Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

# *Evaluación de la transferencia conjugativa de plásmidos de rizobios*

María Delfina Cabrera
Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

Director: Dr. Gonzalo A. Torres Tejerizo
Tutor: Dr. Lucas G. Castellani

# *Índice de contenido*

Capítulo I. Introducción ..... 6
I.1. Importancia del nitrógeno ..... 7
I.2. Los rizobios ..... 8
I.3. Características genéticas de los rizobios ..... 8
I.4. Transferencia horizontal de genes ..... 9
I.4.a. Transducción ..... 10
I.4.b. Transformación ..... 10
I.4.c. Conjugación ..... 10
I.5. Regulación de la transferencia plasmídica en rizobios ..... 11
I.5.a. *Quorum Sensing* ..... 12
I.5.b. Sistema *rctA/rctB* ..... 13
I.6. Clasificación de los plásmidos de rizobios en base a sus sistemas conjugativos. ..... 14
I.8. Objetivos ..... 16
I.8.a. Objetivo general ..... 16
I.8.b. Objetivos específicos ..... 16
Capítulo II. Materiales y métodos ..... 17
II.1. Técnicas microbiológicas ..... 17
II.1.a. Cepas bacterianas y plásmidos ..... 18
II.1.b. Medios de cultivo y de conservación ..... 19
II.2. Antibióticos ..... 20
II.3. Procedimientos microbiológicos ..... 20
II.3.a. Conjugaciones biparentales ..... 20
II.3.b. Conjugaciones triparentales ..... 20
II.3.c. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E. coli* ..... 21
II.3.d. Recuento de bacterias ..... 21
II.4. Técnicas de Biología Molecular ..... 22
II.4.a. Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep) ..... 22
II.4.b. Extracción de ADN total ..... 22
II.4.c. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) ..... 22
II.4.d. Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple ..... 23
II.4.e. Tratamientos enzimáticos del ADN ..... 23
II.4.f. Electroforesis de ADN ..... 24
II.4.f.1. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa. ..... 24

II.4.f.2. Revelado de geles y fotografía. ..... 24
II.4.f.3. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción y productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa. ..... 24
II.4.f.4. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa. ..... 24
II.4.f.5. Geles de lisis in situ ..... 24
Capítulo III. Resultados ..... 26
Estrategia general ..... 27
III.1. Selección de las regiones intergénicas ..... 27
III.2. Amplificación de las regiones intergénicas ..... 28
III.3. Clonado de las regiones intergénicas ..... 30
III.4. Marcación de plásmidos – Integración de los vectores ..... 37
III.7. Evaluación del fenotipo conjugativo ..... 38
III.5. Amplificación del gen de la proteína TrbE ..... 40
III.6. Clonado del gen de la proteína TrbE ..... 42
III.7. Ensayos de complementación ..... 43
III.8. Evaluación del fenotipo conjugativo del pRL8 desde otro entorno genómico ..... 45
Capítulo IV. Discusión y conclusiones ..... 47
Capítulo V. Bibliografía ..... 50

# *Índice de figuras*

Figura I.1. Mecanismos de HGT .....9

Figura I.2. Esquema general del sistema de regulación por *Quorum Sensing* .....13

Figura I.3. Regulación de la transferencia del plásmido pSymA de *E. meliloti* por la represión mediada por RctA .....14

Figura I.4. Plásmidos de rizobios del grupo I ..... 15

Figura II.1. Marcadores de peso molecular utilizados en este trabajo ..... 25

Figura III.1. Estrategia general para el marcado de los plásmidos pRL8 o pSmeSM11b ..... 27

Figura III.2. Regiones intergénicas seleccionadas ..... 28

Figura III.3. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* pRL8 left-pRL8 right y pSM11 left-pSM11 right a 56 y 60°C ..... 29

Figura III.4. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* pRL8 left-pRL8 right a 50, 55.7 y 58.3°C ..... 30

Figura III.5. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 sobre colonias candidatas al clonado de la región intergénica 1 en el vector pK18mob ..... 31

Figura III.6. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 sobre colonias candidatas al clonado de la región intergénica 2 en el vector pK18mob ..... 32

Figura III.7. Evaluación del fragmento obtenido de pSmeSM11b clonado en el vector pK18mob ..... 33

Figura III.8. Evaluación de la orientación del fragmento obtenido de pRL8 clonado en pK18mob ..... 35

Figura III.9. Evaluación por secuenciación del fragmento de *S. meliloti* SM11 clonado ..... 36

Figura III.10. Electroforesis de los productos de PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y pSM11 chequeo sobre los transconjugantes *S. meliloti* SM11 - $Nm^r$ ..... 37

Figura III.11. Electroforesis de los productos de PCR utilizando los *primers* M13 Rv-40 y pRL8 chequeo sobre los transconjugantes *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 - $Nm^r$ ..... 38

Figura III.12. Frecuencias de la transferencia conjugativa de los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b desde su entorno parental hacia *A. tumefaciens* UBAPF2 ..... 39

Figura III.13. Perfiles plasmídicos de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 conteniendo el plásmido pRL8 sin marcar y marcado con antibiótico, y de *A. tumefaciens* UBAPF2 con y sin el plásmido marcado ..... 39

Figura III.14. Alineamiento del gen *trbE* de los plásmidos pLPU83a, pRL8 y pSmeSM11b ..... 40

Figura III.15. Estrategia para el clonado del gen de la proteína TrbE en el vector pBBR1MCS5 ..... 41

Figura III.16. Electroforesis de los productos de PCR, utilizando los *primers* trbE left y trbE right sobre la cepa *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, y del producto de la digestión del vector pBBR1MCS5 con la enzima de restricción SmaI ..... 42

Figura III.17. Electroforesis de los productos de PCR utilizando los pares de *primers* M13 Fw-40 – M13 Rv-40, M13 Rv-40 – TrbE left y M13 Rv-40 – TrbE right ..... 43

Figura III.18. Frecuencias de la transferencia conjugativa del plásmido pSmeSM11b conteniendo el vector vacío o el vector con la copia funcional de *trbE*, comparadas con la frecuencia conjugativa del pSmeSM11b ..... 44

Figura III.19. Perfiles plasmídicos de la transferencia de los plásmidos desde *E. coli* a *S. meliloti* SM11 ..... 44

Figura III.20. Perfiles plasmídicos de la transferencia de pSmeSM11b complementada con *trbE* ..... 45

Figura III.21. Frecuencias de la transferencia conjugativa del plásmido pRL8 desde su cepa parental *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (*R. leg.* bv. *viciae* 3841 (pRL8-Nm)) y desde *A. tumefaciens* UBAPF2 (*A. tum.* UBAPF2 (pRL8-Nm)) ..... 46

# *Índice de tablas*

Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo ..... 18

Tabla II.2. Plásmidos utilizados en este trabajo ..... 18

Tabla II.3. Composición del medio completo TY ..... 19

Tabla II.4. Composición del medio LB ..... 19

Tabla II.5. Concentración final de antibióticos en el medio de cultivo según la especie bacteriana ..... 20

Tabla II.6. Composición de las mezclas de reacción utilizadas en los ensayos de PCR ..... 22

Tabla II.7. *Primers* utilizados en este trabajo ..... 23

# *Capítulo I. Introducción*

## I.1. Importancia del nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento indispensable para el desarrollo de la vida debido a que es requerido para la síntesis de biomoléculas como las vitaminas, los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Si bien aproximadamente el 78% del aire está constituido por nitrógeno molecular ($N_2$), el mismo no puede ser utilizado por la mayoría de los organismos, ya que es muy poco reactivo debido a la alta energía de activación requerida para hidrolizar el triple enlace presente en la molécula (Canfield *et al*, 2010). Las plantas solamente pueden incorporar a su metabolismo N en forma de nitratos ($NO_3^-$) y de amonios ($NH_4^+$). Existe solo un grupo reducido de procariotas que son capaces de realizar un proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN), a partir del cual transforman el $N_2$ en amonio para luego utilizarlo en la biosíntesis de moléculas.

Las formas de nitrógeno que pueden ser utilizadas por las plantas se encuentran en concentraciones muy bajas en la mayoría de los suelos cultivables y constituyen, después del agua, el principal factor limitante del crecimiento y desarrollo vegetal. La falta de nitrógeno en los suelos es suplida mediante la adición de fertilizantes químicos, con el fin de aumentar la productividad de las cosechas. Sin embargo, el uso indiscriminado de dichos fertilizantes conlleva graves consecuencias ambientales. Parte del amonio utilizado en los cultivos percola en la tierra causando la contaminación de las fuentes subterráneas de agua y, en consecuencia, de ecosistemas acuáticos. Esto puede llevar a la eutrofización de ríos y lagos, es decir, el crecimiento en exceso de algas en la superficie, que agotan el oxígeno necesario para otras especies, con la consecuente pérdida de biodiversidad (Graham and Vance 2003). Además, la acumulación de nitratos en el agua puede alcanzar niveles tóxicos que representen una amenaza para la salud humana. Por otro lado, las moléculas del fertilizante pueden sufrir transformación química o biológica, generando gases nitrogenados que pasan a la atmósfera, contribuyendo al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida (Robertson and Vitousek 2009). La producción de fertilizantes nitrogenados se basa en el proceso industrial conocido como Haber-Bosch, el cual permite la producción de amonio ($NH_4^+$) a partir de la reacción entre hidrógeno y nitrógeno molecular ($N_2 + 3\ H_2 \rightarrow 2\ NH_3$). Esta reacción necesita un enorme consumo de combustibles fósiles, contribuyendo también al aumento global de la temperatura.

Los efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana han planteado la necesidad de implementar estrategias alternativas de fertilización que contribuyan a generar prácticas agrícolas sustentables. Con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos y evitar el uso de fertilizantes sintetizados químicamente, se suele aprovechar la capacidad fijadora de nitrógeno de los rizobios (bacterias presentes en los suelos) en simbiosis con plantas leguminosas, para introducir nitrógeno en los suelos destinados a la agricultura (Peoples & Herridge, 1990, Peoples & Craswell, 1992). A partir de esta simbiosis, las plantas leguminosas obtienen nitrógeno disponible para su crecimiento sin la necesidad de utilizar fertilizantes químicos nitrogenados y sin empobrecer los suelos de cultivo.

