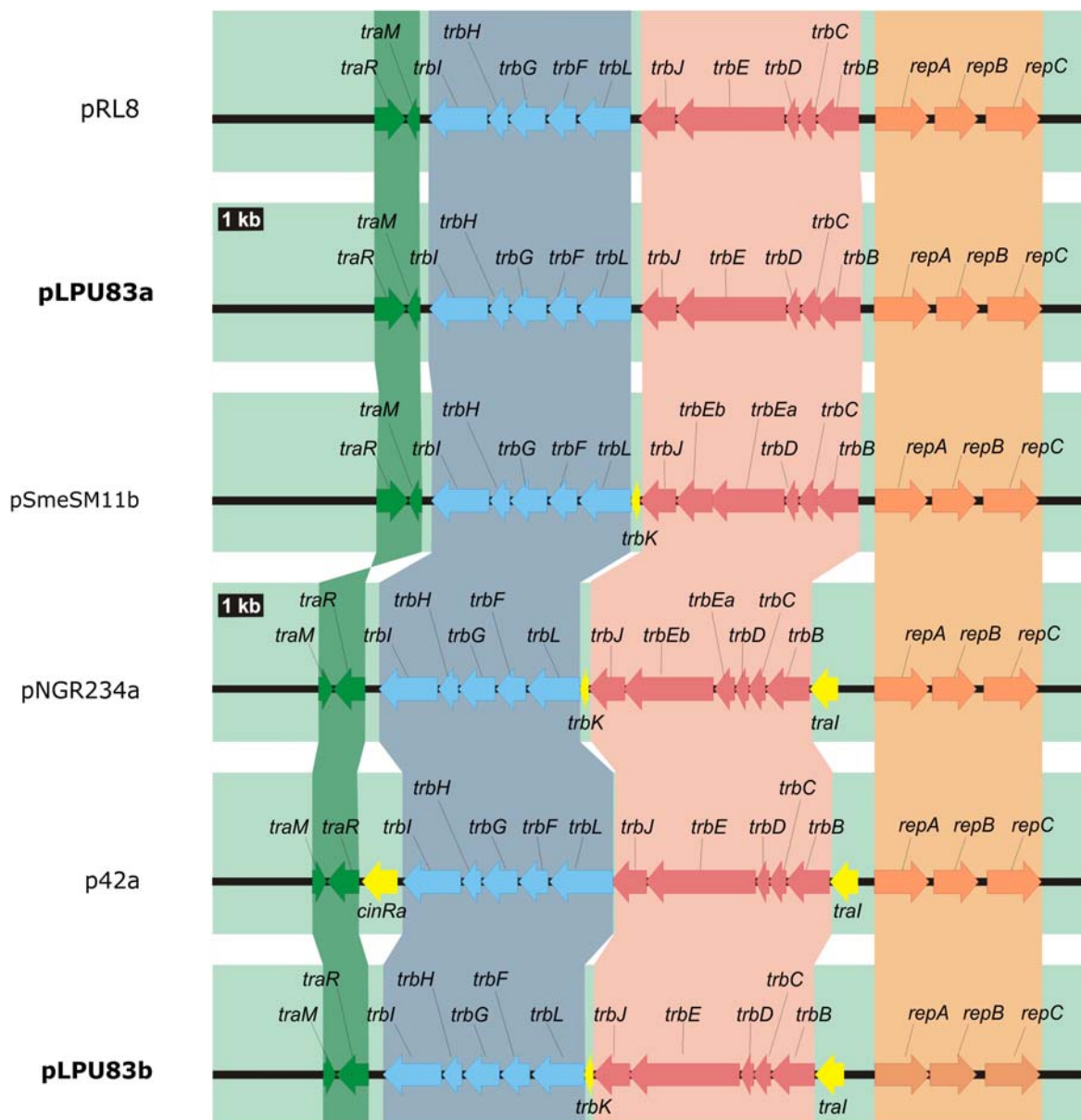
### VI.3. Estudio de las regiones genéticas involucradas en la conjugación presentes en *R. sp.* LPU83.

Los sistemas de transferencia conjugativa se encuentran codificados en un grupo de genes de transferencia. Este *cluster* se encuentra compuesto por dos regiones que codifican para diferentes procesos moleculares, la región implicada en la transferencia y replicación del ADN (Dtr, *DNA transfer replication*) y la región involucrada en la síntesis del aparato

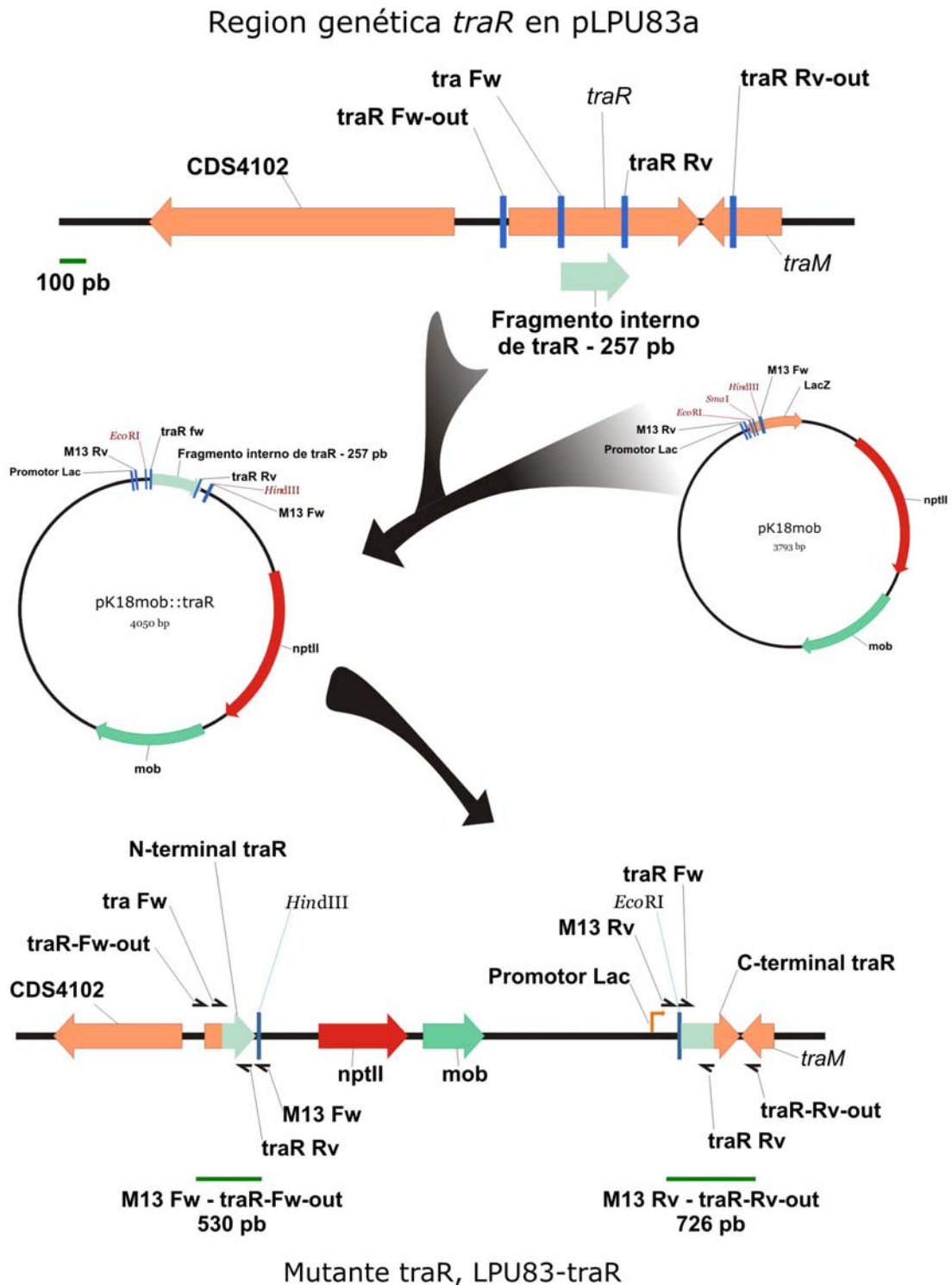
conjugativo (Mpf, *Mating pair formation*). El Dtr suele contener el origen de transferencia (*oriT*) y los genes que codifican para las proteínas involucradas en el procesamiento del ADN. El Mpf consiste en genes que codifican para el pili conjugativo y las proteínas involucradas en la formación de complejos que realizan el apareamiento entre células. Con el fin de determinar la presencia de este tipo de sistemas en los rizobios tipo Oregon se buscaron en el genoma de la cepa *R. sp.* LPU83 las secuencias de los genes involucrados en la conjugación. Se lograron encontrar tres regiones de genes de transferencia, una situada en cada plásmido. La comparación de la estructura génica de las regiones Dtr de los plásmidos pLPU83a y pLPU83b entre sí y con otros plásmidos ya descritos no presentan diferencias (Figura IV.15 y Figura IV.16) (Ding & Hynes, 2009). Al realizar la misma comparación ahora con las regiones del Mpf se observó que si bien las regiones se encuentran conservadas presentaban diferencias entre ellas (Figura VI.3). La principal diferencia fue la carencia del gen *traI* en el *cluster* del plásmido pLPU83a. Esta ausencia también se observó en los plásmidos pRL8 (del cual no se ha determinado si es autotransmisible o movilizable (Ding & Hynes, 2009)) y pSmeSM11b (no autotransmisible (Stiens, *et al.*, 2007)). Previamente se ha demostrado que la transferencia conjugativa de plásmidos desde cepas de *Rhizobium* o *Agrobacterium* está regulada por *quórum-sensing* (QS) mediado por los genes *traR* y *traI* (Gonzalez & Keshavan, 2006). *traI* codifica para una homoserina-lactona sintasa, responsable de la producción de un autoinductor que pertenece a la familia de N-acil-homoserina lactonas (HSL), y junto a TraR representan un sistema regulador del tipo *luxR/luxI* que activan la expresión de ciertos genes por QS. TraI es esencial para la transferencia conjugativa de los plásmidos pTiC58 y p42a (Li, *et al.*, 1999; Tun-Garrido, *et al.*, 2003). De acuerdo a los modelos propuestos, los complejos formados por TraR y las HSL sintetizadas por TraI son capaces de unirse a los promotores de los genes de transferencia, activando la expresión de los mismos y permitiendo la conjugación.

Con el objetivo de conocer si la transferencia del plásmido autotransmisible pLPU83a podría encontrarse regulada por fenómenos de QS realizamos una mutagénesis insercional sitio dirigida sobre el gen *traR*. Para ello, se clonó un fragmento interno de *traR* de 257 pb en un plásmido suicida en rizobios (pK18mob) según se esquematiza en la Figura VI.4 y el vector resultante se introdujo por conjugación en la cepa *R. sp.* LPU83. Una vez obtenido el mutante, denominado *R. sp.* LPU83-*traR*<sup>-</sup>, y estudiada la correcta inserción por PCR se procedió a utilizarlo como donador en una conjugación, utilizando UBAPF2 como cepa receptora. El ensayo de conjugación se repitió tres veces y en ninguno de ellos se obtuvieron transconjugantes. La complementación con el gen *traR* salvaje en *trans* desde el plásmido pBBR1MCS5::*traR* (ver Materiales y Método, sección II.4.o) en el mutante

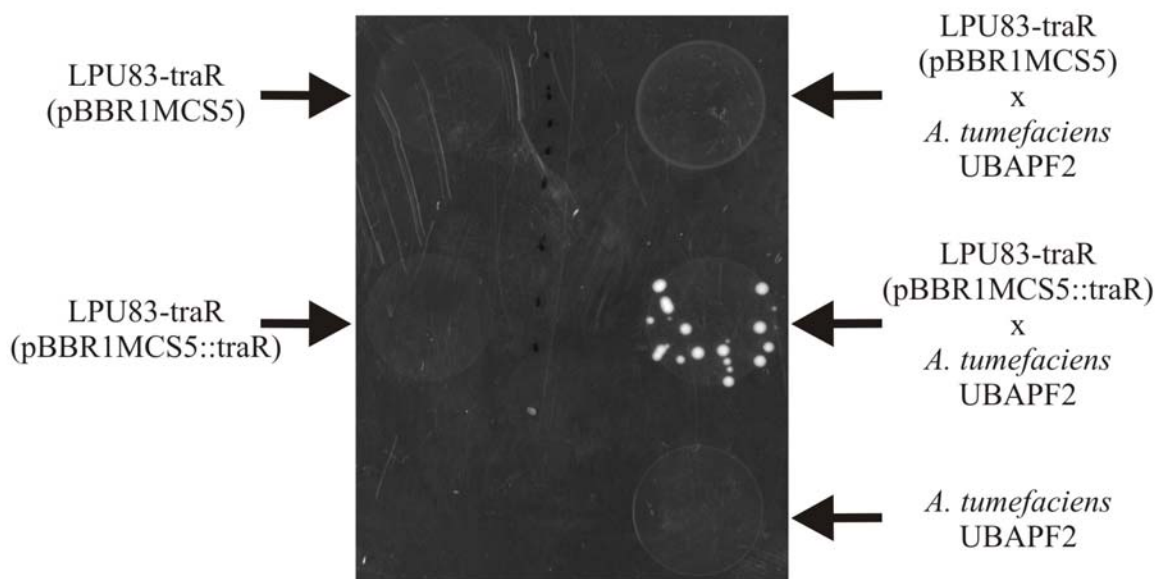
previamente descrito nos permitió restaurar la transferencia conjugativa de pLPU83a (Figura VI.5). Estos resultados nos dan la pauta de que pueden existir fenómenos de QS en *R. sp. LPU83* implicados en la activación de la transferencia conjugativa del plásmido pLPU83a.



**Figura VI.3. Comparación de los mapas genéticos de los Mpf presentes en *R. sp. LPU83*.** Se observó una elevada sintenia genética entre los plásmidos comparados. Puede observarse en amarillo los genes que no se encuentran representados en todos los Mpf representados.



**Figura VI.4. Esquema de la mutagénesis sitio dirigida en *traR*.** Un fragmento interno de *traR* fue amplificado por PCR y clonado en el vector pK18mob. El vector resultante fue transferido a *R. sp.* LPU83, donde se integró para generar el mutante *R. sp.* LPU83-*traR*. Los productos de PCR amplificados para evaluar la correcta inserción se muestran en la figura.



**Figura VI.5. Complementación del mutante *R. sp.* LPU83-traR<sup>-</sup>.** En la figura se observan los resultados de la conjugación entre el mutante *R. sp.* LPU83-traR<sup>-</sup> con el vector pBBR1MCS5 y el mutante *R. sp.* LPU83-traR<sup>-</sup> complementado con el vector pBBR1MCS5::traR como donadores y UBAPF2 como receptora. Ambas cepas fueron evaluadas en su capacidad de restaurar la capacidad de *R. sp.* LPU83 para transferir el plásmido pLPU83a. Solo se obtuvieron transconjugantes cuando el mutante complementado fue utilizado como cepa donadora.

En sistemas similares se ha descrito que TraR es biológicamente activo cuando puede unirse a una HSL (Pappas, *et al.*, 2004; Pinto & Winans, 2009). Como se mencionó previamente, la síntesis de las HSL es mediada por el gen *traI*, el cual se encuentra ausente en el plásmido pLPU83a. Debido a los resultados obtenidos de la transferencia de pLPU83a desde diferentes entornos genéticos y la ausencia de *traI* en el mismo, realizamos una búsqueda *in silico* de genes ortólogos a *traI* en los rizobios usados como donadores de pLPU83a::Tn5. *E. meliloti* posee ortólogos de *traI* en el cromosoma, *R. etli* los posee tanto en su cromosoma como en sus plásmidos, mientras que distintas cepas de *Agrobacterium* solamente poseen *traI* en sus plásmidos. La cepa de *A. tumefaciens* utilizada fue UBAPF2, la cual no posee plásmidos. De esta manera, los resultados de la transferencia de pLPU83a se correlacionan con la presencia o ausencia de *traI*, y como consecuencia de la síntesis de HSL. La búsqueda de genes ortólogos a *traI* en el genoma de *R. sp.* LPU83 dio como resultado tres posibles candidatos que podrían estar involucrados en el fenómeno descrito y que serán estudiados en un futuro cercano.

En este capítulo se ha estudiado la transmisibilidad de los plásmidos de *Rhizobium sp.* LPU83 y que factores están involucrados en la misma. Nuestros estudios han demostrado que pLPU83a puede ser transferido desde diferentes entornos genéticos y dichos resultados

se correlacionan con la capacidad de complementar la carencia de *traI* en pLPU83a. La mutación en el gen *traR* del plásmido pLPU83a provocó la pérdida de las funciones conjugativas. Estos resultados sugieren que puede existir un fenómeno del tipo de QS involucrado en la regulación de la transferencia de pLPU83a. Previamente se ha reportado que plásmidos autotransmisibles responden a diferentes señales ambientales (Zambryski, *et al.*, 1989; Beck von Bodman, *et al.*, 1992; Danino, *et al.*, 2003; Tun-Garrido, *et al.*, 2003). También han sido presentadas evidencias de regulación de la expresión de los genes de transferencia por QS en otros rizobios como *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg, *et al.*, 1997; He, *et al.*, 2003), *Ensifer meliloti* AK631 (Marketon & Gonzalez, 2002), y *Rhizobium etli* CFN42 (Tun-Garrido, *et al.*, 2003). Por otro lado, se encontró que pLPU83b, el plásmido simbiótico, puede ser transferido a muy bajas frecuencias en condiciones de laboratorio y solamente cuando pLPU83a se encuentra presente. Indudablemente, ciertas funciones codificadas en pLPU83a ayudan a la transferencia del plásmido simbiótico. Por último, no hemos logrado transferir el plásmido pLPU83c en las condiciones de laboratorio utilizadas.

En el próximo capítulo se estudiará la importancia de los plásmidos transmisibles de *R. sp.* LPU83 en la simbiosis con alfalfa, con el propósito de entender su rol en la evolución de los simbioses de *Medicago*.





# **Capítulo VII**

**Influencia de los plásmidos  
transmisibles de *Rhizobium* sp.  
LPU83 en la simbiosis**



## VII.1. *Introducción.*

Una característica general en especies de rizobios es la presencia de grandes cantidades de ADN extracromosomal en plásmidos. Estos plásmidos varían en número (1 a 10) y tamaño (10 Kpb a 2 Mpb), y muchos de ellos tienen roles importantes en la asociación de los rizobios con la planta hospedadora (García de los Santos, *et al.*, 1996; Mercado-Blanco & Toro, 1996). La mayoría de los genes requeridos para el proceso simbiótico se encuentran localizados en los llamados plásmidos simbióticos (pSym). Por otro lado, los rizobios portan numerosos plásmidos que no son esenciales para la nodulación, conocidos como plásmidos no simbióticos, crípticos o accesorios (García de los Santos, *et al.*, 1996; Mercado-Blanco & Toro, 1996). El estudio de estos plásmidos no esenciales para la nodulación ha permitido descubrir que pueden conferir ciertas propiedades, no indispensables para la simbiosis, pero que aumentan la capacidad de la población bacteriana para colonizar y competir en comunidades naturales.

Una aproximación general para el análisis de las funciones codificadas en los plásmidos involucra el aislamiento de bacterias derivadas de la cepa salvaje pero que no posean el plásmido a estudiar (bacterias curadas de su plásmido). El análisis de cepas curadas de sus plásmidos en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *Rhizobium etli* ha demostrado que los genes requeridos para alcanzar niveles de competición como en la cepa salvaje se encuentran presentes en varios de los plásmidos no simbióticos (Sanjuan & Olivares, 1989; Hynes & McGregor, 1990; Brom, *et al.*, 1992; Soto, *et al.*, 1993). Una forma diferente y ampliamente utilizada para estudiar las funciones de los plásmidos es la construcción de derivados que adquieran los mismos por conjugación. Mediante esta aproximación, cepas de rizobios han sido identificadas como más competitivas al adquirir un plásmido no simbiótico de 255 Kpb de la cepa *R. etli* CFN299 (Martínez-Romero & Rosenblueth, 1990). También ha sido descrito que algunos plásmidos pueden influir negativamente en la efectividad simbiótica. La pérdida de un plásmido críptico en *Mesorhizobium loti* aumenta la fijación de nitrógeno y la competitividad en la nodulación (Pankhurst, *et al.*, 1986). Selbitschka & Lotz (1991) demostraron que ciertas deleciones en un plásmido críptico de *R. leguminosarum* bv. *viciae* resultan en una nodulación efectiva en un huésped previamente no efectivo.

En el Capítulo precedente hemos caracterizado los plásmidos presentes en la cepa *Rhizobium* sp. LPU83 en sus funciones de transferencia. Teniendo en cuenta el rol central que ocupan los plásmidos de los rizobios en el comportamiento de estos microorganismos,

en este capítulo se estudiará la influencia de los plásmidos transmisibles de la cepa *R. sp.* LPU83, pLPU83a y pLPU83b, en la interacción simbiótica con alfalfa.

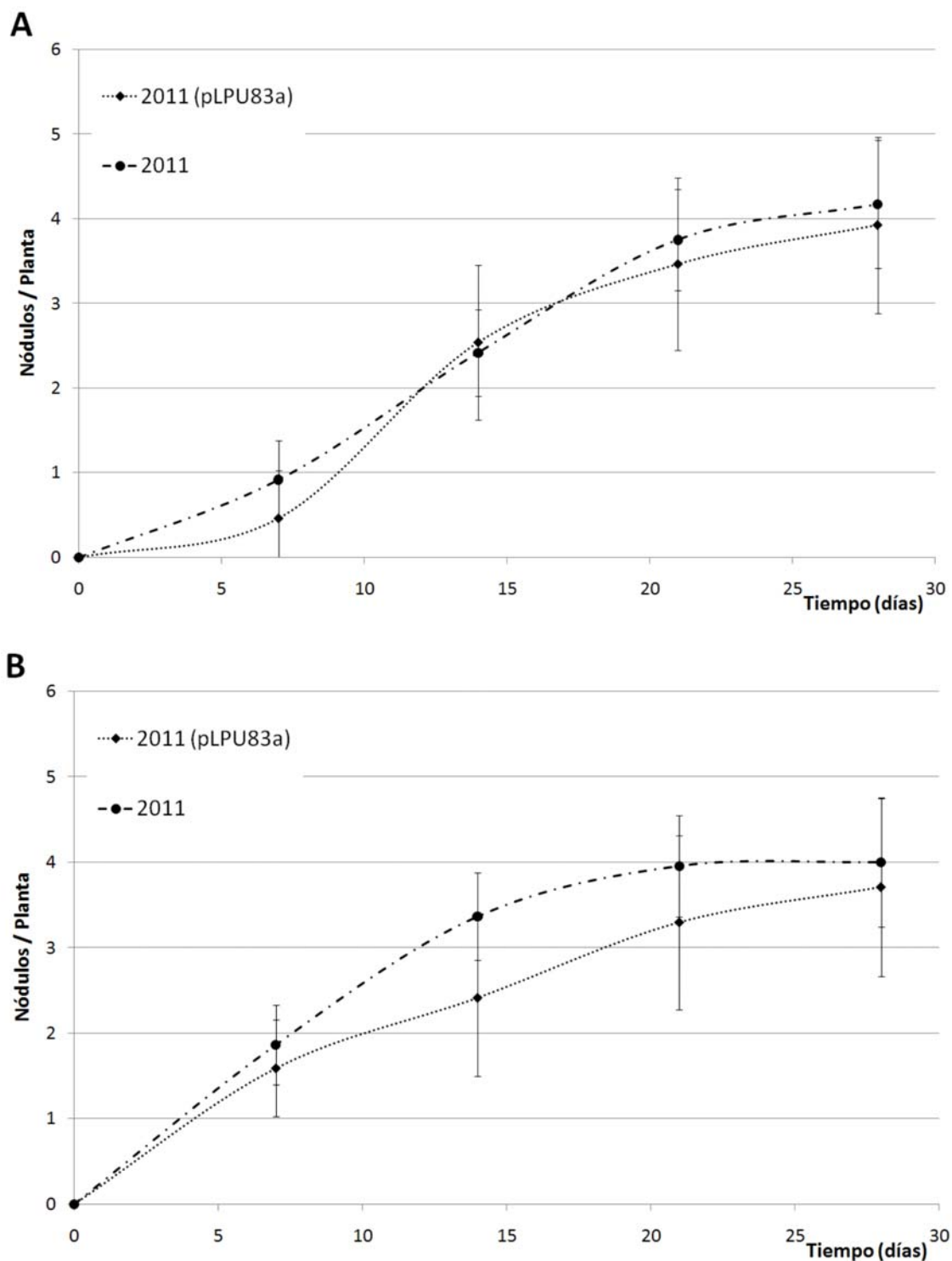
## VII.2. *Caracterización funcional del plásmido pLPU83a.*

Algunos plásmidos crípticos han sido descritos como moduladores de la competición de su cepa hospedadora en la nodulación (Sanjuan & Olivares, 1989; Hynes & McGregor, 1990; Brom, *et al.*, 1992; Soto, *et al.*, 1993). Los plásmidos no simbióticos pueden estar involucrados en la biosíntesis de bacteriocinas que también ejercen un efecto modulador en la competitividad (Hirsch, *et al.*, 1980; Johnston, *et al.*, 1982). Con el propósito de evaluar si la presencia del plásmido pLPU83a está asociada a cambios en la simbiosis, la cepa de *Ensifer meliloti* 2011 portadora del plásmido anterior fue analizada en capacidad de modificar la cinética de nodulación, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y su competitividad frente a la misma cepa libre de plásmidos crípticos

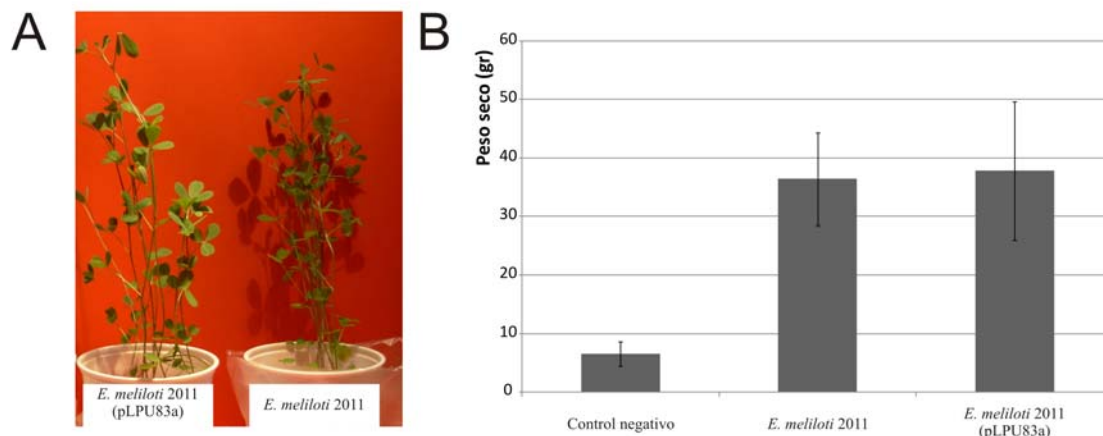
En una primera etapa se evaluó la cinética de nodulación en plantas de alfalfa de la cepa de *E. meliloti* 2011 (pLPU83a) comparándola con la de *E. meliloti* 2011. Como ya hemos mencionado en la introducción de esta Tesis, *R. sp.* LPU83 es capaz de nodular alfalfa tanto a pH ácido como neutro, por lo que las cinéticas de nodulación fueron llevadas a cabo en medio Fåhraeus, modificado por Lodeiro, *et al.* (2000), a pH 7,0 o 5,6. Los resultados de estos experimentos indicaron que las bacterias, ya sea portadoras o no del plásmido críptico, muestran cinéticas similares en ambas condiciones de pH (Figura VII.1), alcanzando a las 2-3 semanas un máximo número de nódulos. De esta manera, se determinó que el plásmido pLPU83a no modifica la cinética de nodulación de *E. meliloti* 2011 en ninguna de las condiciones ensayadas.

En forma paralela se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de estas cepas, es decir, se decidió evaluar si el plásmido pLPU83a podía conferir una mayor, o quizás menor, eficiencia en FBN. La FBN fue estimada a través del peso seco de la parte aérea de plantas de alfalfa inoculadas y cultivadas en vermiculita con medio Fåhraeus (libre de nitrógeno). Como se muestra en la Figura VII.2.A, las plantas de alfalfa inoculadas con *E. meliloti* 2011 (pLPU83a) eran similares a las inoculadas con la cepa *E. meliloti* 2011. El peso seco obtenido para las mismas no mostró diferencias significativas entre ambas cepas (Figura VII.2.B). Debido a que en las condiciones de cultivo no se aporta ninguna fuente de nitrógeno distinta al nitrógeno atmosférico, la acumulación de materia seca está directamente relacionada con la fijación de nitrógeno, por

lo que los resultados indican que el plásmido pLPU83a no modifica la capacidad de fijación de nitrógeno de la cepa *E. meliloti* 2011.



**Figura VII.1. Cinéticas de nodulación de *E. meliloti* portando el plásmido pLPU83a en condiciones de acidez y neutralidad. A)** Ensayo realizado a pH = 7,0, **B)** Ensayo realizado a pH = 5,6. En ambos ensayos la plantas fueron inoculadas con aproximadamente  $10^5$  u.f.c. por planta. Los nódulos fueron contados a los tiempos indicados. Los resultados se encuentran expresados como el promedio de números de nódulos por planta. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura VII.2. Ensayo para estimar la fijación biológica de nitrógeno de *E. meliloti* 2011 portando el plásmido pLPU83a.** A. Luego de cuatro semanas de la inoculación, las plantas fueron evaluadas sin observar diferencias en su parte aérea. B. Análisis del peso seco obtenido, no evidenciamos diferencias significativas entre las cepas. Las barras indican la desviación estándar.

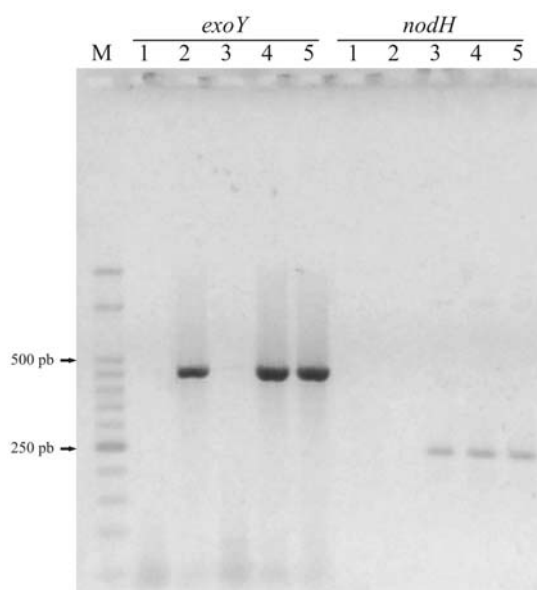
Con la intención de continuar la caracterización del plásmido críptico, se evaluó si el mismo era capaz de conferir a su cepa hospedadora una ventaja en la competición por la nodulación de alfalfa a su hospedador. Así, se comparó la competitividad de la cepa 20MP6, una cepa derivada verde fluorescente e isogénica de *E. meliloti* 2011 (Pistorio, *et al.*, 2002), coinoculada en alfalfa con la cepa portadora del plásmido, *E. meliloti* (pLPU83a). En paralelo a los experimentos de coinoculación con la cepa 20MP6, se realizaron experimentos de inoculación simple como control. Cuando las raíces de las plántulas crecidas a partir de semillas esterilizadas en superficie alcanzaron una longitud de aproximadamente 0,5 cm, las mismas fueron colocadas en bolsas de polietileno con 10 ml de Fåhraeus. Al quinto día post-germinación las raíces fueron inoculadas con 100 µl/planta de una suspensión bacteriana en Fåhraeus modificado. Los inóculos utilizados fueron *E. meliloti* 20MP6,  $5,5 \times 10^5$  u.f.c./planta y *E. meliloti* 2011 (pLPU83a)  $5,1 \times 10^5$  u.f.c./planta. Al cabo de 28 días los nódulos fueron removidos de las raíces, esterilizados en su superficie, y luego evaluada la ocupación de los mismos por plaqueo de su contenido en medio TY sólido con diferentes antibióticos según los marcadores de resistencia de las cepas utilizadas. No se observaron diferencias en la ocupación de los nódulos entre ambos genotipos, indicando que pLPU83a no tiene un efecto significativo en la competición de *E. meliloti* para nodular alfalfa.