El problema ahora radica en que hay una escasa cantidad de conocimiento respecto a cómo la liberación masiva de rizobios puede afectar a la biodiversidad nativa de los suelos de cultivo, ya sea por la naturalización de estos rizobios inoculados en el tiempo como por los posibles eventos de transferencia horizontal de genes (HGT, **H**orizontal **G**ene **T**ransfer) entre los rizobios liberados y las bacterias nativas del suelo.

## I.2. Los rizobios

Los rizobios son bacterias gram negativas pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Brazyrhizobium*, *Allorhizobium* y *Rhizobium* (Willems 2006), entre otros, que se caracterizan por interaccionar simbióticamente con plantas leguminosas y por poseer una gran diversidad en su taxonomía, metabolismo y genética (Roy *et al*., 2020).

La simbiosis rizobio-leguminosa es la relación recíproca entre las plantas y la bacteria. El proceso comienza cuando la bacteria invade las raíces (o en casos raros, los tallos) e induce la formación de un nuevo órgano denominado nódulo, en el cual la bacteria se diferencia a bacteroide. Los bacteroides reducen el nitrógeno atmosférico en amonio y proveen a la planta de compuestos nitrogenados a cambio de compuestos carbonados y otros nutrientes. La planta gana en habilidad para crecer en suelos pobres en nitrógeno y la bacteria obtiene una cubierta protectora en la que se multiplica, y de la cual escapa en un gran número al ocurrir la senescencia del nódulo (Bécquer, C.J., 2012)

## I.3. Características genéticas de los rizobios

Los genomas de los rizobios suelen ser multipartitos. Usualmente, consisten de un cromosoma circular y un número variable de plásmidos (se han descripto entre 1 y 10) que pueden contener más del 50% de la información genética de la cepa (Romero & Brom, 2004, Gonzalez *et al*., 2010). Estos plásmidos tienen un tamaño que oscila entre 10 Kb y 1,5 Mb. Los genes requeridos para el establecimiento de la simbiosis (*nod*, *nif*, y *fix*) están localizados usualmente en uno o más plásmidos, a los que se les llama pSyms (plásmidos simbióticos), o bien pueden estar localizados en regiones cromosomales identificadas como islas simbióticas (Ding & Hynes, 2009). Otros plásmidos, llamados plásmidos crípticos o accesorios, contienen genes funcionalmente importantes que contribuyen al *fitness* competitivo de estas bacterias en la rizósfera, incluyendo la competitividad en la nodulación, la síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, la utilización de diferentes fuentes de carbono y la transferencia plasmídica, entre otras (Ding & Hynes, 2009).

La amplia distribución de elementos genéticos transmisibles en rizobios con amplia representatividad de plásmidos auto-transmisibles portadores de funciones simbióticas, hace del estudio funcional de la HGT uno de los focos de análisis más relevantes para la comprensión de los mecanismos de adaptación, especiación y plasticidad de los genomas de estos microorganismos en el suelo.

## I.4. Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes aumenta continuamente los nuevos genotipos bacterianos, por lo que los genomas están en flujo constante y cualquier segmento de ADN en una gran población bacteriana podría tener la oportunidad de ser transferido horizontalmente (Thomas and Nielsen, 2005). Por esto, la HGT se define como una de las principales responsables de la evolución y adaptación bacteriana (Soucy *et al*., 2015).

Existen principalmente tres mecanismos descriptos de transferencia horizontal de genes: transducción, transformación y conjugación. La transducción es la transferencia de material genético llevada a cabo por fagos. A través de la transformación, las bacterias adquieren material genético desnudo desde el medio extracelular. Para la conjugación se requiere un contacto físico entre células, lo que permite la transferencia de plásmidos y elementos conjugativos integrativos de una célula donadora a una célula receptora.

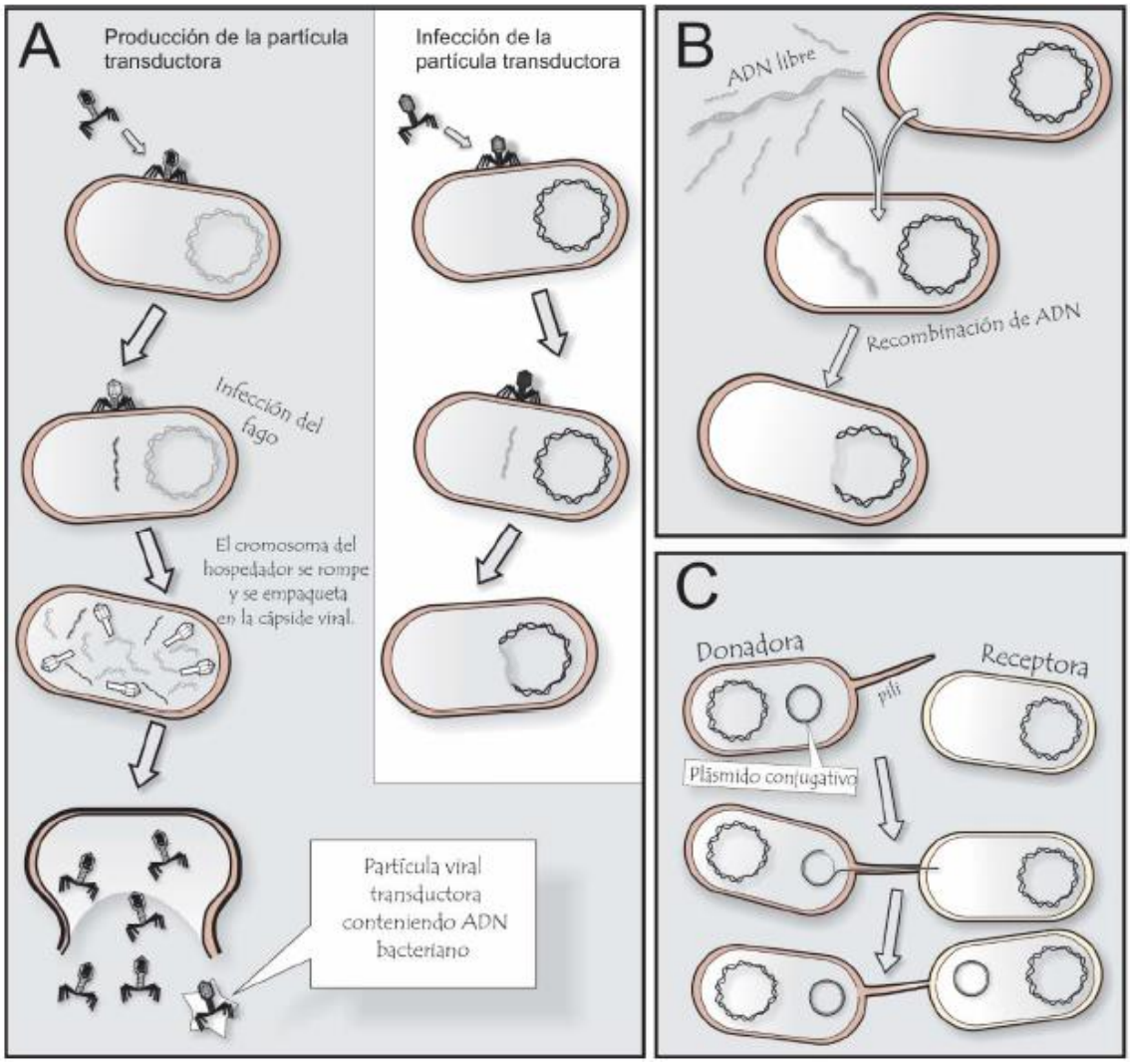


**Figura I.1. Mecanismos de HGT. A.** Transducción. **B.** Transformación. **C.** Conjugación. Adaptado de (Torres Tejerizo *et al*., 2010).

### I.4.a. Transducción

En este proceso, la transferencia de material genético es realizada mediante fagos, los cuales pueden empaquetar material genético de una bacteria de manera aleatoria, y transferirlo hacia otra al inyectar su propio material genético (Miller, 2004). Existen tres mecanismos a partir de los cuales se puede llevar a cabo la transducción: transducción generalizada, transducción especializada y transducción abortiva.

A través de la transducción generalizada, cualquier gen bacteriano puede transferirse de una bacteria a otra a través de un bacteriófago, y normalmente lleva solo ADN bacteriano y no ADN viral. El ADN inyectado puede ser incorporado al genoma mediante recombinación, o ser mantenido como elemento auto-replicativo en caso de llevar los genes necesarios. La transducción especializada es el mecanismo a través del cual un conjunto determinado de genes bacterianos se transfiere a otra bacteria a través de un bacteriófago. Cuando el profago escinde de manera imprecisa los genes del cromosoma, se incluyen los genes bacterianos adyacentes al profago. De esta manera, se empaqueta en la partícula viral el material genético del fago junto con genes bacterianos, y esto se inyecta en una nueva célula. Por último, en la transducción abortiva las secuencias bacterianas empaquetadas por el fago no son capaces de integrarse al genoma de la nueva célula. Al no ser replicadas por la maquinaria celular, las secuencias de ADN se pierden luego de algunos ciclos.

### I.4.b. Transformación

La transformación se da cuando una bacteria capta ADN del medio en el cual se encuentra y el mismo se integra en su genoma. Esto produce una incorporación estable de ADN, el cual se replica y expresa de la misma forma que el material genético propio de la célula. Para que esto ocurra, dichas bacterias deben encontrarse en estado de competencia (Thomas & Nielsen, 2005).

El ADN extracelular se une a sitios de la superficie celular de la célula competente y es convertido a simple cadena para su translocación. A medida que el ADN ingresa a la célula, una cadena es hidrolizada mientras que la otra ingresa y puede recombinarse en el genoma bacteriano. Una vez dentro de la célula, el ADN monocatenario es degradado por la acción de enzimas bacterianas. Por esto, la estabilidad del ADN introducido a la célula depende de la capacidad para recombinarse con el material genético propio de la bacteria transformada.

### I.4.c. Conjugación

La transferencia conjugativa (TC) es considerada uno de los medios más eficaces en el intercambio de ADN entre procariotas. Por ello, se ha prestado especial atención a la transferencia de material genético mediante la conjugación de plásmidos (Torres Tejerizo *et al*., 2014).

A través de la misma, material genético codificado en plásmidos (elementos extracromosomales autoreplicativos) o elementos integrativos conjugativos (elementos integrados en el cromosoma) es transferido desde una célula donadora a una célula receptora. Para esto, es necesario que las células se encuentren en contacto físico.