### VII.3. Complementación de *E. meliloti* SmA818 con pLPU83b.

La FBN es la culminación de una serie de etapas en las cuales bacteria y planta intercambian señales, por ejemplo, flavonoides y NFs. La nodulación es una interacción

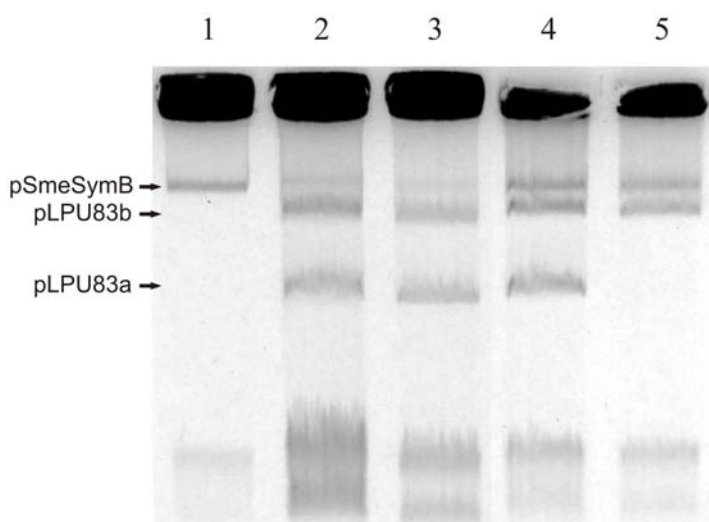
bastante específica, donde un grupo determinado de rizobios es capaz de nodular una cierta planta. Una característica distintiva de *Medicago sativa* es la especificidad que presenta frente a sus simbioses *E. meliloti* o *E. medicae*. En esta interacción se ha caracterizado que los componentes de la superficie bacteriana son muy importantes para una simbiosis fijadora de nitrógeno. *E. meliloti* produce numerosos polisacáridos de superficie, entre ellos exopolisacáridos, polisacáridos capsulares y lipopolisacáridos, los cuales se encuentran involucrados en el desarrollo de la simbiosis fijadora de nitrógeno (Hozbor, *et al.*, 2004; Jones, *et al.*, 2007).

En el Capítulo IV se describió que el plásmido pLPU83b de la cepa *R. sp.* LPU83 es el plásmido simbiótico ya que contiene el *cluster* de genes involucrados en la nodulación. En dicho capítulo encontramos a través de estudios *in silico* que existen genes ortólogos a los presentes a *E. meliloti* asociados a la fijación de nitrógeno (*nif*, *fix*) en el plásmido pLPU83b. Con el propósito de estudiar los determinantes simbióticos asociados al plásmido pLPU83b, decidimos evaluar el fenotipo que podía conferir dicho plásmido a cepas que no contengan un plásmido simbiótico. Para esto se realizó la transferencia por conjugación del plásmido pLPU83b-5 desde la cepa *R. sp.* LPU83-5 a la cepa SmA818 (*E. meliloti* 2011 curada de su plásmido simbiótico) (Oresnik, *et al.*, 2000). Los transconjugantes obtenidos fueron evaluados por PCR con cebadores específicos para el gen *exoY* de SmA818 (Figura V.II.3) y *nodH* (Del Papa, *et al.*, 2007) para la presencia del gen *nodH* del plásmido simbiótico de *R. sp.* LPU83. Todos los transconjugantes obtenidos presentaron señal para ambos marcadores (453 pb para *exoY* y 249 pb para *nodH*) como se observa en la Figura VII.3 para los clones A y B.



**Figura VII.3. Evaluación por PCR de la complementación genética de SmA818 con el plásmido simbiótico de *R. sp.* LPU83, pLPU83b.** El marcador *exoY* (453 pb) es específico de *E. meliloti*, mientras que el marcador *nodH* (249 pb) del plásmido simbiótico de *R. sp.* LPU83. **M**, Marcador de peso molecular; **1**, Control Negativo; **2**, SmA818; **3**, *R. sp.* LPU83; **4**, Clon A; **5**, Clon B. Se puede apreciar que sólo los clones transconjugantes presentan ambos marcadores.

En una segunda etapa, se evaluaron los perfiles plasmídicos de los transconjugantes mediante el uso de geles de lisis *in situ* para corroborar la presencia de los megaplásmidos. En las calles 4 y 5 de la Figura VII.4 se ven los perfiles de dos de los clones obtenidos donde puede observarse en ambos la presencia del pLPU83b. En uno de los clones se observó también una banda adicional correspondiente al plásmido críptico, pLPU83a (Figura VII.4, Calle 4). La cepa portadora sólo del plásmido simbiótico fue denominada SmA818B y la portadora de ambos plásmidos, SmA818AB. Ambas cepas fueron incluidas en la evaluación de las propiedades simbióticas.



**Figura VII.4. Evaluación de los perfiles plasmídicos de las cepas quiméricas.** La evaluación de los perfiles plasmídicos mediante la técnica de geles de lisis *in situ* permite observar la transferencia del plásmido simbiótico a la cepa SmA818, como así, en uno de los clones, la cotransferencia del plásmido críptico, pLPU83a. **1**, SmA818; **2**, *R. sp.* LPU83; **3**, *R. sp.* LPU83 (pLPU83b::Tn5-B10); **4**, Clon A, posteriormente denominado SmA818AB; **5**, Clon B, posteriormente denominado SmA818B.

Para evaluar la capacidad simbiótica de las cepas quiméricas, se realizaron ensayos de nodulación en macetas (Materiales y Métodos sección II.7). Los ensayos de nodulación de estas cepas indican que la sola presencia de pLPU83b es necesaria para restaurar la capacidad de nodulación de la cepa SmA818 (Tabla VII.1). Los ensayos también demuestran que ni la cepa SmA818B, ni SmA818AB, ni *R. sp.* LPU83 fueron capaces de sostener el crecimiento de las plantas en un medio libre de nitrógeno (fenotipo ineficiente en la fijación de N). El peso seco de las plantas de alfalfa no mostró diferencias significativas entre las cepas y los controles sin inocular (Tabla VII.1). Los nódulos obtenidos de las cepas quiméricas eran pequeños y blancos, similares a los producidos por la cepa salvaje *R. sp.* LPU83, mientras que las plantas inoculadas por *E. meliloti* mostraron diferencias significativas con respecto a los controles y los nódulos encontrados eran rosados indicando la presencia de leghemoglobina, característica de los nódulos fijadores de nitrógeno.

Asimismo, se evaluaron las cinéticas de nodulación de las mismas cepas en condiciones de pH neutro y ácido (7,0 o 5,6). Dichos experimentos demostraron que ni SmA818B ni



SmaA818AB alcanzan un máximo en el número de nódulos formados (Figura VII.5) y exhiben el mismo fenómeno descrito previamente en la cepa *R. sp.* LPU83 (Del Papa, *et al.*, 1999). La mayoría de los nódulos se encontraron en las raíces secundarias, sugiriendo una deficiencia en la autorregulación de la respuesta sistémica que controla la nodulación (Caetano-Anollés & Bauer, 1988; Caetano-Anollés & Gresshoff, 1991).

**Tabla VII.1. Evaluación del comportamiento simbiótico de las cepas complementadas.**

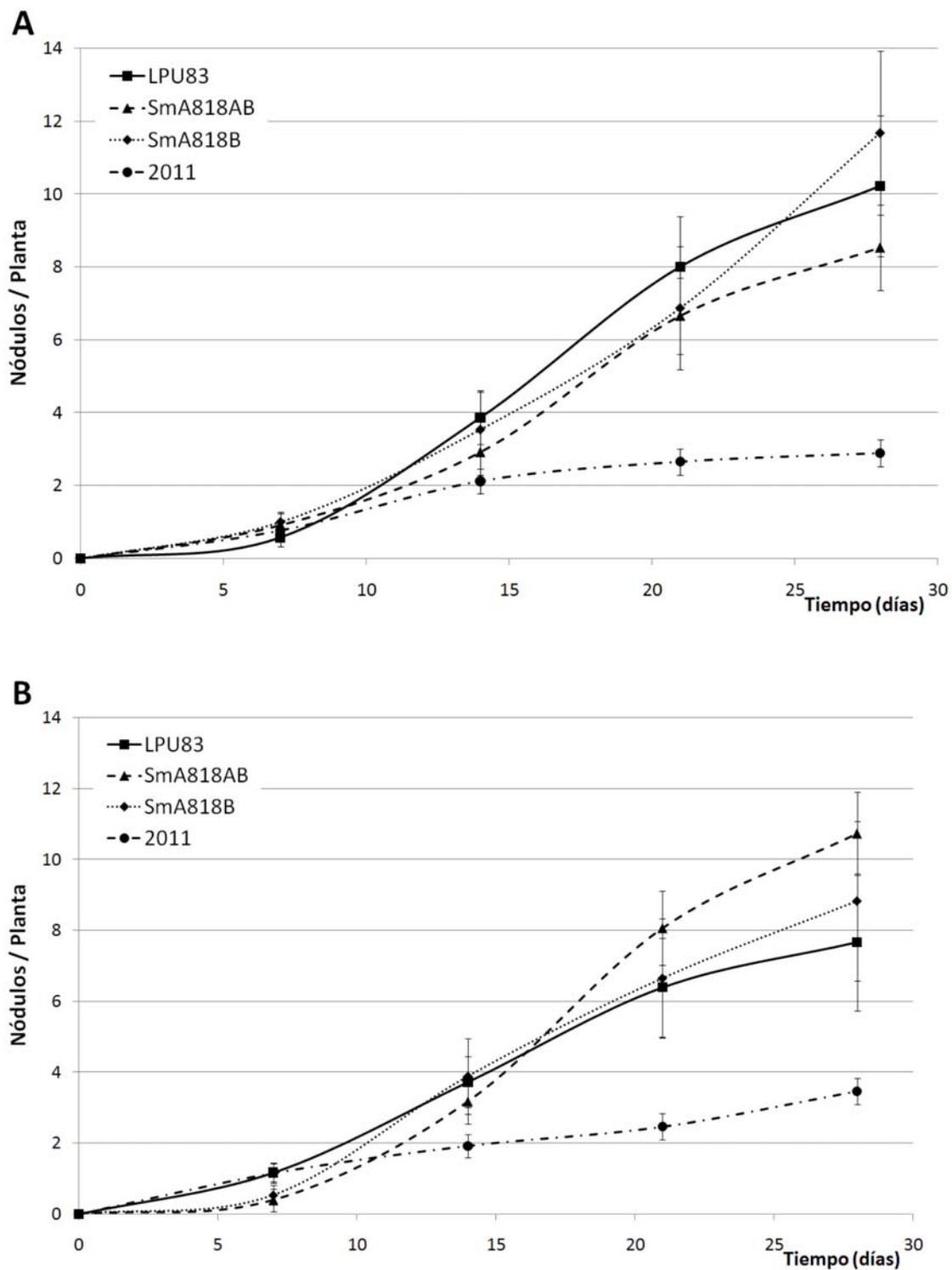
Cepa inoculada	Nodulación <sup>a</sup>	Color de los nódulos	Peso seco por planta ± DS (mg) <sup>b</sup>
Control Negativo	-		8.62 ± 1.78 A
SmA818	-		6.68 ± 2.16 A
SmA818AB	+	Blancos	5.62 ± 0.85 A
SmA818B	+	Blancos	6.57 ± 1.93 A
<i>R. sp.</i> LPU83-5	+	Blancos	7.53 ± 3.25 A
<i>R. sp.</i> LPU83	+	Blancos	7.46 ± 0.92 A
<i>E. meliloti</i> 2011	+	Rosados	30.83 ± 6.03 B

<sup>a</sup> Los símbolos “+” y “-” se refieren a la presencia o ausencia de nódulos.

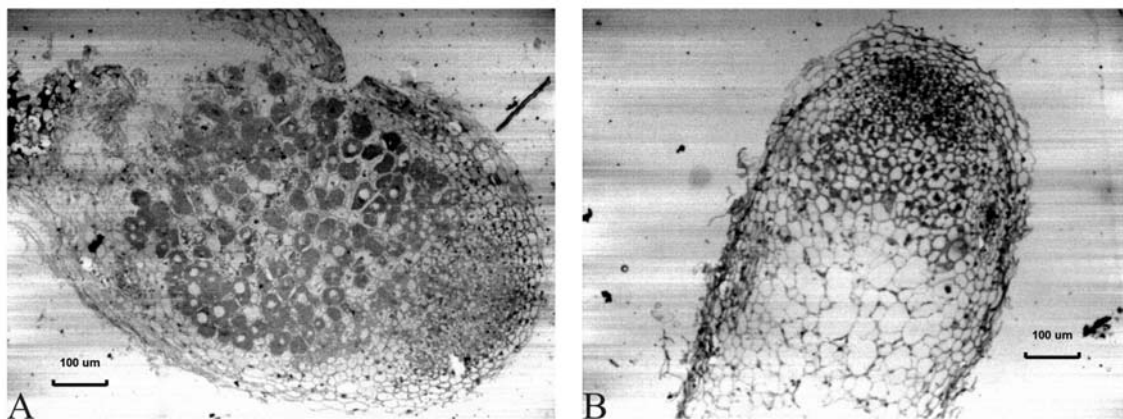
<sup>b</sup> Los resultados fueron analizados por ANOVA y test de Tukey. Los valores seguidos por diferentes letras difieren significativamente con  $P < 0.05$ .

Los nódulos obtenidos de *E. meliloti* 2011 y SmA818AB fueron fijados y se observó la estructura interna de los mismos por microscopía óptica. Así, se observó que los nódulos formados por *E. meliloti* presentaron un alto número de células infectadas, con numerosos bacteroides dentro de cada una de esas células. En los nódulos de SmA818AB, se encontró un bajo número de células infectadas; no se observó una zona de simbiosis normal y la zona de senescencia se observó aumentada. Estos resultados se corresponden con lo descrito previamente por Wegener *et al.* (2001) para la cepa salvaje *R. sp.* LPU83 (Figura VII.6).

Para evaluar si los resultados de la interacción simbiótica podían verse alterados por la inserción del transposón, la región flanqueante al mismo fue recuperada y secuenciada. El Tn5-B10 se insertó en un marco de lectura codificante para una probable transcriptasa reversa, lo cual es poco probable que esté relacionado con el desarrollo de la simbiosis. Dicho gen presentó una identidad de 81 % con el gen blr1915 de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (NP\_768555.1), el cual no ha sido descrito que esté involucrado en la interacción simbiótica.



**Figura VII.5. Cinéticas de nodulación de las cepas complementadas en condiciones de acidez y neutralidad.** Las plantas, **A**) pH = 7.0 o **B**) pH = 5.6, fueron inoculadas con aproximadamente  $10^5$  u.f.c. por planta por cepa. Los nódulos fueron contados a los tiempos indicados. Los resultados se encuentran expresados como el promedio de números de nódulos por planta. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura VII.6. Evaluación de la estructura interna de los nódulos formados por las bacterias complementadas.** Microscopía óptica de los nódulos formados por **A)** *E. meliloti* 2011, y **B)** SmA818AB. En la figura A se observa un alto número de células infectadas con numerosos bacteroides dentro de cada una de las células. En la Figura B la mayoría de las células no se encuentran infectadas y no se observa una zona de simbiosis normal.

Como hemos mencionado previamente, las cepas tipo Oregon no solamente son capaces de nodular alfalfa, sino que también pueden nodular, entre otras, *Phaseolus vulgaris* (poroto). Debido a esto se evaluó si las cepas complementadas, SmA818B y SmA818AB, eran capaces de nodular poroto. Para ello realizamos un ensayo de nodulación en maceta de *P. vulgaris* inoculadas con las cepas quiméricas, con *R. sp.* LPU83, *R. etli* CFN42 y *E. meliloti* como controles del ensayo. Un mes después de la inoculación no fue posible obtener nódulos ni con *E. meliloti* ni con las cepas quiméricas, mientras que *R. sp.* LPU83 y *R. etli* CFN42 fueron capaces de formar nódulos. Este último resultado nos indica que el plásmido simbiótico pLPU83b en el entorno genético de SmA818 no es capaz de generar un fenotipo nodulador de poroto.

En este capítulo hemos estudiado las características fenotípicas asociadas a la simbiosis de los plásmidos transmisibles de la cepa *Rhizobium sp.* LPU83 con el propósito de entender su rol en la interacción rizobio-alfalfa.

En primer lugar realizamos la caracterización del plásmido críptico, pLPU83a. Se realizaron cinéticas de nodulación, ensayos de fijación biológica de nitrógeno y competiciones, pero dicho plásmido fue incapaz de conferirle ventajas en la interacción con alfalfa a *Ensifer meliloti* 2011 en las condiciones en las que se realizaron los experimentos. Sin embargo, no es posible descartar que este plásmido pueda tener algún efecto en la cepa *R. sp.* LPU83 que sea útil en condiciones de campo. Para estudiar dicha problemática, la construcción de cepas derivadas de *R. sp.* LPU83 curadas del plásmido pLPU83a serán de alta relevancia.

En segundo lugar, se caracterizó el plásmido pLPU83b, portador de los genes involucrados en la simbiosis y en la fijación de nitrógeno en la cepa *R. sp.* LPU83. Al realizar las complementaciones de la cepa SmA818 pudimos ver que estas cepas quiméricas no lograron desarrollar una simbiosis efectiva; si bien la formación de nódulos y la estructura interna fueron comparables con la cepa salvaje *R. sp.* LPU83 (Wegener, *et al.*, 2001), la fijación de nitrógeno no fue eficiente. Las plantas leguminosas poseen la capacidad de regular el proceso de nodulación. Cuando se inocula alfalfa con *E. meliloti*, luego de que se forman los primeros nódulos o pseudonódulos, la formación de nódulos adicionales se ve inhibida (Caetano-Anollés, *et al.*, 1990; Caetano-Anollés & Gresshoff, 1991). Del Papa *et al.* (1999) sugirieron que cuando la alfalfa es inoculada con la cepa *R. sp.* LPU83 existe una deficiencia en la autorregulación sistémica de la nodulación (Caetano-Anollés & Bauer, 1988), por lo que cuando plantas inoculadas con *E. meliloti* alcanzan un máximo de nódulos, en las plantas inoculadas con *R. sp.* LPU83 los nódulos continúan desarrollándose, y mayormente aparecen en las raíces laterales. Los resultados obtenidos al inocular con las cepas quiméricas demuestran un comportamiento similar al observado para la cepa *R. sp.* LPU83. Estas observaciones sugieren que los rizobios tipo Oregon pueden comportarse como microorganismos parasíticos más que como verdaderos simbiosiontes, aunque no se puede descartar la posibilidad de que exista una planta hospedadora desconocida donde *R. sp.* LPU83 sea capaz de fijar nitrógeno de manera eficiente.

# **Capítulo VIII**

## **Discusión General y Conclusiones**



## VIII.1. *Discusión General.*

*Medicago sativa* (alfalfa), una de las principales leguminosas forrajeras del mundo, se asocia con rizobios eficientes en la fijación biológica de nitrógeno (*Ensifer meliloti*, *Ensifer medicae*) como también con rizobios que no son capaces de proveerle dicho nutriente, como por ejemplo, los rizobios tipo Oregon, que han sido aislados de suelos agrícolas de diferentes lugares del mundo (Eardly, *et al.*, 1985; Laguerre, *et al.*, 2006; Del Papa, *et al.*, 2007; Bromfield, *et al.*, 2010). Debido a las características fenotípicas y taxonómicas particulares de los rizobios tipo Oregon, los mismos han atraído la atención de los rizobiólogos desde su aislamiento original por Eardly *et al.* (1985). Estos rizobios son tolerantes a la acidez, tienen un rango de hospedadores amplio (nodulan varias leguminosas), son muy competitivos para la nodulación de alfalfa en suelos ácidos y son ineficientes para la fijación de nitrógeno en asociación con alfalfa. En este contexto, y más allá del interés taxonómico orientado a conocer el origen y relación de estas bacterias con otros simbioses de *Medicago* spp., las características de los rizobios tipo Oregon muestran a los mismos como un potencial factor de riesgo en los suelos agrícolas en los que coexisten y compiten con *E. meliloti*.

A su vez, estudios previos realizados a los rizobios tipo Oregon han demostrado una estructura genética que conserva evidencias claras de eventos de transferencia horizontal de genes, con un cromosoma relacionado filogenéticamente a rizobios noduladores de poroto, *Rhizobium etli*, y plásmidos simbióticos relacionados a rizobios noduladores de alfalfa, *E. meliloti* y *E. medicae* (Eardly, *et al.*, 1992; Laguerre, *et al.*, 2001; Del Papa, *et al.*, 2007). Todas estas características hacen de los rizobios tipo Oregon un foco de interés desde el punto de vista evolutivo y agro-biotecnológico. En este trabajo de Tesis Doctoral, hemos abordado la caracterización genómica estructural y funcional de la cepa de referencia de los rizobios tipo Oregon, *Rhizobium* sp. LPU83.

Como parte de este trabajo realizamos el pirosecuenciamiento completo de *R.* sp. LPU83, lo que ha permitido la construcción del mapa físico completo del cromosoma y de los plásmidos pLPU83c y pLPU83a presentes en esta bacteria (Capítulo III). El grado de dificultad en el ensamblado de los genomas suele estar asociados a un elevado número de secuencias repetitivas y transposasas relacionadas. El análisis posterior del contenido genético de *R.* sp. LPU83 demostró una sobrerrepresentación de genes ortólogos a elementos de replicación, recombinación y reparación, donde se incluyen genes de transposasas y derivados de las mismas. Por estas razones, y según ya hemos discutido en el

Capítulo III, aún resta completar el ensamblaje de los *contigs* asociados al plásmido pLPU83b.

La secuencia del cromosoma nos permitió realizar dos tipos de estudios filogenéticos, uno a partir de siete genes asociados a funciones basales (*housekeeping*) y otro realizado a partir de todos los genes compartidos por los microorganismos analizados (*core genome*). El primero de los análisis se puede realizar para cualquier microorganismo del que se posea la secuencia de dichos genes, mientras que con el segundo análisis sólo es posible comparar los microorganismos cuyos genomas han sido completamente secuenciados. Independientemente de la metodología utilizada, la cepa *R. sp.* LPU83 se ubicó estrechamente relacionada con *Agrobacterium radiobacter* K84 y con los rizobios noduladores de poroto, arveja y trébol (*R. etli* y *Rhizobium leguminosarum*). El posicionamiento filogenético que hemos obtenido para *R. sp.* LPU83 está fuertemente apoyado por la colinealidad que observamos entre su cromosoma y los de *R. etli* CFN42 y *A. radiobacter* K84, más allá de la presencia de inversiones que hemos detectado en el cromosoma de la cepa *R. sp.* LPU83.

Una imagen diferente hemos obtenido al extender el análisis comparativo de las secuencias de los megaplásmidos pLPU83b y pLPU83c, donde no hemos podido observar grandes zonas conservadas con otros plásmidos de rizobios, a excepción de zonas particulares como las regiones de genes involucrados en la simbiosis (*nod*, *nif*) identificadas en el plásmido pLPU83b.

Estas diferencias de conservación de secuencias y sintenia respecto de otros rizobios en los distintos replicones de la cepa *R. sp.* LPU83 refuerzan las evidencias previas que apoyan una fuerte movilidad horizontal de los plásmidos de rizobios y su recombinación como mecanismo de generación de diversidad en diferentes especies (García de los Santos, *et al.*, 1996; Mercado-Blanco & Toro, 1996). A modo de ejemplo, el plásmido pLPU83a mostró compartir funciones de supervivencia y propagación similares a otras descritas en plásmidos de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, y genes posiblemente involucrados en la síntesis de exopolisacáridos similares a los de *E. meliloti*; hechos que sugieren la existencia de eventos de transferencia horizontal seguidos de recombinación homóloga en estos rizobios.

La transferencia horizontal de genes, y en particular la transferencia conjugativa, tienen un rol central entre los mecanismos de evolución genómica en bacterias. La presencia de plásmidos transmisibles en los rizobios ha sido descrita previamente (Mercado-Blanco & Olivares, 1993; Brom, *et al.*, 2000; Pistorio, *et al.*, 2003; Perez-Mendoza, *et al.*, 2004) y, bajo la hipótesis de que los rizobios tipo Oregon podrían haberse originado a través de



transferencia horizontal de genes, el estudio de las propiedades de transferencia de sus plásmidos y sus implicancias en la simbiosis es un foco de análisis obligado. Para el caso de la cepa *R. sp.* LPU83 realizamos la búsqueda *in silico* de sistemas implicados en la transferencia plasmídica (Dtr/Mpf). El análisis *in silico* permitió la identificación de regiones con similitud de secuencia a genes de los sistemas Mpf y Dtr en los tres plásmidos de *R. sp.* LPU83. El estudio funcional mediante la marcación por transposición de cada uno de los plásmidos, pudo evidenciar que los plásmidos pLPU83a y pLPU83b pueden ser transferidos desde *R. sp.* LPU83 por conjugación. La transferencia conjugativa de pLPU83c, sin embargo, no fue detectada en condiciones de laboratorio. Es interesante mencionar que el plásmido pLPU83c presenta de todos modos un Mpf similar al de los pSym de *E. meliloti* 1021 y *R. etli* CFN42. En dichos plásmidos, los genes *rctA/rctB*, conforman un sistema regulatorio de la transferencia conjugativa al controlar la transcripción de los genes involucrados en la conjugación (Perez-Mendoza, *et al.*, 2005). Sin embargo, no hemos encontrado homólogos a dichos genes en el genoma de *R. sp.* LPU83. La caracterización de las propiedades de transferencia mostraron que el plásmido pLPU83b es movilizable por conjugación sólo en presencia del plásmido pLPU83a. Los resultados de la transferencia del plásmido pLPU83a, mostraron que puede ser transferido desde ciertos entornos genéticos como *E. meliloti* 2011 y *R. etli* CFN42, por lo que nos permitiría clasificarlo como un plásmido conjugativo. Sin embargo, desde el entorno genético de *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2 (libre de plásmidos), no fue posible observar la transferencia del plásmido pLPU83a. Estos resultados, junto a la existencia en pLPU83a de un homólogo del gen *traR* (involucrado en otras bacterias en la percepción de moléculas de *quórum sensing* (Piper, *et al.*, 1993)), nos indujeron a pensar que la transferencia de este plásmido podía estar mediada por la presencia y percepción de señales ambientales específicas como ha sido descrito en otros plásmidos (Zambryski, *et al.*, 1989; Beck von Bodman, *et al.*, 1992; Danino, *et al.*, 2003; Tun-Garrido, *et al.*, 2003). La mutación en el gen *traR* en el plásmido pLPU83a condujo a la pérdida de la transferencia conjugativa del mismo, mientras que la complementación de dicho mutante en *trans* restauró la capacidad conjugativa. Se destaca asimismo la ausencia de un homólogo de *traI* en el mismo plásmido pLPU83a, hecho que podría estar vinculado a la capacidad de movilizar el mismo dependiendo del tipo de especie donadora ensayada. Si bien la evidencia recolectada parece indicar que la transferencia de pLPU83a esta mediada por una respuesta a *quórum sensing*, será necesario realizar los experimentos bioquímicos que confirmen la existencia de las señales de *quórum sensing* asociadas al requerimiento del producto funcional de *traR*.

Un aspecto central de la caracterización funcional de los plásmidos crípticos de los rizobios es el análisis de la influencia de los mismos en vida saprofítica y simbiótica de las bacterias. Lamentablemente, es complejo el diseño de aproximaciones experimentales que permitan analizar el impacto de los plásmidos a mediano y largo plazo en vida saprofítica. En esta tesis nos hemos concentrado en la caracterización de la eventual participación simbiótica de los plásmidos transmisibles de *R. sp.* LPU83. Resultó claro que la capacidad de la cepa de nodular diferentes leguminosas estaba asociada a información presente en el plásmido pLPU83b, en el que residen los genes *nod* y *nif*. Por otra parte, la transferencia de este plásmido a la cepa SmA818 (derivada de *E. meliloti* 2011 y curada del pSymA) restauró en el transconjugante la capacidad de nodular alfalfa pero no la fijación biológica de nitrógeno, evidenciando la falta de algunos genes involucrados en la simbiosis que se encuentran presentes en el pSymA de *E. meliloti* 2011 pero no en el plásmido pLPU83b. La obtención de variantes de *R. sp.* LPU83 curadas del plásmido simbiótico y complementadas con los plásmidos simbióticos pSymA o p42d esperamos nos permitan evaluar si el contexto genético de *R. sp.* LPU83 es capaz de sostener una simbiosis eficiente con alfalfa y/o poroto.

Con el propósito de evaluar si la presencia del plásmido críptico pLPU83a se encuentra asociada a cambios en la simbiosis, analizamos cepas de *E. meliloti* 2011 portadoras del mismo. No hemos observado diferencias marcadas en las características simbióticas de la cepa portadora del plásmido pLPU83a respecto de la cepa isogénica sin plásmido. Existen antecedentes en los que la introducción de un replicón de una cepa nativa ha generado cambios claros en la competitividad en condiciones de laboratorio (Sanjuan & Olivares, 1989; Hynes & McGregor, 1990; Brom, *et al.*, 1992; Soto, *et al.*, 1993). Sin embargo, no hemos observado efectos similares al introducir el plásmido pLPU83a en *E. meliloti* 2011. De todos modos, la posibilidad de que la presencia del plásmido pLPU83a confiera, en condiciones naturales, alguna ventaja simbiótica o adaptativa deberá ser investigada en experimentos con muestras de suelo no estéril, en presencia de la planta hospedadora, y en un período más extendido de tiempo.

La presencia en el plásmido pLPU83a de una parte importante de los genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos indica que este plásmido podría cumplir un rol importante en la infección de alfalfa por *R. sp.* LPU83. Así, la construcción de cepas derivadas de *R. sp.* LPU83 curadas de pLPU83a o con delecciones parciales del mismo, será un punto importante para evaluar si eso condiciona la síntesis de exopolisacáridos o si la carencia del plásmido es o no prescindible para la formación de nódulos en alfalfa.