El proceso de conjugación se lleva a cabo en tres pasos: el reconocimiento y procesamiento del ADN, el reclutamiento del ADN y la traslocación hacia la célula receptora. Inicialmente, se unen las proteínas de reconocimiento y procesamiento del ADN (Dtr, ***D****NA* ***t****ransfer and* ***r****eplication*) al *oriT* (origen de transferencia), el cual es una secuencia de ADN codificada en el mismo plásmido. La relaxasa cliva la hebra de ADN a ser transferida (hebra T) en la región del *oriT*. Esta proteína pertenece al Dtr y tiene actividad fosfodiesterasa. Luego, continúa unida a la hebra T formando el relaxosoma, en el cual participan otras proteínas codificadas en la región Dtr (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Paralelamente, las proteínas involucradas en la síntesis del aparato conjugativo (Mpf, ***m****ating* ***p****air* ***f****ormation*) ensamblan una estructura denominada poro conjugativo. Mediante el mismo, se transfiere material genético a través de un sistema de secreción tipo 4 (T4SS, ***t****ype 4* ***s****ecretion* ***s****ystem*). En el Mpf también se encuentran los genes que forman el pili conjugativo (Aly & Baron, 2007), el cual actúa en la adhesión entre la célula donadora y la célula receptora (Clarke *et al*., 2008). Por otro lado, es la proteína acopladora (CP, ***c****oupling* ***p****rotein*) la encargada de reclutar el relaxosoma hacia el T4SS para formar el complejo de pre-iniciación. Este complejo se activa cuando el pili conecta con una célula receptora, iniciando la transferencia (Waksman, 2009). Cuando el ADN simple cadena se encuentra en la célula receptora, la relaxasa une los dos extremos del ADN. Luego, este ADN simple cadena es replicado para así obtener la segunda hebra. De esta manera, tanto la célula donadora como la célula receptora terminan por contener el plásmido en cuestión.

Según la presencia de Dtr y/o Mpf, los plásmidos se pueden clasificar de diferente manera (Ding & Hynes, 2009). Son plásmidos auto-transmisibles aquellos que poseen un *oriT* y que codifican tanto una relaxasa que puede reconocer el *oriT* junto con las proteínas del Dtr involucradas, como los elementos del Mpf que forman el poro conjugativo. Por otro lado, son plásmidos movilizables aquellos que carecen del Mpf pero cuentan con *oriT* y elementos del Dtr. Para que un plásmido movilizable sea transferido, es necesaria la presencia de un plásmido que aporte los elementos necesarios del Mpf. Dicho plásmido se denomina plásmido *helper* (de ayuda). Por último, son plásmidos no movilizables aquellos que ni en presencia de un plásmido *helper* pueden ser movilizados, ya que no cuentan con elementos para ello.

## I.5. Regulación de la transferencia plasmídica en rizobios

Aunque la transferencia conjugativa de plásmidos en rizobios ha sido constantemente observada y reportada, la mayoría de las veces ocurre a frecuencias bajas o, incluso, indetectables bajo condiciones de laboratorio. Esto implica que existen ajustados sistemas regulatorios que permiten la transferencia de los plásmidos sólo bajo ciertas condiciones (Ding & Hynes, 2009). El proceso conjugativo requiere una gran cantidad de

energía, ya que para este fenómeno se requiere la síntesis de una gran cantidad de proteínas. Por ende, las células deben poseer sistemas de regulación de la transferencia plasmídica. Hasta el momento, dos tipos de estos sistemas de regulación se han descrito en profundidad en rizobios: un sistema basado en *Quorum Sensing* (QS), y otro en el par de genes *rctA*/*rctB* (Ding y Hynes, 2009).

### I.5.a. *Quorum Sensing*

El *Quorum Sensing* es un proceso de comunicación química entre bacterias que se basa en la producción, detección y respuesta a moléculas de señalización intracelular denominadas inductores. Este sistema permite a grupos de bacterias alterar su comportamiento de manera sincronizada en respuesta a cambios en la densidad poblacional (Mukherjee & Bassler, 2019).

Uno de los sistemas más estudiados es el del plásmido pTi de *Agrobacterium tumefaciens* (Farrand, 1998). La transferencia del plásmido depende principalmente de la presencia de opinas, pequeñas moléculas señal secretadas por los tumores inducidos por *A. tumefaciens* en la planta. Estas regulan la producción de TraR, regulador directo de los operones involucrados en la transferencia conjugativa. Este regulador transcripcional es generalmente asociado a *Quorum Sensing*, ya que pertenece a la familia de los genes *luxR*, los cuales suelen responder a pequeñas moléculas difusibles llamadas acil-homoserin lactonas (AHLs). Estas últimas son producidas por TraI (AHLs sintasa) y son las inductoras de este sistema. Cuando se alcanza una alta densidad poblacional, la producción de AHLs aumenta, por lo que las mismas se acumulan en el medio extracelular e ingresan a la célula, uniéndose a TraR. De esta forma, TraR es capaz de dimerizar y unirse a secuencias promotoras específicas, activando la transcripción de los genes del Dtr y Mpf, induciendo así la conjugación. Por otro lado, la proteína TraM modula la actividad de TraR, actuando como represor al no permitir que se una a sus sitios blanco en el ADN (Luo *et al.*, 2000), contribuyendo a la regulación del proceso.

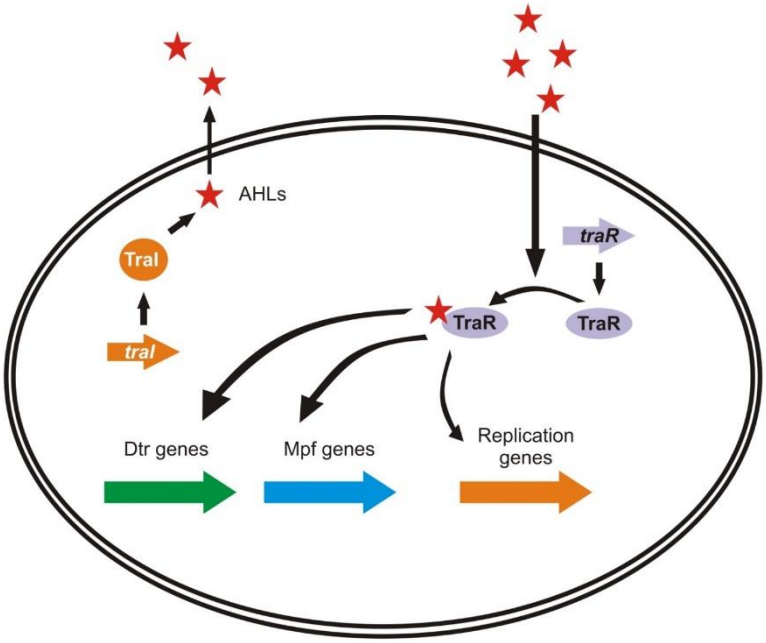


**Figura I.2. Esquema general del sistema de regulación por *Quorum Sensing.*** Al aumentar la población bacteriana, se acumulan AHLs que se unen al regulador TraR, permitiendo que este último aumente la expresión de los genes del Dtr, Mpf y de la replicación. Tomada del trabajo final de Abril Luchetti.

### I.5.b. Sistema *rctA/rctB*

Este sistema fue inicialmente descripto en los plásmidos simbióticos pRetCFN42d de *Rhizobium etli* CFN42 y pSymA de *Sinorhizobium meliloti* 1021. La regulación está dada por el par de genes *rctA*/*rctB*. En este sistema, el producto del gen *rctA* reprime la expresión de los genes involucrados en la transferencia conjugativa (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005, Sepúlveda *et al.*, 2008). La transcripción de *rctA* parece ser autorregulada. RctA presenta dominios de unión al ADN similares a los presentes en otros represores transcripcionales (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Por otro lado, la proteína RctB actúa como activador de la transferencia conjugativa, ya que actúa como una proteína represora de *rctA*.

En el caso del plásmido simbiótico *de S. meliloti* existen dos genes que controlan la expresión de *rctB*. El gen *rctR* codifica para un represor de *rctB*. Por otro lado, *rctC* lo hace para un regulador de respuesta necesario para activar la transcripción de *rctB* y, por lo tanto, también para el proceso conjugativo (Nogales *et al.*, 2013). Dichos genes están ausentes en *R. etli*, sugiriendo que este sistema tiene su expresión modulada por distintas cascadas regulatorias.

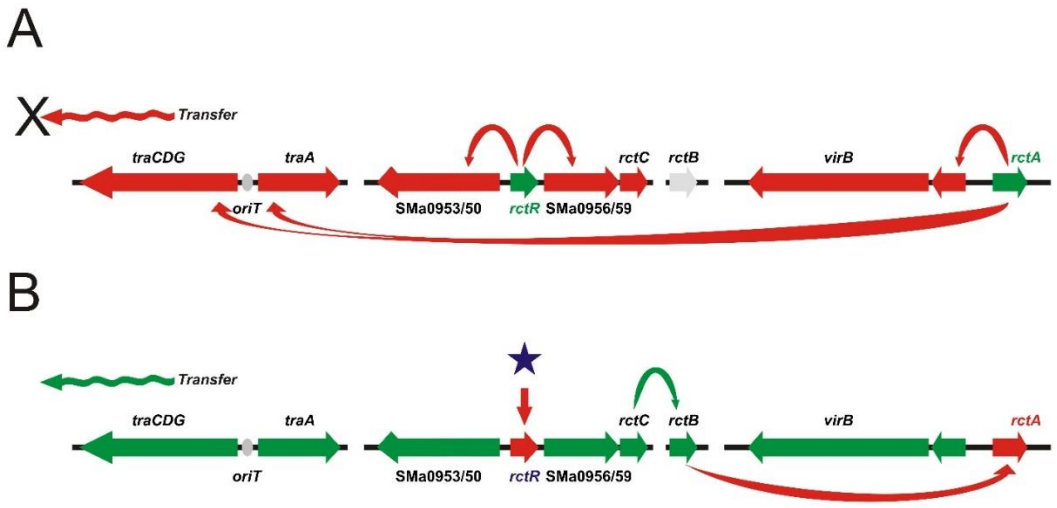


**Figura I.3. Regulación de la transferencia del plásmido pSymA de *E. meliloti* por la represión mediada por RctA.** Los genes cuya expresión se encuentra reprimida se encuentran en color rojo, y los genes que se transcriben, en verde. **A.** En condiciones normales, RctA se expresa constitutivamente y reprime la transcripción de *traA* y los operones *traCDG* y *virB*. RctR reprime los operones *Sma0953/50* y *Sma956/59/rctC.* **B.** Una señal no conocida (estrella azul) causa la represión de *rctR*, que permite la expresión de *rctC*, que induce *rctB*. RctB antagoniza RctA, permitiendo la expresión de los genes Dtr y Mpf, conduciendo a la transferencia conjugativa (Tomado de (Brom *et al.*, 2014)).

## I.6. Clasificación de los plásmidos de rizobios en base a sus sistemas conjugativos.

A través del análisis filogenético basado en las proteínas TraA (relaxasa) de rizobios, se determinaron cuatro grupos de plásmidos: tipo I, II, III y IV (Ding & Hynes, 2009).

Se ha observado que los plásmidos pertenecientes al grupo I son, principalmente, regulados por *Quorum Sensing*. Los pertenecientes al grupo II, presentan sistemas del tipo *rctA/rctB*. Los plásmidos tipo III y IV no poseen sistemas caracterizados en profundidad (Ding & Hynes, 2009).

Posteriormente, se evaluó en profundidad la diversidad del grupo I de plásmidos. Se definieron cuatro subgrupos a partir de análisis filogenéticos utilizando, por un lado, las relaxasas, y por el otro, las secuencias de TraR, únicamente de plásmidos pertenecientes al grupo I. Estos subgrupos se denominaron I-A, I-B, I-C y I-D (Torres Tejerizo *et al.*, 2014, Castellani *et al.,* 2019).

En el grupo I-A se incluyen los plásmidos de *Agrobacterium*, donde la regulación de la transferencia conjugativa opera a dos niveles jerárquicos. Por otro lado, en los plásmidos del grupo I-B, la transferencia conjugativa depende de las AHLs sintetizadas por el producto del gen *traI*, el cual está ubicado al lado de los genes *trb* pertenecientes al Mpf. Los plásmidos del grupo I-C se caracterizan por carecer del gen *traI* y poseer una inversión de los genes *traR* y *traM* con respecto a los plásmidos de otros grupos (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). En este último grupo se encuentran los plásmidos pLPU83a, pRL8 y pSmeSM11b pertenecientes a *Rhizobium favelukesii* LPU83, *Rhizobium*

*leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y *Sinorhizobium meliloti* SM11, respectivamente. Recientemente, se ha profundizado el estudio de la red regulatoria involucrada en la transferencia de pLPU83a (Castellani *et al.*, 2022), pero se desconocen las propiedades conjugativas de otros plásmidos de este grupo. En relación a los plásmidos del grupo I-D, hasta el momento no hay información sobre cómo es controlada la transferencia conjugativa.

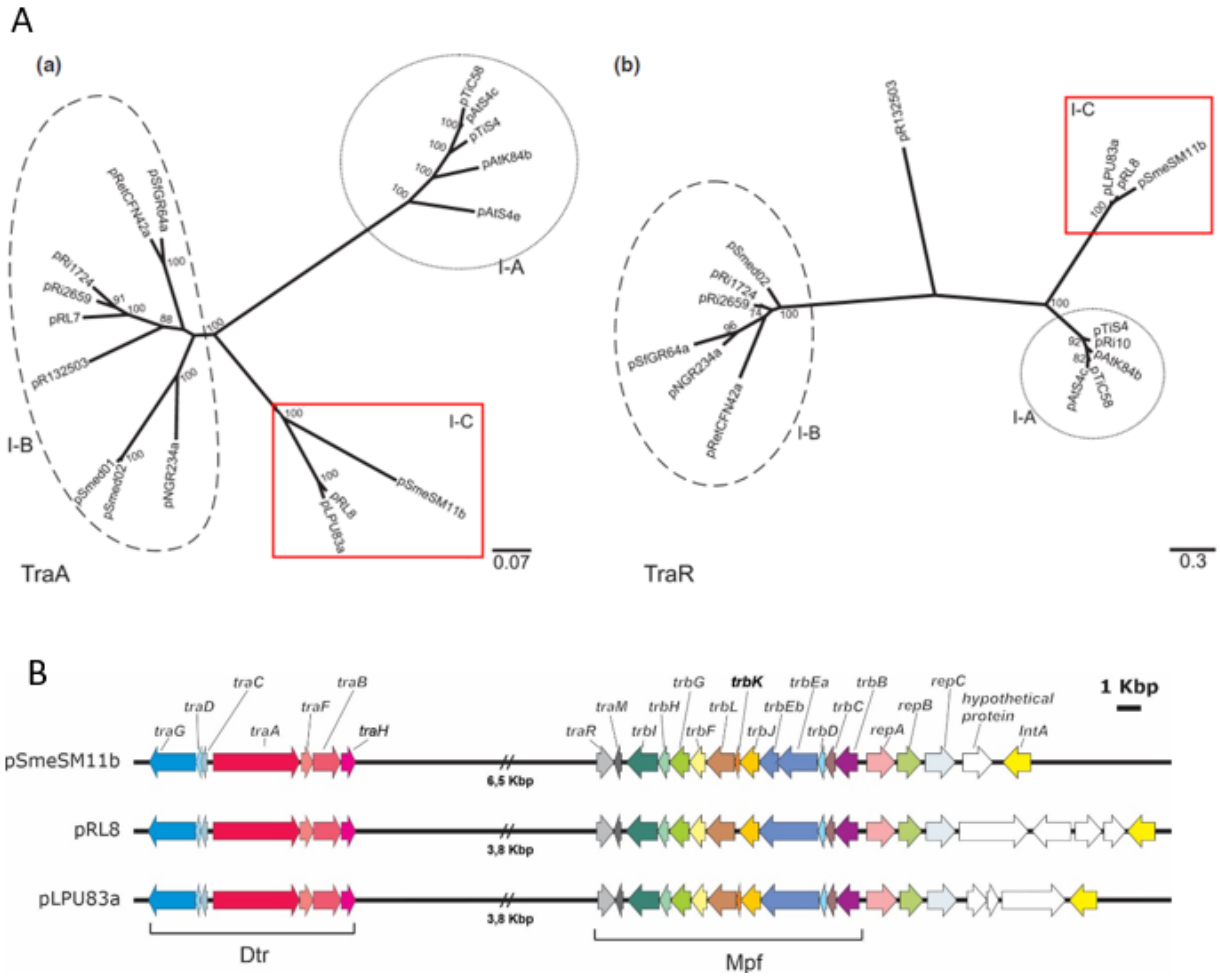


**Figura I.4. Plásmidos de rizobios del grupo I. A.** Caracterización filogenéticas de plásmidos de rizobios pertenecientes al grupo I basados en (a) TraA, relaxasa, y (b) TraR, regulador maestro de la conjugacion (Adaptado de Torres Tejerizo *et al.*, 2014). **B.** Organización de los genes del Dtr y del Mpf de los plásmidos del grupo I-C (Adaptado de Torres Tejerizo *et al.,* 2014).

## I.8. Objetivos

### I.8.a. Objetivo general

Profundizar el estudio de las propiedades conjugativas de plásmidos pertenecientes al grupo I-C de rizobios.

### I.8.b. Objetivos específicos

**a)** Marcación de los plásmidos pSmeSM11b y pRL8 mediante la integración de vectores suicidas.

**b)** Evaluación del fenotipo conjugativo de los plásmidos marcados desde el entorno parental y desde otros entornos.

# *Capítulo II. Materiales y métodos*

## II.1. Técnicas microbiológicas

### II.1.a. Cepas bacterianas y plásmidos

**Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo**

| Cepas | Propiedades | Referencia |
|---|---|---|
| ***Escherichia coli*** | | |
| DH5α | *recA*, *ΔlacU*169, ϕ80*dlac*ZΔM15 | Bathesda Res. Lab. |
| RK600 | $Cm^r$, ColE1 replicón, $tra^+$ de RK2 | (Kessler *et al.*, 1992) |
| ***Sinorhizobium meliloti*** | | |
| SM11 | Cepa aislada de suelos alemanes | (Stiens *et al.*, 2006) |
| SM11 pSmeSM11b-Nm | SM11 marcada en el plásmido pSmeSM11b con $Nm^r$. | Este trabajo |
| SM11 pSmeSM11b-Nm (pBBR1MCS5) | SM11 pSmeSM11b-Nm con el plásmido pBBR1MCS5. | Este trabajo |
| SM11 pSmeSM11b-Nm (pBBR1MCS5-TrbE) | SM11 pSmeSM11b-Nm con el plásmido pBBR1MCS5::*trbE*. | Este trabajo |
| ***Rhizobium leguminosarum bv. viciae*** | | |
| 3841 | Cepa salvaje | (Johnston & Beringer 1975) |
| 3841 pRL8-Nm | 3841 marcada en el plásmido pRL8 con $Nm^r$. | Este trabajo |
| ***Agrobacterium tumefaciens*** | | |
| UBAPF2 | $Rifa^r$. Cepa libre de plásmidos. | Hynes *et al.* (1985) |
| UBAPF2 (pRL8-Nm) | UBAPF2 con el plásmido pRL8-Nm. | Este trabajo |
| UBAPF2 (pSmeSM11b) | UBAPF2 con el plásmido pSmeSM11b. | Este trabajo |
| ***Rhizobium favelukesii*** | | |
| LPU83-13 | Derivada de *R. favelukesii* LPU83 marcada en el pLPU83a con un transposón Tn*5*-B10. $Nm^r$ | (Torres Tejerizo *et. al.*, 2010) |

**Tabla II.2. Plásmidos utilizados en este trabajo**

| Plásmidos | Propiedades | Referencias |
|---|---|---|
| pK18mob | $Km^r$. Vector de clonado de alto número de copias. | Schäfer *et al.* (1994) |
| pK18mob::pRL8 | Derivado del pK18mob conteniendo la región intergénica del pRL8 | Este trabajo |

| | | |
|---|---|---|
| | amplificada con los *primers* pRL8 right y pRL8 left. | |
| pK18mob::pSmeSM11b | Derivado del pK18mob conteniendo la región intergénica del pSmeSM11b amplificada con los *primers* pSM11 right y pSM11 left | Este trabajo |
| pBBR1MCS5 | $Gm^r$. Vector de clonado de bajo número de copias, con promotor *lac*, replicativo en rizobios. | Kovach *et al.* (1995) |
| pBBR1MCS5::*trbE* | Derivado del pBBR1MC5S. Contiene el gen de la TrbE en el sitio *SmaI*. $Gm^r$. | Este trabajo |

### II.1.b. Medios de cultivo y de conservación

Los cultivos de las cepas de rizobios se llevaron a cabo en medio completo TY (Beringer, 1974).