Con el objetivo de caracterizar la bioquímica de la señalización entre los rizobios tipo Oregon y sus leguminosas hospedadoras, hemos analizado la organización genética del *cluster* de genes de nodulación y determinado la estructura química de los factores de nodulación presentes en la cepa *R. sp. LPU83* (Capítulo V). La nodulación es un proceso a través del cual cepas particulares de rizobios inducen nódulos radiculares en sus leguminosas hospedadoras. Esta interacción presenta grados de especificidad variables, dependiendo de la especie de rizobios y las leguminosas que participan de esa interacción. La interacción comienza con un intercambio de señales en el cual, en primera instancia la planta secreta flavonoides o isoflavonoides que, en la bacteria compatible, desencadenan la inducción de los genes de nodulación que codifican para las enzimas responsables de la síntesis, modificación y secreción de los factores de nodulación. El análisis de la región *nod* de la cepa *R. sp. LPU83* mostró una muy marcada sintenia con la región *nod* de los otros rizobios noduladores de alfalfa secuenciados *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419, con 13 ORFs designados *nodABCD1D3EFGHIJPO*. Al comparar las regiones *nod* de dichos rizobios hemos observado un número diferente de secuencias de inserción y la ausencia del regulador transcripcional *syrM* en la cepa *R. sp. LPU83*.

Bailly *et al.* (2007) han sugerido que el género *Ensifer* ha adquirido la capacidad de nodular plantas del género *Medicago* a través de eventos de transferencia horizontal de genes desde un rizobio predecesor. Esta hipótesis ha sido sustentada por la falta de congruencia entre la filogenia de los genes de funciones basales (*housekeeping*) y la filogenia de los genes simbióticos. En este contexto han propuesto a *Rhizobium mongolense* como el posible antecesor de los rizobios que nodulan *Medicago* spp., debido a que esta especie aparece como el primer linaje en separarse entre los simbiotes de *Medicago* en los análisis filogenéticos de genes *nodABC* y *nodEG*. Es interesante mencionar que los genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodE* y *nodG* de *R. mongolense* USDA1844 fueron los que mostraron mayor identidad con los genes homólogos de la cepa *R. sp. LPU83*. Lamentablemente, no disponemos actualmente de la secuencia completa del *cluster nod* de *R. mongolense* ni del replicón que los contiene de modo de analizar en detalle efectos sinténicos de mayor rango. De todos modos, el análisis de la zona intergénica *nodEG*, denominada IGS<sub>NOD</sub> (Bailly, *et al.*, 2007) y disponible para varios rizobios, ha demostrado ser una herramienta potente para analizar las relaciones filogenéticas de la región *nod*. En nuestros análisis de IGS<sub>NOD</sub>, la cepa *R. sp. LPU83* se ubica en el mismo grupo que *R. mongolense* USDA1844 indicando que los rizobios tipo Oregon pueden representar un genotipo temprano en lo que ha sido la aparición de las bacterias noduladoras de *Medicago* spp..

Desde el punto de vista químico, los factores de nodulación son lipoquitoligosacáridos formados por una cadena principal de 3, 4 o 5 residuos de N-acetilglucosamina modificada por diferentes sustituyentes químicos (Perret, *et al.*, 2000; Jones, *et al.*, 2007). Las distintas sustituciones que se encuentran unidas al núcleo oligosacárido de los factores de nodulación dependen de cada especie o cepa de rizobio y ha sido demostrado que contribuyen a definir la especificidad y rango de hospedador. En el caso de la nodulación de poroto, es característica la metilación de los factores de nodulación en el residuo del extremo no reductor (Poupot, *et al.*, 1993; Poupot, *et al.*, 1995), mientras que para la nodulación de alfalfa, la sulfatación en el extremo reductor ha sido descrita como esencial para dicho proceso (Faucher, *et al.*, 1988; Cloutier, *et al.*, 1996; Wais, *et al.*, 2002). Las estructuras que hemos obtenido para los factores de nodulación muestran moléculas señal formadas por trímeros, tetrámeros y pentámeros de N-acetilglucosamina, metilados en su extremo no reductor y sulfatados en la posición C6 del extremo reductor, siendo la primera sustitución común de los rizobios noduladores de poroto y la segunda indispensable para los rizobios noduladores de alfalfa. Recientemente, Del Papa *et al.* (2007) han demostrado que un mutante alterado en el gen de la sulfotransferasa de los factores de nodulación (*nodH*) de la cepa *R. sp.* LPU83 era aún capaz de nodular alfalfa, observación que obligó a revisar si la presencia del grupo sulfato en el extremo reductor de los factores de nodulación es un requisito obligado para que los rizobios nodulen alfalfa. A fin de establecer la necesidad, o no, de los rizobios tipo Oregon de poseer factores de nodulación sulfatados también determinamos la estructura de los factores de nodulación producidos por el mutante mencionado. Sorprendentemente, estos factores de nodulación no se encontraban sulfatados. Esta observación obliga a revisar de modo cuidadoso las regiones estructurales y decoraciones que son estrictamente necesarias para inducir nódulos en alfalfa, y a investigar cuáles son las formas activas sobre alfalfa de los factores de nodulación presentes en las cepas tipo Oregon.

Los estudios de inducción previos a la obtención de los factores de nodulación nos permitieron determinar la falta de respuesta del sistema a la acción de más de 20 flavonoides diferentes que fueron ensayados. En la cepa *R. sp.* LPU83 la designación de *nodD1* y *nodD3* a partir de los datos de secuencia fue realizada en base de la sintenia observada con los genes homólogos de *E. meliloti*. A pesar de esta designación, el gen *nodD3* de *R. sp.* LPU83 posee una mayor identidad con el gen *nodD1* de *R. sp.* LPU83 que con el gen *nodD3* de *E. meliloti* 1021. Esta observación (carencia de un homólogo franco de *nodD3*) y la falta de *syrM* en la cepa *R. sp.* LPU83 demuestran la falta del circuito de amplificación transcripcional positiva de los genes *nod* dependiente de *syrM-nodD3*

descrito en *E. meliloti* (Swanson, *et al.*, 1993). La deficiencia en este circuito regulatorio podría ser considerada como una de las posibles causas de la falta de activación de la producción de factores de nodulación en cantidades apreciables ya sea por los flavonoides o por los exudados de semillas de alfalfa. No debemos descartar, de todos modos, que flavonoides aún no caracterizados sean capaces de inducir en condiciones naturales los genes *nod* de la cepa *R. sp.* LPU83.

A pesar de los bajos niveles de producción de factores de nodulación por los rizobios tipo Oregon, éstos han demostrado ser suficientes para inducir la formación de hilos de infección (Ver anexo A) y nodular alfalfa. Esta baja producción de factores de nodulación no parece ser la responsable de la pobre fijación de nitrógeno expresada por estos rizobios en sus diferentes hospedadores. La cepa recombinante isogénica de *R. sp.* LPU83 que produce una elevada cantidad de factores de nodulación (posee un plásmido con un activador transcripcional independiente de flavonoides) indujo un mayor número de nódulos en alfalfa pero fue igualmente ineficiente en la fijación biológica de nitrógeno como la cepa parental.

## VIII.2. Conclusiones.

El punto central que subyace a la caracterización genética y simbiótica de los rizobios tipo Oregon es el valor de estas bacterias para ayudar a desentrañar la historia evolutiva de los rizobios noduladores de *Medicago spp.* y sus mecanismos de la diversificación y evolución. Bailly *et al.* (2007) han sugerido que las especies del género *Ensifer* han adquirido la habilidad para nodular plantas del género *Medicago* por transferencia horizontal de los genes. En este trabajo hemos evidenciado que los rizobios tipo Oregon se encuentran estrechamente relacionados en sus genes de nodulación con *R. mongolense*, ancestro propuesto por Bailly *et al.* (2007), y que *R. sp.* LPU83 es capaz de transferir su plásmido simbiótico restaurando la nodulación de una cepa de *E. meliloti* curada de su plásmido simbiótico, dando un soporte robusto a la hipótesis propuesta.

Las caracterizaciones realizadas a los rizobios tipo Oregon han demostrado que los mismos poseen un amplio rango de hospedadores, una pobre fijación biológica de nitrógeno y una alta competitividad en suelos ácidos en comparación a *E. meliloti* 2011. Estas evidencias sugieren que los rizobios tipo Oregon son más parecidos a organismos parasíticos que a simbioses de leguminosas. Las observaciones actuales sugieren que: A) los rizobios tipo Oregon no han adquirido todas las funciones necesarias para transformarse en simbioses eficientes, B) estos rizobios son descendientes de antiguos rizobios eficientes.

Esta última posibilidad, igualmente, no es muy probable en términos de la co-evolución entre rizobios y leguminosas (Aguilar, *et al.*, 2004; Martínez-Romero, 2009). La posibilidad de que *R. sp.* LPU83 tenga una planta hospedadora donde la simbiosis sea eficiente no debe ser desechada.

El presente trabajo nos permite contar con la primera secuencia genómica completa de un rizobio nodulador de alfalfa con características parasíticas, presente en suelos argentinos, y cuyo fenotipo en vida libre y frente a la planta huésped es diferente de los rizobios eficientes con los que convive en dichos suelos.

### VIII.3. *Perspectivas.*

En la Argentina, más de 6 millones de hectáreas son cultivadas con alfalfa, donde un evento crucial para asegurar la entrada de nitrógeno atmosférico a suelos agrícolas es la simbiosis con rizobios eficientes en la fijación biológica de nitrógeno. La acidez en los suelos puede reducir significativamente la productividad en los cultivos de alfalfa debido a la sensibilidad de su simbiote eficiente, *E. meliloti*. Como hemos mencionado, la tolerancia a la acidez de los rizobios tipo Oregon y su capacidad de nodular alfalfa los posicionan en un lugar de elevado interés agronómico. Sin embargo, su pobre eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno lo sitúan como un organismo de características más parasíticas que simbióticas. A partir del genoma obtenido de *R. sp.* LPU83, podremos aplicar diversas herramientas ómicas (transcriptómica, proteómica, metabolómica) para entender aspectos básicos de los rizobios como la tolerancia a la acidez o mecanismos implicados en la fijación biológica de nitrógeno aún no descriptos. Así, en un futuro cercano podremos evaluar la posibilidad de: A) obtener en el entorno genético de los rizobios tipo Oregon una fijación biológica de nitrógeno eficiente, o B) obtener variantes del simbiote eficiente, *E. meliloti*, que sean capaces de tolerar condiciones ácidas; ambas opciones con el objetivo de aumentar la producción de alfalfa.

# **Anexo**





### ***A. Evaluación de la formación de hilos de infección por R. sp. LPU83.***

La simbiosis es la culminación de un complejo proceso que involucra intercambios de señales moleculares entre la planta y la bacteria. Como mencionamos en la introducción de este trabajo, los rizobios deben ser internalizados para lograr una simbiosis fijadora de nitrógeno. Este objetivo puede ser alcanzado mediante dos vías descriptas: por pelos radiculares formando hilos de infección o por heridas (*crack entry*) en la epidermis de la planta. En la infección realizada a través de hilos de infección los NFs desempeñan un papel importante, dicho mecanismo requiere cambios significativos en el citoesqueleto de las células de la planta para formar un túnel que contiene a los rizobios. La infección por *crack entry* suele ser menos específica, en dicho proceso se forman líneas organizadas de rizobios entre las células vegetales (Gage, 2002; Brewin, 2004; Gage, 2004).

Previamente hemos observado que los rizobios tipo Oregon tienen un bajo nivel de producción de NFs, debido a esto es que evaluamos si estos niveles eran suficientes para formar hilos de infección en alfalfa. Así, construimos un vector que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), que fue introducido en *R. sp. LPU83* por conjugación para obtener la cepa isogénica marcada con GFP, denominada *R. sp. LPU83-GFP* (ver sección II.4.p). Dicha cepa fue utilizada como inóculo en ensayos de plantas en el cual plántulas de alfalfa crecidas a partir de semillas esterilizadas en superficie fueron colocadas en bolsas de polietileno con 10 ml de Fåhraeus. Una semana después de la inoculación observamos las raíces en un microscopio de fluorescencia evidenciando la formación de hilos de infección (Figura Anexo 1). De esta manera, pese a su pobre producción de NFs, *R. sp. LPU83* es capaz de formar hilos de infección en alfalfa.

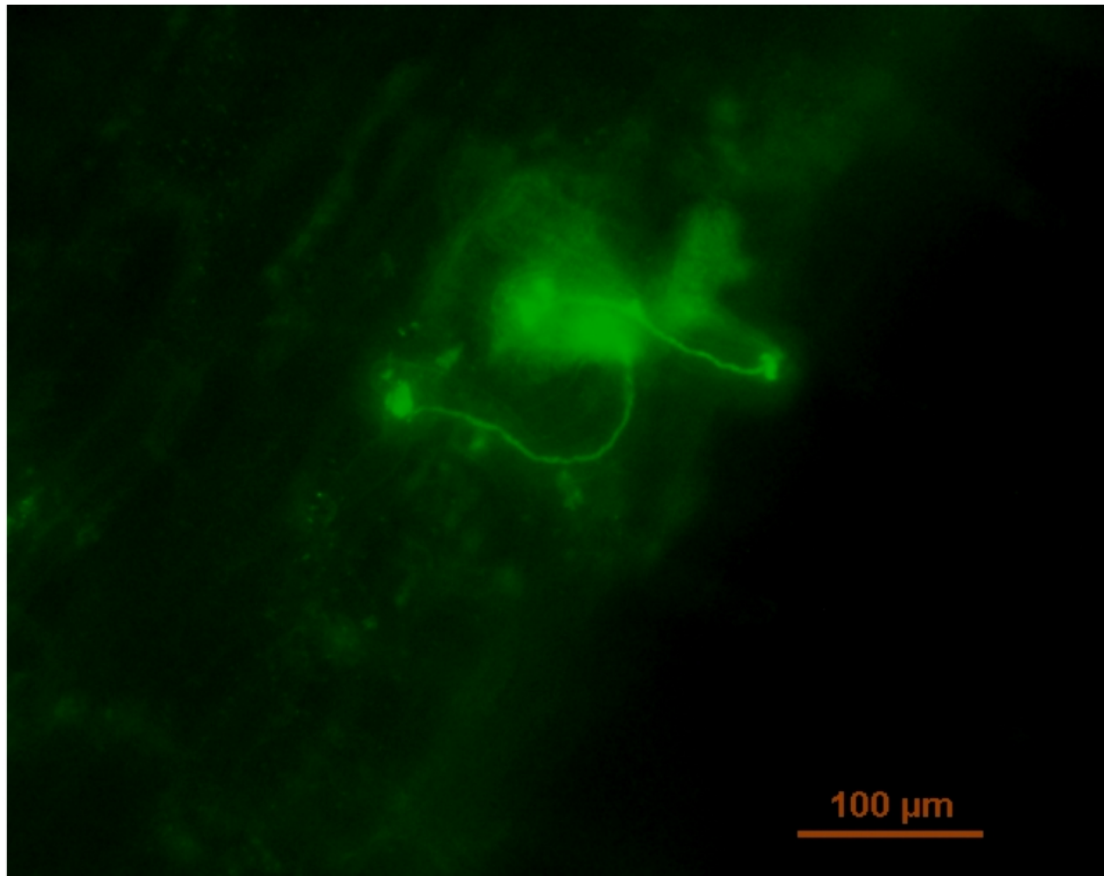


Figura Anexo.1. Hilos de infección formados por *R. sp.* LPU83-GFP.