**Tabla II.3. Composición del medio completo TY**

| | |
|---|---|
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0,7 g |
| Triptona | 5 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| Agua (desionizada) | 1000 ml |

La temperatura de incubación para el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* fue 28°C.

Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó el medio LB (Sambrook *et al.*, 1989).

**Tabla II.4. Composición del medio LB**

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

La temperatura de incubación para el crecimiento de las cepas de *E. coli* fue 37ºC.

En ambos medios, para preparar medio sólido se utilizaron 15 g/l de agar y la esterilización se realizó durante 20 minutos a 120°C en autoclave.

## II.2. Antibióticos

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada salvo en el caso de rifampicina, en el que se utilizó metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración empleando membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro.

**Tabla II.5. Concentración final de antibióticos en el medio de cultivo según la especie bacteriana.**

| Antibiótico | *E. coli* (µg/ml) | *S. meliloti* / *R. leguminosarum* / *Agrobacterium* (µg/ml) |
|---|---|---|
| Kanamicina (Km) | 50 | - |
| Gentamicina (Gm) | 10 | 30 |
| Estreptomicina (Sm) | - | 400 |
| Neomicina (Nm) | - | 120 |
| Rifampicina (Rf) | - | 200 |
| Cloranfenicol | 20 | - |

## II.3. Procedimientos microbiológicos

### II.3.a. 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 0,75 ml de un cultivo de la cepa donadora ($DO_{600nm}$ = 0,8 -1.0 o según se indique) con 0,75 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora. La mezcla fue luego centrifugada a 0,6 g durante 10 minutos y el sedimento fue resuspendido suavemente en aproximadamente 50 µl de medio líquido TY. La suspensión entonces fue colocada en una caja de Petri con medio TY sólido sin antibióticos e incubada a 28ºC durante 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue finalmente resuspendida en solución $MgSO_4$ (10 mM) y Tween 40 (0,01 % V/V) y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s) para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregaron la bacteria donadora o la receptora.

Para los recuentos de las bacterias donadoras y receptoras se realizaron las diluciones seriadas correspondientes en solución $MgSO_4$ (10 mM) y Tween 40 (0.01 % V/V) como se detalló previamente.

### II.3.b. Conjugaciones triparentales

Mediante esta metodología se realizó la transferencia de plásmidos no

autotransmisibles (conteniendo el *oriT* del plásmido RK2) desde cepas no movilizables a las cepas receptoras. Esto se realizó utilizando el plásmido *helper* (de ayuda) RK600 desde una tercera cepa de *E. coli*. 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 c/u). Esta mezcla fue centrifugada a 0,6 g, 10 minutos, y el sedimento bacteriano fue resuspendido en 100 µl de medio líquido TY. La mezcla fue colocada sobre una placa conteniendo medio sólido TY. Las cajas fueron incubadas a 28ºC por 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue resuspendida en solución $MgSO_4$ (10 mM) y Tween 40 (0,01 % V/V) y plaqueada en medio sólido TY suplementado con los antibióticos adecuados. Se realizaron controles en los que la cepa donadora, receptora y la portadora del plásmido de ayuda se procesaron en forma independiente.

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

Se siguió la técnica de Tung – Chow (1995). Se inocularon 500 ml de medio LB sin cloruro de sodio con 1 ml de cultivo de la cepa *E. coli* de interés que había sido crecida desde el día anterior, también en medio LB sin cloruro de sodio. El cultivo fue incubado a 37ºC y agitado vigorosamente hasta que la DO a 600nm llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4000 g por 15 min a 4ºC y se lavaron 2 veces con 200 ml de glicerol 10% a 4ºC. Luego, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de GYT helado (10% glicerol, 0,125% extracto de levadura y 0,25% triptona) y se fraccionaron en alícuotas de 50 µl.

Las electrotransformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 mF, 200 W, 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio LB y la mezcla se incubó 1 hora a 37ºC para permitir que la información contenida en el ADN introducido se expresara. Luego de la incubación las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s) para la selección bacteriana e incubadas una noche a 37ºC.

### II.3.d. Recuento de bacterias

El recuento del número de unidades formadoras de colonias (ufc) se determinó por el método de recuento de gotas en placa (Herigstad *et al.*, 2001). Esto se realizó sobre la resuspensión en $MgSO_4$ de la mezcla de bacterias en las conjugaciones. Para ello, se realizaron sucesivas diluciones de la conjugación cuyo número de ufc se quiso determinar, en solución fisiológica estéril. Para cada dilución, se sembraron 10 gotas de 10 µl cada una en medio TY sólido con el antibiótico correspondiente. Luego se incubó durante 48 o 72 hs a 28 °C (dependiendo del microorganismo), pasado este tiempo se contaron las colonias en cada gota. En aquellas diluciones en las que se visualizaron

entre 1 y 20 colonias, se realizó un promedio de las 10 gotas y se refirió al número de ufc/ml del cultivo original.

## II.4. Técnicas de Biología Molecular

### II.4.a. Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep)

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina (miniprep) descripta por Sambrook *et al.* (1989). Para ello, se usó un protocolo de purificación de plásmidos basado en la unión a sílica (Sigma). Luego de realizar la lisis alcalina y de la precipitación con acetato de potasio, se recoge el sobrenadante y se le agregan 10 µl de suspensión de sílica. Se centrifuga 10 minutos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500 µl de solución de lavado. Luego, se centrifuga a máxima velocidad y se deja secar a 37°C. La elución se realiza agregando 25 µl de agua e incubando 5 min a 60°C, para luego centrifugar 3 minutos a máxima velocidad y recuperar el sobrenadante, el cual contiene 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 milliQ.
- Solución de Lavado: 50 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 2.5 mM EDTA; 50 % etanol.

### II.4.b. Extracción de ADN total

Se utilizó el Kit comercial "Wizard Genomic ADN Purification Kit" de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del producto.

### II.4.c. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico BIOER. La composición de las mezclas de reacción utilizadas según la ADN polimerasa utilizada se encuentra detallada en la tabla II.6. y los *primers* utilizados en la tabla II.7.

**Tabla II.6. Composición de las mezclas de reacción utilizadas en los ensayos de PCR**

| | Taq polimerasa | PFU polimerasa | Phusion polimerasa |
|---|---|---|---|
| **Buffer** | 2,5 µl | 2,5 µl | 10 µl |
| **dNTPs** | 2,5 µl | 2,5 µl | 1 µl |
| **Cebador Fw** | 2,5 µl | 2,5 µl | 5 µl |
| **Cebador Rv** | 2,5 µl | 2,5 µl | 5 µl |
| **$Mg^{+2}$ (25mM)** | 3 µl | - | - |

| **Enzima** | 0,25 µl | 0,5 µl | 0,5 µl |
|---|---|---|---|
| **Molde** | 1 pg – 1 µg | 5 – 100 ng | 5 – 100 ng |
| **$H_2O$** | Hasta completar | Hasta completar | Hasta completar |
| **Volumen final** | 25 µl | 25 µl | 50 µl |

**Tabla II.7. *Primers* utilizados en este trabajo**

| **Nombre** | **Secuencia** | **Referencia** |
|---|---|---|
| M13 Fw-40 | 5'- GTTTTCCCAGTCACGAC-3' | *Primer* universal |
| M13 Rv-40 | 5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3' | *Primer* universal |
| pRL8 left | 5'-CGTCGTACCTTCAGTC-3' | Este trabajo |
| pRL8 right | 5'-GACTTGAGCACTACGG-3' | Este trabajo |
| pRL8 chequeo | 5'-GAGACCTGTCACGTTATG-3' | Este trabajo |
| pSM11 left | 5'-TTATGTGGTGGTCGAG-3' | Este trabajo |
| pSM11 right | 5'-AAGGACACGACACTCAC-3' | Este trabajo |
| pSM11 chequeo | 5'-GTCTCTAGAAAGCTGGTC-3' | Este trabajo |
| trbE left | 5'-GCATAGGAAACAGTGG-3' | Este trabajo |
| trbE right | 5'-TGAGGAGGCTACAATG-3' | Este trabajo |

### II.4.d. Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple

Se amplificó una región interna del gen a mutar con la polimerasa PFU, la cual deja extremos romos, y se clonó en el plásmido pK18mob, previamente digerido con *SmaI* (extremos romos). La selección se realizó en placas conteniendo Km y X-gal, permitiendo la selección blanco/azul. Para corroborar el clonado, se amplificó el fragmento correspondiente mediante PCR utilizando los *primers* universales M13Fw-40 y M13Rv-40, y el producto fue sembrado en un gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio (0,5-1,0 µg/ml) para la visualización del ADN. Cada plásmido fue transferido desde *E. coli* DH5-α a la cepa a mutar por conjugación y los transconjugantes fueron seleccionados con los antibióticos correspondientes. La correcta integración de los plásmidos fue confirmada por PCR utilizando los *primers* correspondientes.

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

Las digestiones con enzimas de restricción y las ligaciones de ADN (T4 ADN ligasa) se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y *buffer* propuestas por las casas comerciales (Fermentas y Promega), y las recomendaciones descritas en Sambrook *et al*. (1989). Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas por un período de tiempo mayor a 2 horas y, cuando fue necesario, luego de los tratamientos enzimáticos se procedió a la inactivación de las enzimas por desnaturalización térmica.

## II.4.f. Electroforesis de ADN

### II.4.f.1. 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 como buffer de corrida TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0). 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 µl solución de ADN en agua o TE/µl solución de carga.

### II.4.f.2. 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 Kodak modelo DC 120 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

### II.4.f.3. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción y productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa.