### ***B. Publicaciones relacionadas a este trabajo.***

Este Trabajo de Tesis Doctoral se encuentra parcialmente publicado en los siguientes artículos:

***“Characterization of extrachromosomal replicons presents in the extended host range *Rhizobium sp. LPU83*”***. Gonzalo Torres Tejerizo, María Florencia Del Papa, María de los Ángeles Giusti, Walter Draghi, Mauricio Lozano, Antonio Lagares y Mariano Pistorio. *Plasmid*. Noviembre de 2010; 64(3):177-85.

***“The nodulation of alfalfa by the acid tolerant *Rhizobium sp. LPU83* does not require sulfated forms of lipo-chitooligosaccharide nodulation signals”***. Gonzalo Torres Tejerizo, María Florencia Del Papa, María Eugenia Soria-Diaz, Walter Draghi, Mauricio Lozano, María de los Ángeles Giusti, Hamid Manyani, Manuel Megias, Antonio Gil Serrano, Alfred Pühler, Karsten Niehaus, Antonio Lagares y Mariano Pistorio. *Journal of Bacteriology*. Enero de 2011; 193(1): 30-39.

***“First genomic analysis of the broad-host-range *Rhizobium sp. LPU83* strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like *Rhizobium sp. Group*”***. Gonzalo Torres Tejerizo, María Florencia Del Papa, Walter Draghi, Mauricio Lozano, María de los Ángeles Giusti, Carla Martini, María Eugenia Salas, Ileana Salto, Daniel Wibberg, Rafael Szczepanowski, Stefan Weidner, Andreas Schlüter, Antonio Lagares y Mariano Pistorio. En prensa, 2011. *Journal of Biotechnology*. 10.1016/j.jbiotec.2011.01.011.



# **Referencias Bibliográficas**



- Achtman M, Kennedy N & Skurray R** (1977) Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of TraT protein in surface exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5104-5108.
- Aguilar OM, Riva O & Peltzer E** (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13548-13553.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Alvarez-Martinez CE & Christie PJ** (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808.
- Amabile-Cuevas CF & Chicurel ME** (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.
- Ardourel M, Demont N, Debellé F, Maillet F, de Billy F, Promé J-C, Dénarié J & Truchet G** (1994) *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**: 1357-1374.
- Ashelford KE, Fry JC, Day MJ, Hill KE, Learner MA, Marchesi JR, Perkins CD & Weightman AJ** (1997) Using microcosms to study gene transfer in aquatic habitats. *FEMS Microbiology Ecology* **23**: 81-94.
- Ausmees N, Jonsson H, Høglund S, Ljunggren H & Lindberg M** (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* **145** ( Pt 5): 1253-1262.
- Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel JC & Béna G** (2007) Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol* **189**: 5223-5236.
- Banfalvi Z, Sakanyan V & Koncz C** (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Molecular and General Genetics* **184**: 318-325.
- Barber LE** (1980) Enumeration, Effectiveness, and pH Resistance of *Rhizobium meliloti* Populations in Oregon Soils. *Soil Science Society of America Journal* **44**: 537-539.
- Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS & Hungria M** (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**: 2635-2643.
- Barinaga M** (1996) A shared strategy for virulence. *Science* **272**: 1261-1263.
- Barnett, Melanie J, Fisher & Robert F** (2006) Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis* **42**: 24.
- Barnett MJ, Swanson JA & Long SR** (1998) Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syra*, a regulator of exopolysaccharide abundance. *Genetics* **148**: 19-32.
- Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F, Gouzy J, Gurjal M, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Palm C, Peck MC, Surzycki R, Wells DH, Yeh KC, Davis RW, Federspiel NA & Long SR** (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9883-9888.
- Barran LR, Ritchot N & Bromfield ES** (2001) *Sinorhizobium meliloti* plasmid pRm1132f replicates by a rolling-circle mechanism. *J Bacteriol* **183**: 2704-2708.
- Basta T, Keck A, Klein J & Stolz A** (2004) Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *Journal of Bacteriology* **186**: 3862-3872.
- Bathe S, Mohan TVK, Wuertz S & Hausner M** (2004) Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer. Vol. 49 p. 337-344.

- Baur B, Hanselmann K, Schlimme W & Jenni B** (1996) Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3673-3678.
- Beck von Bodman S, Hayman GT & Farrand SK** (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 643-647.
- Becker A, Schmidt M, Jäger W & Pühler A** (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**: 37-39.
- Bentley SD & Parkhill J** (2004) Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annual Review of Genetics* **38**: 771-792.
- Beringer JE** (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.
- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B & Shao Y** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Blom J, Albaum SP, Doppmeier D, Puhler A, Vorholter FJ, Zakrzewski M & Goesmann A** (2009) EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* **10**: 154.
- Brewin NJ** (2004) Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci* **23**: 293-316.
- Brewin NJ, Beringer J & Johnston AWB** (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* **120**: 413-420.
- Brom S, Garcia-de los Santos A, Cervantes L, Palacios R & Romero D** (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**: 34-43.
- Brom S, Girard L, Garcia-de los Santos A, Sanjuan-Pinilla JM, Olivares J & Sanjuan J** (2002) Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2555-2561.
- Brom S, Garcia de los Santos A, Stepkowsky T, Flores M, Davila G, Romero D & Palacios R** (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J Bacteriol* **174**: 5183-5189.
- Brom S, Girard L, Tun-Garrido C, Garcia-de los Santos A, Bustos P, Gonzalez V & Romero D** (2004) Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**: 7538-7548.
- Bromfield E, Tambong J, Cloutier S, Prevost D, Laguerre G, van Berkum P, Tran Thi TV, Assabgui R & Barran L** (2010) *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. *Microbiology* **156**: 505-520.
- Bromfield ES, Butler G & Barran LR** (2001) Temporal effects on the composition of a population of *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus alba*. *Can J Microbiol* **47**: 567-573.
- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B & Guedon G** (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* **46**: 601-610.
- Caetano-Anolles G & Gresshoff PM** (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol* **45**: 345-382.
- Caetano-Anolles G, Lagares A & Bauer WD** (1990) *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide Mutants Elicit Feedback Regulation of Nodule Formation in Alfalfa. *Plant Physiol* **92**: 368-374.
- Caetano-Anollés G & Bauer WD** (1988) Feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Planta* **175**: 546-557.



- Campbell GR, Reuhs BL & Walker GC** (2002) Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3938-3943.
- Cardenas L, Thomas-Oates JE, Nava N, Lopez-Lara IM, Hepler PK & Quinto C** (2003) The role of nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 326-334.
- Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG & Parkhill J** (2005) ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* **21**: 3422-3423.
- Castillo-Ramirez S, Vazquez-Castellanos JF, Gonzalez V & Cevallos MA** (2009) Horizontal gene transfer and diverse functional constraints within a common replication-partitioning system in Alphaproteobacteria: the *repABC* operon. *BMC Genomics* **10**: 536.
- Cevallos MA, Cervantes-Rivera R & Gutierrez-Rios RM** (2008) The *repABC* plasmid family. *Plasmid* **60**: 19-37.
- Cevallos MA, Porta H, Izquierdo J, Tun-Garrido C, García-De-Los-Santos A, Dávila G & Brom S** (2002) *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: A structural and evolutionary analysis. *Plasmid* **48**: 104-116.
- Clarke PH** (1984) Evolution of new phenotypes. *Current Perspectives in Microbial Ecology*, pp. 71-78. American Society for Microbiology, Washington.
- Clewell DB, Flannagan SE & Jaworski DD** (1995) Unconstrained bacterial promiscuity: The Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology* **3**: 229-236.
- Cloutier J, Laberge S, Castonguay Y & Antoun H** (1996) Characterization and mutational analysis of *nodHPQ* genes of *Rhizobium* sp. Strain N33. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 720-728.
- Cohan FM, Roberts MS & King EC** (1991) The Potential for Genetic Exchange by Transformation within a Natural Population of *Bacillus subtilis*. *Evolution* **45**: 1393-1421.
- Crespo-Rivas JC, Margaret I, Hidalgo A, Buendia-Claveria AM, Ollero FJ, Lopez-Baena FJ, Del Socorro Murdoch P, Rodriguez-Carvajal MA, Soria-Diaz ME, Reguera M, Lloret J, Sumpton DP, Mosely JA, Thomas-Oates JE, van Brussel AA, Gil-Serrano A, Vinardell JM & Ruiz-Sainz JE** (2009) *Sinorhizobium fredii* HH103 cgs Mutants Are Unable to Nodulate Determinate- and Indeterminate Nodule-Forming Legumes and Overproduce an Altered EPS. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 575-588.
- Crossman LC, Castillo-Ramirez S, McAnnula C, Lozano L, Vernikos GS, Acosta JL, Ghazoui ZF, Hernandez-Gonzalez I, Meakin G, Walker AW, Hynes MF, Young JP, Downie JA, Romero D, Johnston AW, Davila G, Parkhill J & Gonzalez V** (2008) A common genomic framework for a diverse assembly of plasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS ONE* **3**: e2567.
- Chai Y & Winans SC** (2005) A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Mol Microbiol* **56**: 1574-1585.
- Cheng HP & Walker GC** (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**: 5183-5191.
- Cho H, Pinto UM & Winans SC** (2009) Transsexuality in the rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium tumefaciens* from phenotypically female to male. *J Bacteriol* **191**: 3375-3383.
- D'Haese W & Holsters M** (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**: 79R-105R.
- Danino VE, Wilkinson A, Edwards A & Downie JA** (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**: 511-525.
- Darwin C** (1860) *On the Origin of Species by means of Natural Selection, or the Preservation of favoured rates in the Struggle of Life*. D. Appleton, New York.
- Davies J** (1996) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* **12**: 9-16.
- Davison J** (1988) Plant Beneficial Bacteria. *Bio/Technology* **6**: 282 - 286.
- Davison J** (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.

- Dazzo FB, Truchet GL, Sherwood JE, Hrabak EM, Abe M & Pankratz SH** (1984) Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **48**: 1140-1150.
- Del Papa MF, Balague LJ, Sowinski SC, Wegener C, Segundo E, Abarca FM, Toro N, Niehaus K, A P, Aguilar OM, Martinez-Drets G & Lagares A** (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central argentina and uruguay. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1420-1427.
- Del Papa MF, Pistorio M, Draghi WO, Lozano MJ, Giusti MA, Medina C, van Dillewijn P, Martinez-Abarca F, Moron Flores B, Ruiz-Sainz JE, Megías M, Pühler A, Niehaus K, Toro N & Lagares A** (2007) Identification and characterization of a *nodH* ortholog from the alfalfa-nodulating Or191-like rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 138-145.
- Demont N, Ardourel M, Maillet F, Promé D, Ferro M, Promé J-C & Dénarié J** (1994) The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by ( $\omega$ -1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO J* **13**: 2139-2149.
- Denarie J & Cullimore J** (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**: 951-954.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM & Gascuel O** (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* **36**: W465-469.
- Ding H & Hynes MF** (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can J Microbiol* **55**: 917-927.
- Dombrecht B, Vanderleyden J & Michiels J** (2001) Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 426-430.
- Duke J** (1983) Handbook of Energy Crops. Publicado en Internet.
- Eardly BD, Hannaway DB & Bottomley PJ** (1985) Characterization of Rhizobia from Ineffective Alfalfa Nodules: Ability to Nodulate Bean Plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.]. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1422-1427.
- Eardly BD, Young JP & Selander RK** (1992) Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1809-1815.
- Eardly BD, Wang FS, Whittam TS & Selander RK** (1995) Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* **61**: 507-512.
- Eckhardt T** (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Ellis JG, Kerr A, Petit A & Tempe J** (1982) Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids —The role of agrocinopines. *Molecular and General Genetics MGG* **186**: 269-274-274.
- Faucher C, Maillet F, Vasse J, Rosenberg C, van Brussel AA, Truchet G & Dénarié J** (1988) *Rhizobium meliloti* host range *nodH* gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. *J Bacteriol* **170**: 5489-5499.
- Felsenstein J** (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Fellay R, Perret X, Viprey V, Broughton WJ & Brenner S** (1995) Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol* **16**: 657-667.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE & Gresshoff PM** (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**: 61-76.
- Figurski DH & Helinski DR** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1648-1652.
- Finan TM, Kunkel B, De Vos GF & Signer ER** (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of Bacteriology* **167**: 66-72.

- Finan TM, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorholter FJ, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A, Gouzy J, Golding B & Pühler A** (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9889-9894.
- Fischer HM** (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-386.
- Fisher RF, Egelhoff TT, Mulligan JT & Long SR** (1988) Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev* **2**: 282-293.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM & et al.** (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Folch-Mallol JL, Marroqui S, Sousa C, Manyani H, López-Lara IM, van der Drift KM, Haverkamp J, Quinto C, Gil-Serrano A, Thomas-Oates J, Spaink HP & Megías M** (1996) Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of nodH and nodPQ genes in their sulfation. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 151-163.
- Foucher F & Kondorosi E** (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol* **43**: 773-786.
- Fred EB, Baldwin IL & McCoy E** (1932) *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. University of Wisconsin. **343**.
- Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A & Perret X** (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.
- Frost LS, Ippen-Ihler K & Skurray RA** (1994) Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev* **58**: 162-210.
- Frost LS, Leplae R, Summers AO & Toussaint A** (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.
- Fry JC & Day MJ** (1990) *Bacterial genetics in natural environments*. Chapman and Hall., London. .
- Gage DJ** (2002) Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 7042-7046.
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC & Batut J** (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672.
- García de los Santos A, Brom S & D. R** (1996) *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World Journal Microbiology Biotechnology* **12**: 119-125.
- Garcillan-Barcia MP & de la Cruz F** (2008) Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**: 1-18.
- Geelen D, Leyman B, Mergaert P, Klarskov K, Van Montagu M, Geremia R & Holsters M** (1995) NodS is an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that methylates chitoooligosaccharides deacetylated at the non-reducing end. *Mol Microbiol* **17**: 387-397.
- Geniaux E & Amarger N** (1993) Diversity and stability of plasmid transfer in isolates from a single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS Microbiology Ecology* **102**: 251-260.
- Glazebrook J & Walker GC** (1989) A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**: 661-672.

- Glenn AR & Dilworth MJ** (1994) The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letters* **123**: 1-9.
- Gogarten JP & Townsend JP** (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 679-687.
- Gogarten JP, Doolittle WF & Lawrence JG** (2002) Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 2226-2238.
- Goldenfeld N & Woese C** (2007) Biology's next revolution. *Nature* **445**: 369.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M & Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**: 2680-2693.
- Gonzalez JE & Keshavan ND** (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 859-875.
- Gonzalez V, Acosta JL, Santamaria RI, Bustos P, Fernandez JL, Hernandez Gonzalez IL, Diaz R, Flores M, Palacios R, Mora J & Davila G** (2010) Conserved symbiotic plasmid DNA sequences in the multireplicon pangenomic structure of *Rhizobium etli*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1604-1614.
- González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J & Dávila G** (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3834-3839.
- Goodner B, Hinkle G, Gattung S, Miller N, Blanchard M, Quorollo B, Goldman BS, Cao Y, Askenazi M, Halling C, Mullin L, Houmiel K, Gordon J, Vaudin M, Iartchouk O, Epp A, Liu F, Wollam C, Allinger M, Doughty D, Scott C, Lappas C, Markelz B, Flanagan C, Crowell C, Gurson J, Lomo C, Sear C, Strub G, Cielo C & Slater S** (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2323-2328.
- Gordon D, Abajian C & Green P** (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**: 195-202.
- Gottfert M, Holzhauser D, Bani D & Hennecke H** (1992) Structural and functional analysis of two different nodD genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 257-265.
- Gotz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschape H, van Elsas JD & Smalla K** (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2621-2628.
- Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martínez E, Aarons SR & Quito C** (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can J Microbiol* **40**: 198-207.
- Groisman EA & Ochman H** (1997) How Salmonella became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**: 343-349.
- Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I & Tschape H** (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.
- Hahn M & Hennecke H** (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.
- Hall B** (1984) Adaptation by acquisition of novel enzyme activities in the laboratory. *Evolution of new phenotypes. Current Perspectives in Microbial Ecology*, (Klug MJ & Reddy CA, ed.), p. 79-86. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Hansen LH, Sorensen SJ & Jensen LB** (1997) Chromosomal insertion of the entire *Escherichia coli* lactose operon, into two strains of *Pseudomonas*, using a modified mini-Tn5 delivery system. *Gene* **186**: 167-173.