El tamaño de los fragmentos de restricción y de los productos de PCR fue determinado por interpolación gráfica en curvas en las que fue representado el logaritmo del peso molecular de fragmentos de ADN de tamaño conocido frente a la movilidad de cada uno de esos fragmentos. Como patrones de peso molecular fueron utilizados ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII*, el marcador PBL *ladder* 100 bp o el marcador GeneRuler 1kb *DNA ladder* (figura II.1.)

### II.4.f.4. 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 10 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.f.5. Geles de lisis in situ

Los perfiles de plásmidos fueron obtenidos por el método de lisis *in situ* de Eckhardt (1978) con las modificaciones de (Hynes & McGregor, 1990). Las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido. A alícuotas de cultivos crecidos hasta una DO600nm de 0,2 unidades se les agregó 1 ml de agua destilada fría y se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de agua destilada fría y se resuspendió totalmente. Se prepararon tubos con 500 ul de sarcosyl 0,3% frío, a los

cuales se les agregaron 120 ul del cultivo resuspendido. Se centrifugó 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se mantuvieron en hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis (0,75% de agarosa en TBE con 1% SDS). Previo a la siembra de las muestras en cada fosa del gel, se le agregaron 30 µl de solución de lisis (960 µl de sacarosa al 10% en TBE, 40 µl de RNAsa y 10 mg de lisozima). La corrida se hizo a 5V por una hora y luego a 80V por 5 horas. Luego se lavó con agua 30 minutos y se tiño con bromuro de etidio (0,5 µg /ml).

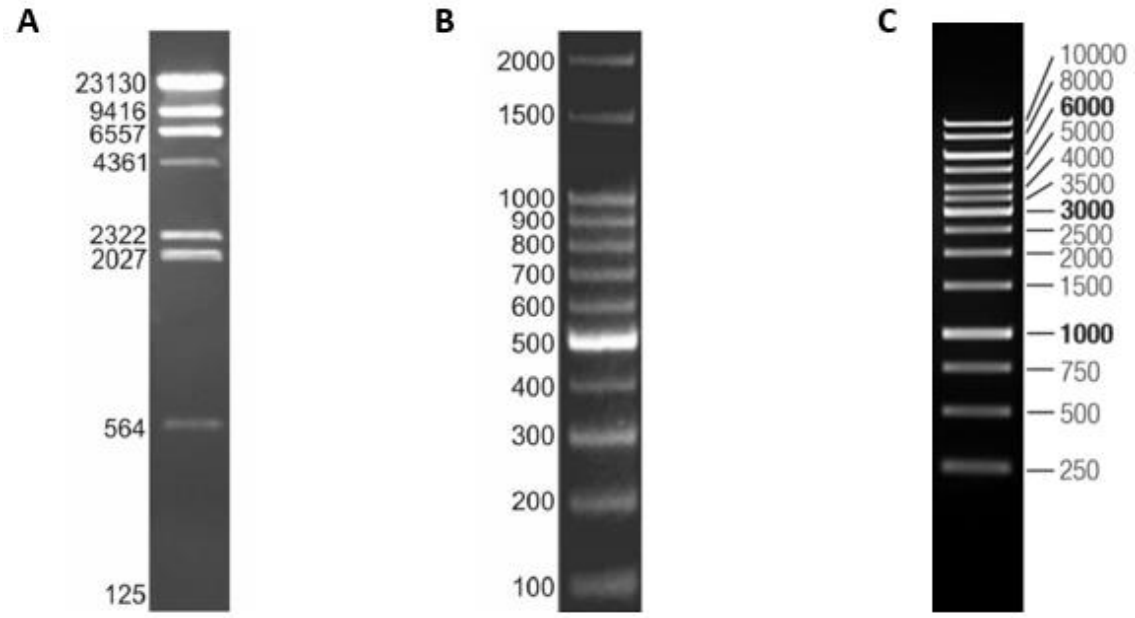


**Figura II.1. Marcadores de peso molecular utilizados en este trabajo. A.** Lambda *HindIII*. **B.** Ladder 100 pb. **C.** Ladder 1kb.

# *Capítulo III. Resultados*

## Estrategia general

Con el objetivo de obtener los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b marcados con antibiótico, se planeó clonar fragmentos de dichos plásmidos en vectores suicidas en rizobios. Para ello, inicialmente, se amplificaron por PCR regiones intergénicas seleccionadas de ambos plásmidos. Posteriormente, se clonó cada una de estas regiones en un vector no replicativo en rizobios resistente a kanamicina (pK18mob), previamente digerido, pudiendo seleccionar los clones conteniendo la región correspondiente por ausencia de la coloración azul en presencia de X-gal (5-bromo-4cloro-3indolil-β-galactopiranósido) y kanamicina (Figura III.1). Luego, por recombinación homóloga, estas construcciones se integraron en las cepas salvajes de *Sinorhizobium meliloti* SM11 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, según corresponda, obteniéndose los plásmidos pSmeSM11b y pRL8 marcados con el antibiótico kanamicina (neomicina en rizobios). En la figura III.1 se muestra un esquema de este proceso. Las cepas conteniendo los plásmidos pSmeSM11b y pRL8 marcados fueron evaluadas en su capacidad conjugativa utilizando una cepa receptora libre de plásmidos, *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2.

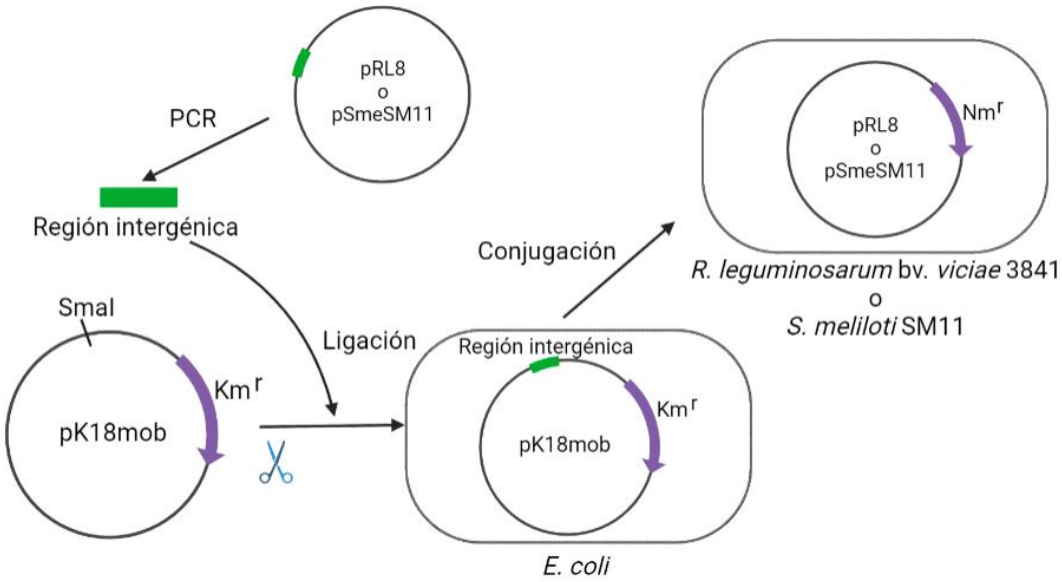


**Figura III.1. Estrategia general para el marcado de los plásmidos pRL8 o pSmeSM11b.** En primer lugar, se amplifica una región intergénica y se clona la misma en el vector suicida pK18mob. Posteriormente, cada construcción se conjuga a las cepas salvajes *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841 o *S. meliloti* SM11, marcando así los plásmidos deseados.

## III.1. Selección de las regiones intergénicas

Como primer paso para obtener los plásmidos pSmeSM11b y pRL8 marcados, se seleccionaron dos regiones intergénicas (una de cada plásmido) para su posterior clonado en el vector pK18mob.

Ambas regiones se encuentran entre los extremos 3' de dos genes con orientación opuesta en el plásmido correspondiente. Esta disposición es importante ya que, de esta

manera, cuando ocurra la recombinación homóloga que nos permite marcar el plásmido no interrumpimos ningún elemento regulatorio (Figura III.2).