- He X, Chang W, Pierce DL, Seib LO, Wagner J & Fuqua C** (2003) Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J Bacteriol* **185**: 809-822.
- Helal HM & Sauerbeck D** (1989) Carbon Turnover in the Rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **152**: 211-216.
- Herrera-Cervera JA, Olivares J & Sanjuan J** (1996) Ammonia Inhibition of Plasmid pRmeGR4a Conjugal Transfer between *Rhizobium meliloti* Strains. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1145-1150.
- Herrera-Cervera JA, Sanjuan-Pinilla JM, Olivares J & Sanjuan J** (1998) Cloning and identification of conjugative transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome. *J Bacteriol* **180**: 4583-4590.
- Herrick JB, Stuart-Keil KG, Ghiorse WC & Madsen EL** (1997) Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2330-2337.
- Hijano EH & Basigalup DH** (1995) El cultivo de la alfalfa en la República Argentina.
- Hirsch PR, Van Montagu M & Johnston AWB** (1980) Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* **120**: 403-412.
- Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR & Zamir A** (1965) Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* **147**: 1462-1465.
- Hooykaas PJ, Snijdwint FG & Schilperoort RA** (1982) Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **8**: 73-82.
- Hooykaas PJ, den Dulk-Ras H, Regensburg-Tuink AJ, van Brussel AA & Schilperoort RA** (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 PJJ, van Brussel AAN, den Dulk-Ras H, van Slogteren GMS & Schilperoort RA** (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **291**: 351-354.
- Howieson J, Ewing M & D'Antuono M** (1988) Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil* **105**: 179-188.
- Howieson J, Robson A & Abbott L** (1992) Acid-Tolerant Species of *Medicago* Produce Root Exudates at Low pH Which Induce the Expression of Nodulation Genes in *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Plant Physiology* **19**: 287-296.
- Hozbor DF, Pich Otero AJ, Wynne ME, Petruccelli S & Lagares A** (1998) Recovery of Tn5-flanking bacterial DNA by vector-mediated walking from the transposon to the host genome. *Anal Biochem* **259**: 286-288.
- Hozbor DF, Pich Otero AJ, Lodeiro AR, Del Papa MF, Pistorio M & Lagares A** (2004) The symbiotic defect in a *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant can be overcome by expression of other surface polysaccharides. *Res Microbiol* **155**: 855-860.
- Hutchison CA, 3rd** (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* **35**: 6227-6237.
- Hwang I, Li PL, Zhang L, Piper KR, Cook DM, Tate ME & Farrand SK** (1994) TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4639-4643.
- Hynes MF & McGregor NF** (1990) Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* **4**: 567-574.
- Hynes MF & Finan TM** (1997) General Genetic Knowledge. *The Rhizobiaceae*, (Spanik HP, Kondorosi A & Hooykaas PJJ, ed.), p. 25-43. Kluwers Academic Publishers.
- Hynes MF, Simon R & Puhler A** (1985) The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid* **13**: 99-105.

- Hynes MF, Simon R, Müller P, Niehaus K, Labes M & Pühler A (1986) The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Molecular and General Genetics MGG* **202**: 356-362.
- Izquierdo J, Venkova-Canova T, Ramirez-Romero MA, Tellez-Sosa J, Hernandez-Lucas I, Sanjuan J & Cevallos MA (2005) An antisense RNA plays a central role in the replication control of a *repC* plasmid. *Plasmid* **54**: 259-277.
- Jackson LE, Burger M & Cavagnaro TR (2008) Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. Vol. 59, p. 341-363.
- Jiang SC & Paul JH (1998) Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2780-2787.
- Johnston AWB, Hombrecher G, Brewin NJ & Cooper MC (1982) Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J Gen Microbiol* **128**: 85-93.
- Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR & Beringer JE (1978) High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* **276**: 634-636.
- Jonas DA, Elmadfa I, Engel KH, Heller KJ, Kozianowski G, König A, Müller D, Narbonne JF, Wackernagel W & Kleiner J (2001) Safety considerations of DNA in food. *Ann Nutr Metab* **45**: 235-254.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619-633.
- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW & Crook DW (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 376-393.
- Juni E (1972) Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J Bacteriol* **112**: 917-931.
- Kado CI (2009) Horizontal gene transfer: Sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology* **10**: 143-150.
- Kaijalainen S & Lindström K (1989) Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *Journal of Bacteriology* **171**: 5561-5566.
- Kaluza K, Hahn M & Hennecke H (1985) Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. *Journal of Bacteriology* **162**: 535-542.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M & Tabata S (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**: 189-197.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M & Tabata S (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**: 331-338.
- Kessler B, de Lorenzo V & Timmis KN (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- Khanna M & Stotzky G (1992) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1930-1939.
- Kidambi SP, Ripp S & Miller RV (1994) Evidence for phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. *Appl Environ Microbiol* **60**: 496-500.
- Kinkle BK & Schmidt EL (1991) Transfer of the Pea Symbiotic Plasmid pJB5JI in Nonsterile Soil. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3264-3269.
- Kinkle BK, Sadowsky MJ, Schmidt EL & Koskinen WC (1993) Plasmids pJP4 and r68.45 Can Be Transferred between Populations of Bradyrhizobia in Nonsterile Soil. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1762-1766.

- Kirchner O & Tauch A** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 287-299.
- Kondorosi A, Kondorosi E, Pankhurst CE, Broughton WJ & Banfalvi Z** (1982) Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 433-439.
- Koonin EV & Wolf YI** (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research* **36**: 6688-6719.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krishnan HB, Lewin A, Fellay R, Broughton WJ & Pueppke SG** (1992) Differential expression of *nodS* accounts for the varied abilities of *Rhizobium fredii* USDA257 and *Rhizobium* sp. strain NGR234 to nodulate *Leucaena* spp. *Mol Microbiol* **6**: 3321-3330.
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C & Salzberg SL** (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**: R12.
- Lagares A, Caetano-Anolles G, Niehaus K, Lorenzen J, Ljunggren HD, Puhler A & Favelukes G** (1992) A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J Bacteriol* **174**: 5941-5952.
- Lagares A, Hozbor DF, Niehaus K, Otero AJ, Lorenzen J, Arnold W & Puhler A** (2001) Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* **183**: 1248-1258.
- Laguerre G, Geniaux E, Mazurier SI, Casartelli RR & Amarger N** (1993) Conformity and diversity among field isolated of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Canadian Journal of Microbiology* **39**: 412-419.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P & Amarger N** (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**: 981-993.
- Laguerre G, Courde L, Nouaim R, Lamy I, Revellin C, Breuil MC & Chaussod R** (2006) Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb Ecol* **52**: 426-435.
- Landeta C, Davalos A, Cevallos MA, Geiger O, Brom S & Romero D** (2011) Plasmids with a chromosome-like role in *Rhizobium*. *J Bacteriol.*
- Larkcom J** (1980) *Salads all the Year Round*. Hamlyn.
- Laus MC, van Brussel AA & Kijne JW** (2005a) Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 533-538.
- Laus MC, van Brussel AA & Kijne JW** (2005b) Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1123-1129.
- Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ & Frost LS** (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 1-15.
- Lawrence JG** (1999) Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol* **2**: 519-523.
- Lawrence JG & Ochman H** (1997) Amelioration of bacterial genomes: Rates of change and exchange. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 383-397.
- Lawrence JG & Ochman H** (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9413-9417.
- Leigh JA, Signer ER & Walker GC** (1985) Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6231-6235.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé J-C & Dénarié J** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.

- Levy SB (1992) *The Antibiotic Paradox. How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle*. Plenum Press, New York.
- Li PL, Everhart DM & Farrand SK (1998) Genetic and sequence analysis of the pTiC58 trb locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *Journal of Bacteriology* **180**: 6164-6172.
- Li PL, Hwang I, Miyagi H, True H & Farrand SK (1999) Essential components of the Ti plasmid *trb* system, a type IV macromolecular transporter. *J Bacteriol* **181**: 5033-5041.
- Lilley AK, Fry JC, Day MJ & Bailey MJ (1994) *In situ* transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology* **140**: 27-33.
- Lilley AK, Bailey MJ, Barr M, Kilshaw K, Timms-Wilson TM, Day MJ, Norris SJ, Jones TH & Godfray HCJ (2003) Population dynamics and gene transfer in genetically modified bacteria in a model microcosm. *Molecular Ecology* **12**: 3097-3107.
- Lobry JR (1996) Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Mol Biol Evol* **13**: 660-665.
- Lodeiro AR, Gonzalez P, Hernandez A, Balague LJ & Favelukes G (2000) Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grown common beans. *Plant Sci* **154**: 31-41.
- López-Lara IM & Geiger O (2001) The nodulation protein NodG shows the enzymatic activity of an 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 349-357.
- Lorenz MG & Wackernagel W (1990) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch Microbiol* **154**: 380-385.
- Lorenz MG & Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**: 563-602.
- Lorenz MG, Aardema BW & Wackernagel W (1988) Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J Gen Microbiol* **134**: 107-112.
- Lozano L, Hernandez-Gonzalez I, Bustos P, Santamaria RI, Souza V, Young JP, Davila G & Gonzalez V (2010) Evolutionary dynamics of insertion sequences in relation to the evolutionary histories of the chromosome and symbiotic plasmid genes of *Rhizobium etli* populations. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6504-6513.
- MacLellan SR, Smallbone LA, Sibley CD & Finan TM (2005) The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of alpha-proteobacterial plasmids. *Mol Microbiol* **55**: 611-623.
- Marketon MM & Gonzalez JE (2002) Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 3466-3475.
- Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P & Oldroyd GE (2007) *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* **144**: 324-335.
- Martens M, Delaere M, Coopman R, De Vos P, Gillis M & Willems A (2007) Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 489-503.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P & Willems A (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 200-214.
- Martínez-Romero E (2009) Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol* **28**: 361-370.
- Martínez-Romero E & Rosenblueth M (1990) Increased Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Nodulation Competitiveness of Genetically Modified *Rhizobium* Strains. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2384-2388.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X & Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458-466.
- Maxam AM & Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 560-564.



- Mercado-Blanco J & Olivares J** (1993) Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. Their possible use in the construction of cloning vectors of rhizobia. *Archives of Microbiology* **160**: 477-485.
- Mercado-Blanco J & Olivares J** (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**: 75-79.
- Mercado-Blanco J & Toro N** (1996) Plasmids in Rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. *Molecular Plant Microbe Interaction* **9**: 535-545.
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A & Kondorosi E** (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 5230-5235.
- Metzker ML** (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11**: 31-46.
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R & Puhler A** (2003) GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 2187-2195.
- Michaud R, Lehman WF & Rumbaugh MD** (1988) World distribution and historical development. American Society of Agronomy, Madison, Wis., USA
- Miller JH** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller WG & Lindow SE** (1997) An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* **191**: 149-153.
- Molbak L, Tett A, Ussery DW, Wall K, Turner S, Bailey M & Field D** (2003) The plasmid genome database. *Microbiology* **149**: 3043-3045.
- Moré MI, Finger LD, Stryker JL, Fuqua C, Eberhard A & Winans SC** (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**: 1655-1658.
- Morrison WD, Miller RV & Sayler GS** (1978) Frequency of F116-mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* **36**: 724-730.
- Mulligan JT & Long SR** (1989) A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics* **122**: 7-18.
- Nagachinta S & Chen J** (2009) Integron-mediated antibiotic resistance in shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* **72**: 21-27.
- Nelson WC, Howard MT, Sherman JA & Matson SW** (1995) The *traY* gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid *oriT*. *J Biol Chem* **270**: 28374-28380.
- Nisbet EG & Sleep NH** (2001) The habitat and nature of early life. *Nature* **409**: 1083-1091.
- Novick RP** (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* **51**: 381-395.
- Nyren P, Pettersson B & Uhlen M** (1993) Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem* **208**: 171-175.
- O'Hara G W, Goss TJ, Dilworth MJ & Glenn AR** (1989) Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **55**: 1870-1876.
- Obayori OS & Salam LB** (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids. *Scientific Research and Essays* **5**: 4096-4109.
- Ochman H** (2001) Lateral and oblique gene transfer. *Current Opinion in Genetics and Development* **11**: 616-619.
- Ochman H & Jones IB** (2000) Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **19**: 6637-6643.
- Ochman H, Lawrence JG & Grolsman EA** (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Oldroyd GE & Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519-546.

- Oresnik IJ, Liu SL, Yost CK & Hynes MF** (2000) Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J Bacteriol* **182**: 3582-3586.
- Orgambide GG, Lee J, Hollingsworth RI & Dazzo FB** (1995) Structurally diverse chitolipooligosaccharide nod factors accumulate primarily in membranes of wild type *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biochemistry* **34**: 3832-3840.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P & Udvardi MK** (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**: 531-535.
- Ozga DA, Lara JC & Leig JA** (1994) The regulation of exopolysaccharide production is important at two levels of nodule development in *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 758-765.
- Paget E & Simonet P** (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **15**: 109-117.
- Pankhurst CE, McDonald PE & Reeves JM** (1986) Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *Journal of General Microbiology* **132**: 2321-2328.
- Pappas KM & Winans SC** (2003) The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid *repABC* operon. *Mol Microbiol* **49**: 441-455.
- Pappas KM, Weingart CL & Winans SC** (2004) Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol* **53**: 755-769.
- Penfold SS, Simon J & Frost LS** (1996) Regulation of the expression of the *traM* gene of the F sex factor of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 549-558.
- Peoples MB & Herridge DF** (1990) Nitrogen fixation by legumes in tropical and sub-tropical agriculture. *Adv. Agron.* **44**: 155-224.
- Peoples MB & Craswell ET** (1992) Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* **141**: 13-39.
- Perez-Mendoza D, Dominguez-Ferreras A, Munoz S, Soto MJ, Olivares J, Brom S, Girard L, Herrera-Cervera JA & Sanjuan J** (2004) Identification of functional mob regions in *Rhizobium etli*: evidence for self-transmissibility of the symbiotic plasmid pRetCFN42d. *J Bacteriol* **186**: 5753-5761.
- Perez-Mendoza D, Sepulveda E, Pando V, Munoz S, Nogales J, Olivares J, Soto MJ, Herrera-Cervera JA, Romero D, Brom S & Sanjuan J** (2005) Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol* **187**: 7341-7350.
- Perret X, Broughton WJ & Brenner S** (1991) Canonical ordered cosmid library of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* species NGR234. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1923-1927.
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 180-201.
- Perticari A, Gauna AC, Pacheco Basurco JC, Piantanida NA, Dieguez RN & Brutti LN** (1989) Encuesta sobre inoculación de leguminosas forrajeras en la República Argentina. *Divulgación Técnica del Instituto de Microbiología Agrícola. CICA-INTA, Castelar, Argentina.*
- Pinto FG, Chueire LM, Vasconcelos AT, Nicolas MF, Almeida LG, Souza RC, Menna P, Barcellos FG, Megias M & Hungria M** (2009) Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. *Funct Integr Genomics* **9**: 263-270.
- Pinto UM & Winans SC** (2009) Dimerization of the quorum-sensing transcription factor TraR enhances resistance to cytoplasmic proteolysis. *Mol Microbiol* **73**: 32-42.
- Piper KR, Beck von Bodman S & Farrand SK** (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.
- Pistorio M, Del Papa MF, Balague LJ & Lagares A** (2003) Identification of a transmissible plasmid from an Argentine *Sinorhizobium meliloti* strain which can be mobilised by

- conjugative helper functions of the European strain *S. meliloti* GR4. FEMS Microbiol Lett **225**: 15-21.
- Pistorio M, Balague LJ, Del Papa MF, Pich-Otero A, Lodeiro A, Hozbor DF & Lagares A** (2002) Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP-P64L/S65T. FEMS Microbiol Lett **214**: 165-170.
- Pistorio M, Giusti MA, Del Papa MF, Draghi WO, Lozano MJ, Tejerizo GT & Lagares A** (2008) Conjugal properties of the *Sinorhizobium meliloti* plasmid mobilome. FEMS Microbiol Ecol **65**: 372-382.
- Poupot R, Martínez-Romero E & Promé J-C** (1993) Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acetylglucosaminyl terminus. Biochemistry **32**: 10430-10435.
- Poupot R, Martínez-Romero E, Gautier N & Promé J-C** (1995) Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. J Biol Chem **270**: 6050-6055.
- Prentki P & Krisch HM** (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene **29**: 303-313.
- Price NP, Relić B, Talmont F, Lewin A, Promé D, Pueppke SG, Maillet F, Dénarié J, Promé J-C & Broughton WJ** (1992) Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. Mol Microbiol **6**: 3575-3584.
- Quandt J, Clark RG, Venter AP, Clark SR, Twelker S, Hynes MF, Oresnik IJ, Liu SL, Yost CK, O'Connell M, Noel TC, Yeung EC & Hynes M** (2004) Modified RP4 and Tn5-Mob derivatives for facilitated manipulation of large plasmids in Gram-negative bacteria. Plasmid **52**: 1-12.
- Quelas JI, Lopez-Garcia SL, Casabuono A, Althabegoiti MJ, Mongiardini EJ, Perez-Gimenez J, Couto A & Lodeiro AR** (2006) Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. Arch Microbiol **186**: 119-128.
- Ramírez-Romero MA, Téllez-Sosa J, Barrios H, Pérez-Oseguera A, Rosas V & Cevallos MA** (2001) RepA negatively autoregulates the transcription of the repABC operon of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid basic replicon. Molecular Microbiology **42**: 195-204.
- Rao JR, Fenton M & Jarvis BDW** (1994) Symbiotic plasmid transfer in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and competition between the inoculant strain lcmp2163 and transconjugant soil bacteria. Soil Biol. Biochem. **26**: 339-351.
- Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Brau L, Nandesena K, Tiwari R, Copeland A, Nolan M, Han C, Brettin T, Land M, Ovchinikova G, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V, Kyrpides N, Melino V, Denton M, Yates R & Howieson J** (2010a) Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. Stand Genomic Sci **2**: 347-356.
- Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Brau L, Nandesena K, Tiwari R, Malfatti S, Kiss H, Lapidus A, Copeland A, Nolan M, Land M, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V, Kyrpides N, Melino V, Denton M, Yates R & Howieson J** (2010b) Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. Stand Genomic Sci **2**: 66-76.
- Reeve W, Chain P, O'Hara G, Ardley J, Nandesena K, Brau L, Tiwari R, Malfatti S, Kiss H, Lapidus A, Copeland A, Nolan M, Land M, Hauser L, Chang YJ, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V, Kyrpides N, Gollagher M, Yates R, Dilworth M & Howieson J** (2010c) Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont Ensifer (*Sinorhizobium*) medicae strain WSM419. Stand Genomic Sci **2**: 77-86.
- Reeve WG, Tiwari RP, Dilworth MJ & Glenn AR** (1993) Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. Soil Biology and Biochemistry **25**: 581-586.
- Roche P, Debelle F, Lerouge P, Vasse J, Truchet G, Promé J-C & Dénarié J** (1992) The lipooligosaccharidic symbiotic signals of *Rhizobium meliloti*. Biochem Soc Trans **20**: 288-291.

- Rogel MA, Ormeno-Orrillo E & Martinez Romero E** (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* **34**: 96-104.
- Romanowski G, Lorenz MG & Wackernagel W** (1993) Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm--adsorption, DNAase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol Ecol* **2**: 171-181.
- Romine MF, Fredrickson JK & Li SMW** (1999) Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain f199. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **23**: 303-313.
- Ronaghi M, Uhlen M & Nyren P** (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363, 365.
- Rostas K, Kondorosi E, Horvath B, Simoncsits A & Kondorosi A** (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1757-1761.
- Salyers AA & Shoemaker NB** (1996) Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. *Clin Infect Dis* **23 Suppl 1**: S36-43.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR** (1977a) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM & Smith M** (1977b) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687-695.
- Sanjuan J & Olivares J** (1989) Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. *J Bacteriol* **171**: 4154-4161.
- Sanjuan J, Carlson RW, Spaink HP, Bhat UR, Barbour WM, Glushka J & Stacey G** (1992) A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8789-8793.
- Saye DJ, Ogunseitán O, Saylor GS & Miller RV** (1987) Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **53**: 987-995.
- Scott DB & Ronson CW** (1982) Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology* **151**: 36-43.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schjørring S, Struve C & Kroghfelt KA** (2008) Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62**: 1086-1093.
- Schlaman HR, Okker RJ & Lugtenberg BJ** (1992) Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J Bacteriol* **174**: 5177-5182.
- Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, Bakkou N, Le Quere A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Roser A, Flores M, Palacios R, Brenner S, Gottschalk G, Schmitz RA, Broughton WJ, Perret X, Strittmatter AW & Streit WR** (2009) *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4035-4045.
- Schneiker-Bekel S, Wibberg D, Bekel T, Blom J, Linke B, Neuweiger H, Stiens M, Vorholter FJ, Weidner S, Goesmann A, Puhler A & Schluter A** (2011) The complete genome sequence of the dominant *Sinorhizobium meliloti* field isolate SM11 extends the *S. meliloti* pan-genome. *J Biotechnol*.
- Schofield PR, Gibson AH, Dudman WF & Watson JM** (1987) Evidence for Genetic Exchange and Recombination of *Rhizobium* Symbiotic Plasmids in a Soil Population. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2942-2947.

- Schultze M, Staehelin C, Röhrig H, John M, Schmidt J, Kondorosi E, Schell J & Kondorosi A** (1995) In vitro sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2706-2709.
- Segundo E, F. Martinez-Abarca P, Dillewijn M, Fernández-López A, Lagares G, Martinez-Drets K, Niehaus A, Pühler N, Toro** (1999) Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 169-176.
- Selbitschka W & Lotz W** (1991) Instability of Cryptic Plasmids Affects the Symbiotic Effectivity of *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae Strains. *Molecular Plant Microbe Interaction* **4**: 608-618.
- Sepulveda E, Perez-Mendoza D, Ramirez-Romero MA, Soto MJ, Lopez-Lara IM, Geiger O, Sanjuan J, Brom S & Romero D** (2008) Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **190**: 4189-4197.
- Sieberer BJ, Timmers AC & Emons AM** (2005) Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1195-1204.
- Simon R, Priefer U & Pühler A** (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Simon R, Quandt J & Klipp W** (1989) New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene* **80**: 161-169.
- Simpson DJ, Fry JC, Rogers HJ & Day MJ** (2007) Transformation of *Acinetobacter baylyi* in non-sterile soil using recombinant plant nuclear DNA. *Environmental Biosafety Research* **6**: 101-112.
- Slater A** (1984) Genetic interactions in microbial communities. *Current Perspectives in Microbial Ecology*, (Klug MJ & Reddy CA, ed. eds.), p. pp. 87-93. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Slater SC, Goldman BS, Goodner B, Setubal JC, Farrand SK, Nester EW, Burr TJ, Banta L, Dickerman AW, Paulsen I, Otten L, Suen G, Welch R, Almeida NF, Arnold F, Burton OT, Du Z, Ewing A, Godsy E, Heisel S, Houmiel KL, Jhaveri J, Lu J, Miller NM, Norton S, Chen Q, Phoolcharoen W, Ohlin V, Ondrusek D, Pride N, Stricklin SL, Sun J, Wheeler C, Wilson L, Zhu H & Wood DW** (2009) Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J Bacteriol* **191**: 2501-2511.
- Smets BF & Barkay T** (2005) Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat Rev Microbiol* **3**: 675-678.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB & Hood LE** (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**: 674-679.
- Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N & Wuertz S** (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* **3**: 700-710.
- Soto MJ, Dillewijn P, Martinez-Abarca F, Jimenez-Zurdo JI & Toro N** (2004) Attachment to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria *Rhizobium* sp. LPU83. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 71-77.
- Soto MJ, Zorzano A, Mercado-Blanco J, Lepek V, Olivares J & Toro N** (1993) Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nfe*. *J Mol Biol* **229**: 570-576.
- Spaink H, Wijffelman C, Okker R & Lugtenberg B** (1989) Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nodD* genes. *Plant Molecular Biology* **12**: 59-73.
- Spaink HP, Aarts A, Stacey G, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ & Kennedy EP** (1992) Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 72-80.

- Stewart GJ, Sinigalliano CD & Garko KA** (1991) Binding of exogenous DNA to marine sediments and the effect of DNA/sediment binding on natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell in sediment columns. *FEMS Microbiology Ecology* **8**: 1-8.
- Stiens M, Schneiker S, Puhler A & Schlüter A** (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 Microbiology Letters* **271**: 297-309.
- Stiens M, Schneiker S, Keller M, Kuhn S, Pühler A & Schlüter A** (2006) Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3662-3672.
- Stuart-Keil KG, Hohnstock AM, Drees KP, Herrick JB & Madsen EL** (1998) Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3633-3640.
- Sullivan JT & Ronson CW** (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5145-5149.
- Sullivan JT, Eardly BD, van Berkum P & Ronson CW** (1996) Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2818-2825.
- Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott DB & Ronson CW** (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8985-8989.
- Sundin GW** (2008) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. Vol. 45. p. 129-151.
- Swanson JA, Mulligan JT & Long SR** (1993) Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics* **134**: 435-444.
- Syvanen M** (1994) Horizontal gene transfer: Evidence and possible consequences. *Annual Review of Genetics* **28**: 237-261.
- Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann KH, Gutzkow T, Eichler W, Puhler A & Schlüter A** (2009) Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* **155**: 2306-2319.
- Szpirer CY, Faelen M & Couturier M** (2000) Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob. *Mol Microbiol* **37**: 1283-1292.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- Tatusov RL, Koonin EV & Lipman DJ** (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**: 631-637.
- Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R & Fraser CM** (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13950-13955.
- Thomas CM & Nielsen KM** (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711-721.
- Troxler J, Azelvandre P, Zala M, Defago G & Haas D** (1997) Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonas in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol* **63**: 213-219.

- Truchet G, Rosenberg C, Vasse J, Julliot JS, Camut S & Denarie J** (1984) Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: host-specific nodulation by atypical infection. *J Bacteriol* **157**: 134-142.
- Tun-Garrido C, Bustos P, Gonzalez V & Brom S** (2003) Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**: 1681-1692.
- Tung WL & Chow KC** (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**: 128-129.
- Udvardi MK & Day DA** (1997) Metabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 493-523.
- Valdes AM & Piñeiro D** (1992) Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria. *Evolution* **46**: 641-656.
- van Berkum P, Beyene D & Eardly BD** (1996) Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int J Syst Bacteriol* **46**: 240-244.
- van Berkum P, Elia P & Eardly BD** (2010) The application of Multi-Locus Sequence Typing (MLST) to study the genetic structure of mega-plasmids in *Medicago*-nodulating rhizobia. *Appl Environ Microbiol*.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, Farkas A, Mikulass K, Nagy A, Tiricz H, Satiat-Jeunemaitre B, Alunni B, Bourge M, Kucho K, Abe M, Kereszt A, Maroti G, Uchiumi T, Kondorosi E & Mergaert P** (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122-1126.
- van der Meer JR** (1997) Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 159-178.
- van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S & Zehnder AJ** (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev* **56**: 677-694.
- Van Elsas JD, Trevors JT, Van Overbeek LS & Starodub ME** (1989) Survival of *Pseudomonas fluorescens* containing plasmids RP4 or pRK2501 and plasmid stability after introduction into two soils of different texture. *Canadian Journal of Microbiology* **35**: 951-959.
- van Elsas JD, Gardener BB, Wolters AC & Smit E** (1998) Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **64**: 880-889.
- van Rhijn P & Vanderleyden J** (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**: 124-142.
- van Rhijn P, Goldberg RB & Hirsch AM** (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* **10**: 1233-1250.
- van Rhijn PJ, Feys B, Verreth C & Vanderleyden J** (1993) Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J Bacteriol* **175**: 438-447.
- Venkova-Canova T, Soberón NE, Ramírez-Romero MA & Cevallos MA** (2004) Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: An antisense RNA and a stem-loop structure. *Molecular Microbiology* **54**: 1431-1444.
- Vetsigian K & Goldenfeld N** (2005) Global divergence of microbial genome sequences mediated by propagating fronts. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 7332-7337.
- Vincent JM** (1970) A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, Oxford.
- Wais RJ, Keating DH & Long SR** (2002) Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol* **129**: 211-224.
- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T & Long S** (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* **327**: 1126-1129.
- Watson RJ & Heys R** (2006) Replication regions of *Sinorhizobium meliloti* plasmids. *Plasmid* **55**: 87-98.

- Wegener C, Schröder S, Kapp D, Pühler A, Lopez ES, Martínez-Abarca F, Toro N, Del Papa MF, Balague LJ, Lagares A, Martínez-Drets G & Niehaus K** (2001) Genetic uniformity and symbiotic properties of acid-tolerant alfalfa-nodulating rhizobia isolated from dispersed locations throughout Argentina. *Symbiosis* **30**: 141-162.
- Wilson M & Lindow SE** (1993) Release of recombinant microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **47**: 913-944.
- Willems A** (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* **287**: 3-14.
- Willetts N** (1977) The transcriptional control of fertility in F-like plasmids. *J Mol Biol* **112**: 141-148.
- Williams HG, Day MJ, Fry JC & Stewart GJ** (1996) Natural transformation in river epilithon. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2994-2998.
- Williams PA & Sayers JR** (1994) The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* **5**: 195-217.
- Willis LB & Walker GC** (1998) The *phbC* (poly-beta-hydroxybutyrate synthase) gene of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and characterization of *phbC* mutants. *Can J Microbiol* **44**: 554-564.
- Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, Okura VK, Zhou Y, Chen L, Wood GE, Almeida NF, Jr., Woo L, Chen Y, Paulsen IT, Eisen JA, Karp PD, Bovee D, Sr., Chapman P, Clendenning J, Deatherage G, Gillet W, Grant C, Kuttyavin T, Levy R, Li MJ, McClelland E, Palmieri A, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Wu Z, Romero P, Gordon D, Zhang S, Yoo H, Tao Y, Biddle P, Jung M, Krespan W, Perry M, Gordon-Kamm B, Liao L, Kim S, Hendrick C, Zhao ZY, Dolan M, Chumley F, Tingey SV, Tomb JF, Gordon MP, Olson MV & Nester EW** (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2317-2323.
- Yan JJ, Chiu CH, Ko WC, Chuang CL & Wu JJ** (2002) Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serovar hadar: Evidence for interspecies transfer of BLACMY-2 in a Taiwanese University Hospital. *Journal of the Formosan Medical Association* **101**: 665-668.
- Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Young JP, Crossman LC, Johnston AW, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson AR, Todd JD, Poole PS, Mauchline TH, East AK, Quail MA, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach I, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S & Parkhill J** (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**: R34.
- Young JPW & Wexler M** (1988) Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2731-2739.
- Zambryski P, Tempe J & Schell J** (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**: 193-201.
- Zhan HJ, Lavery SB, Lee CC & Leigh JA** (1989) A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3055-3059.
- Zhang L, Murphy PJ, Kerr A & Tate ME** (1993) *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* **362**: 446-448.