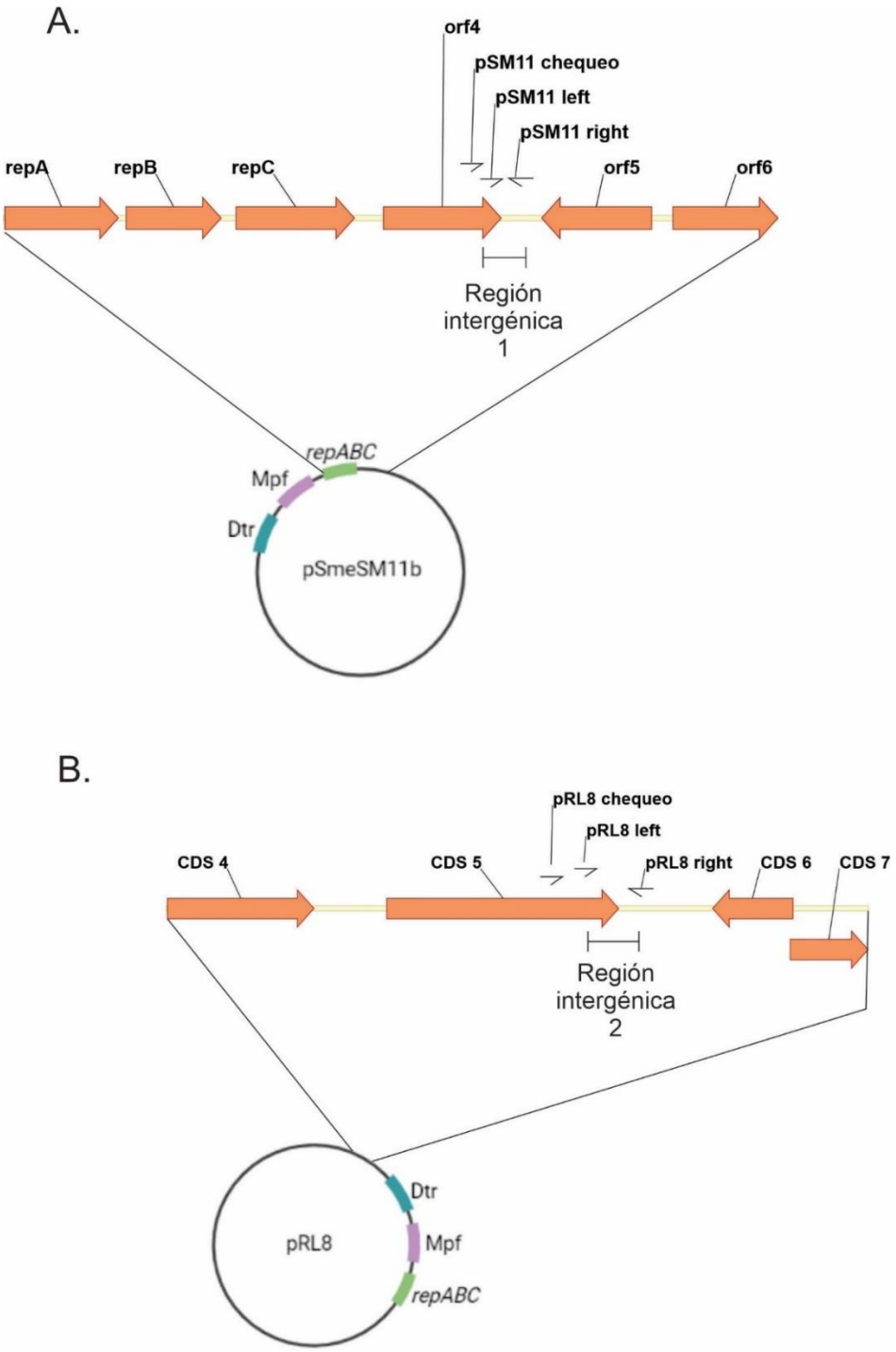


**Figura III.2. Regiones intergénicas seleccionadas. A.** Región intergénica seleccionada correspondiente al plásmido pSmeSM11b (267 pb). **B**. Región intergénica seleccionada correspondiente al plásmido pRL8 (244 pb).

## III.2. Amplificación de las regiones intergénicas

Para obtener los fragmentos correspondientes, se realizó una PCR a distintas temperaturas de annealing (56 y 60°C) utilizando como molde ADN de las cepas *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y *S. meliloti* SM11, los pares de *primers* pRL8 left-pRL8

right y pSM11 left-pSM11 right, respectivamente, y la enzima PFU polimerasa con el fin de dejar extremos romos en ambos fragmentos.

En la figura III.3. se observan productos de PCR del tamaño deseado a ambas temperaturas de la región intergénica 1, proveniente del pSmeSM11b (267 pb), pero no se observa la banda deseada de la región intergénica 2, proveniente del pRL8 (244 pb).

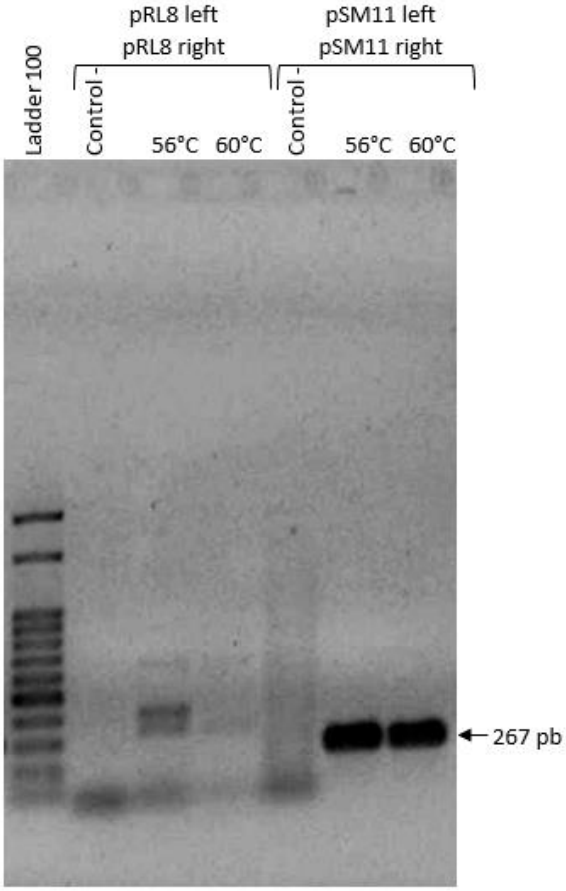


**Figura III.3. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* pRL8 left-pRL8 right y pSM11 left-pSM11 right a 56 y 60°C.**

Debido a la ausencia de producto correspondiente a la región intergénica 2, se realizó una purificación de ADN total de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 como se indica en la sección II.4.b. y se utilizó como molde. La PCR se realizó con gradiente de temperatura de annealing (50, 55.7 y 58.3°C), Phusion polimerasa y el mismo par de *primers* que la PCR inicial: pRL8 left y pRL8 right.

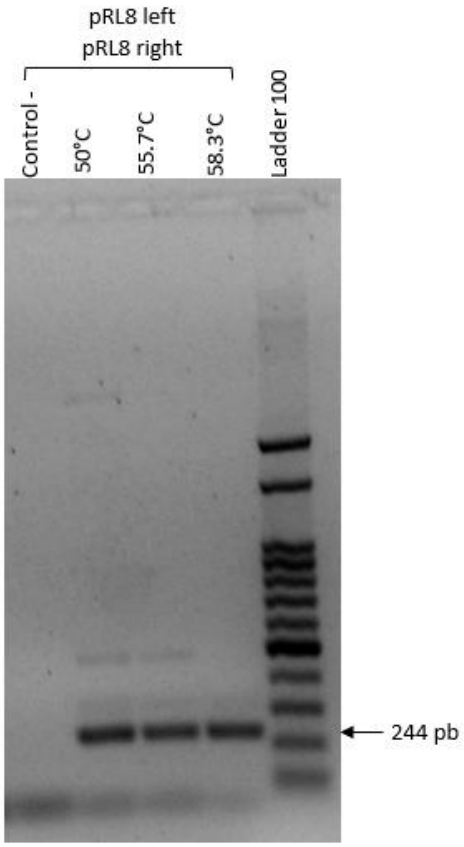


**Figura III.4. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* pRL8 left-pRL8 right a 50, 55.7 y 58.3°C.**

En esta última PCR podemos observar fragmentos del tamaño deseado (244 pb) a las tres temperaturas de trabajo (figura III.4). De esta manera, fueron amplificadas las dos regiones intergénicas necesarias para continuar trabajando.

## III.3. Clonado de las regiones intergénicas

Para clonar las regiones intergénicas obtenidas, se utilizó como vector de clonado el plásmido pK18mob, el cual es de alto número de copias en *E. coli* y no replicativo en rizobios. Dado que el objetivo es que el vector se integre al plásmido del cual obtuvimos la región intergénica, es de gran importancia que no sea replicativo en rizobios. De esa forma, el vector no podrá mantenerse como ADN extracromosómico, y la única manera de mantenerse en la bacteria es que se integre en el plásmido por recombinación homóloga, generando así la marca deseada.

Para realizar los clonados, se ligaron las regiones intergénicas en el vector pK18mob obtenido mediante miniprep y previamente digerido con *SmaI* (deja extremos romos). El producto de esta ligación, en ambos casos, se electroporó en células competentes de *E. coli* DH5-α y se plaqueó en medio LB sólido suplementado con X-gal y kanamicina para la selección bacteriana.

Para realizar la selección se procede de esta manera debido a que el vector pK18mob posee el gen de resistencia a kanamicina, y los fragmentos se insertan en el sitio de

clonado múltiple, interrumpiendo el gen *lacZ* (que codifica la enzima β-galactosidasa). Aquellas bacterias que tienen el gen *lacZ* funcional son de coloración azul en presencia de X-gal, mientras que aquellas que tienen dicho gen interrumpido, no presentan esta coloración, resultando blancas. De este modo, los clones blancos fueron seleccionados como candidatos para analizar por PCR.

Las colonias candidatas se analizaron, en ambos clonados, mediante *colony* PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 y la enzima Taq polimerasa. Como control negativo se utilizó como molde agua y como control positivo, una colonia de coloración azul.

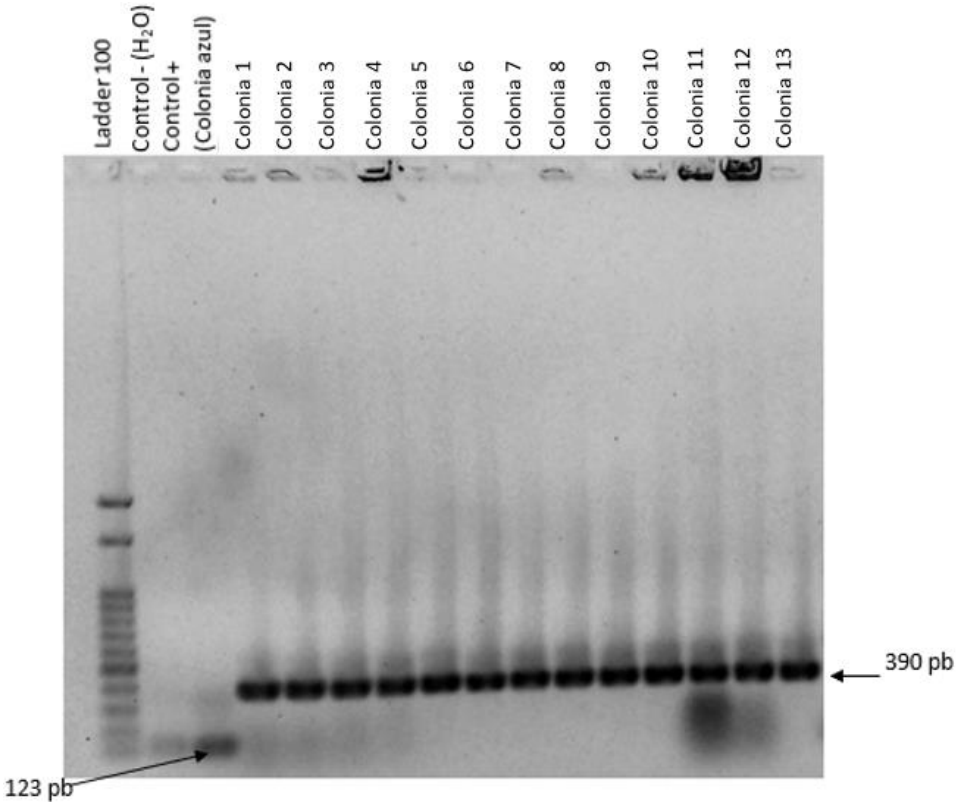


**Figura III.5. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 sobre colonias candidatas al clonado de la región intergénica 1 en el vector pK18mob.**

Para el clonado de la zona intergénica 1, como se muestra en la figura III.5, no se observa banda en el control negativo, mientras que en el control positivo se observa una banda de 123 pb, correspondiente a la colonia azul. Se utilizó dicha colonia ya que sobre ella se puede observar una banda correspondiente a la distancia entre los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40, sin el inserto. En todas las colonias analizadas se observa una banda intensa de 390 pb, correspondiente a las 123 pb del plásmido pK18mob sumadas a las 267 pb del fragmento de la región intergénica. Por lo tanto, todas las colonias seleccionadas son positivas.

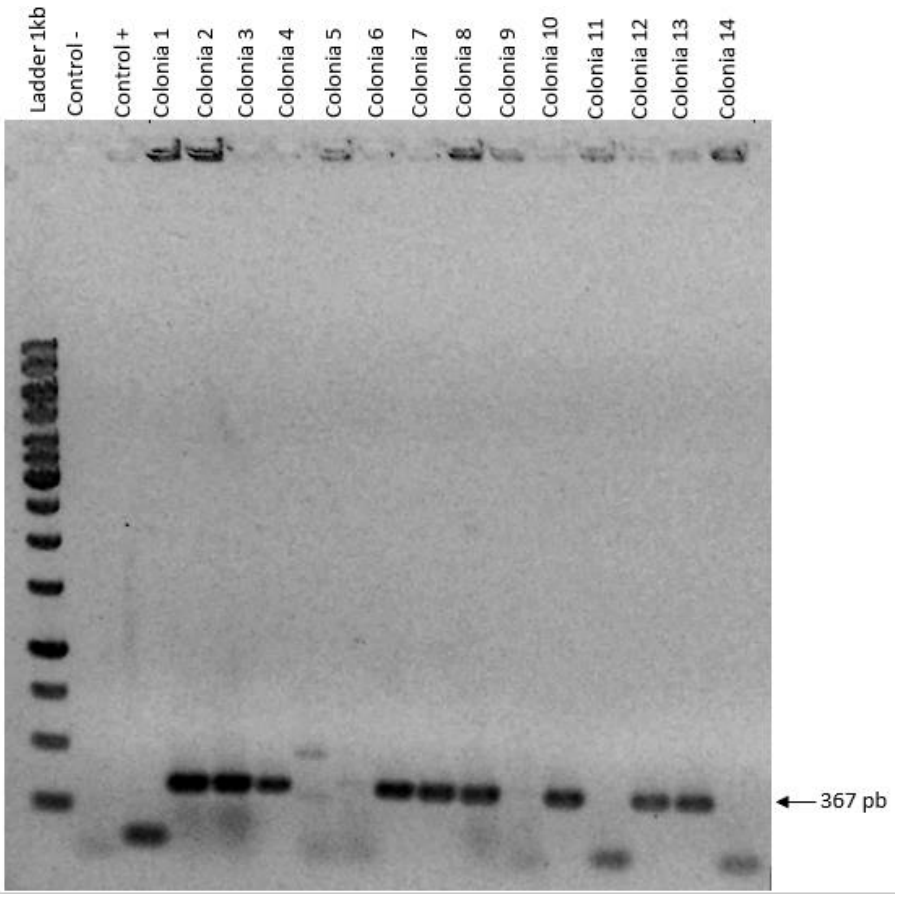


**Figura III.6. Electroforesis del producto de PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 sobre colonias candidatas al clonado de la región intergénica 2 en el vector pK18mob.**

Para el clonado de la zona intergénica 2, nuevamente no se observa banda en el control negativo (figura III.6), en el que se utilizó agua como molde, y se observa una banda de 123 pb aproximadamente en el control positivo, que corresponde a la distancia entre los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 en una colonia azul (sin el fragmento de la región intergénica). Para aquellas colonias que contienen el vector pK18mob con la región intergénica clonada, el fragmento esperado es de 367 pb, por lo que son clones positivos las colonias 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12 y 13.

Posteriormente, a los clones positivos, se le determinó la orientación de los fragmentos clonados por PCR utilizando distintos pares de *primers*. En la figura III.7A se muestra un esquema de las combinaciones de *primers* utilizadas. A su vez, también se corroboró la presencia del fragmento deseado por digestión con la enzima de restricción *HaeIII* del producto de PCR amplificado con los *primers* M13 Fw-40/M13 Rv-40. Los tamaños esperados de los fragmentos de la región intergénica 1 luego de la digestión con *HaeIII* son los siguientes:

- Orientación A: 62 pb – 296 pb – 32 pb
- Orientación B: 63 pb – 295 pb – 32 pb

Los clones candidatos seleccionados para analizar la orientación de la región intergénica 1 fueron la colonia 3 y colonia 9.

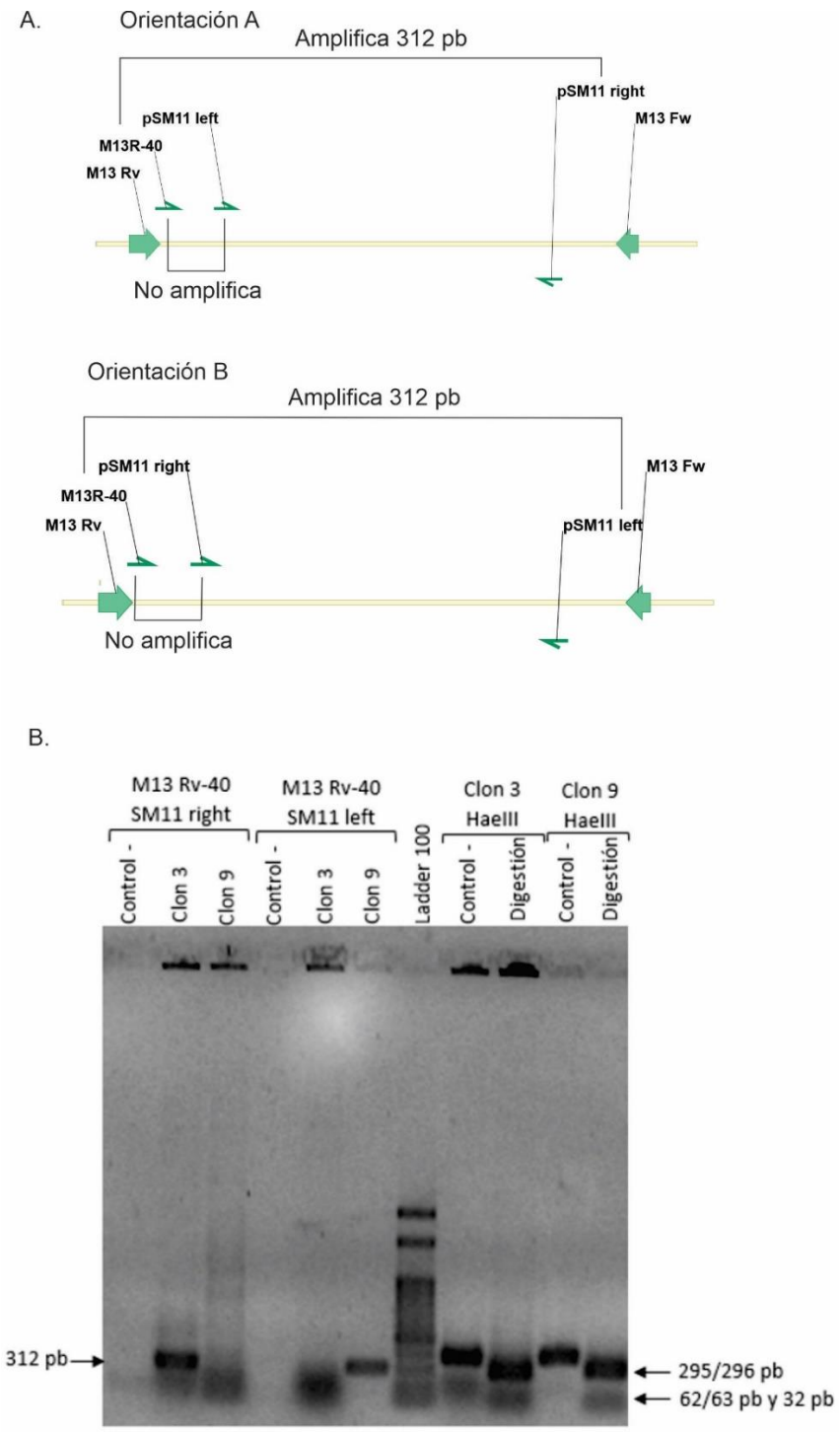


**Figura III.7. Evaluación del fragmento obtenido de pSmeSM11b clonado en el vector pK18mob. A.** Esquema de las dos posibles orientaciones del fragmento amplificado. **B.** Electroforesis de los productos de amplificación de los clones seleccionados utilizando los pares de *primers* M13 Rv-40 – SM11 right y M13 Rv-40 – SM11 left. Digestión con la enzima *HaeIII* de los productos de PCR amplificados con los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 sobre los clones seleccionados.

En la figura III.7B se observa que en el caso del clon 3, el fragmento de 312 pb se observa con el par de *primers* M13 Rv-40 y SM11 right. Esto nos indica que, en dicho clon, el inserto se encuentra dispuesto en la orientación A. Por otro lado, para el clon 9, la amplificación del fragmento de 312 pb se da con el par de *primers* M13 Rv-40 y SM11

left. De esta manera, sabemos que este último clon contiene al fragmento dispuesto en la orientación B. Por último, si bien la resolución del gel no permite diferenciar los fragmentos de 62/63 y 32 pb, si se puede dilucidar el fragmento de 295/296 pb con claridad. Esto nos permite confirmar la presencia del fragmento deseado en el vector.

En el caso de la región intergénica proveniente del pRL8, los clones candidatos seleccionados para evaluar la orientación fueron las colonias 1, 2, 3 y 7. En la figura III.8A se muestra un esquema de las combinaciones de *primers* utilizados para determinar la orientación de los clonados.

Como se observa en la figura III.8., sólo el clon 2 se encuentra en la orientación A. Esto es así ya que el fragmento de 289 pb fue amplificado con los *primers* M13 Rv-40 y pRL8 right, mientras que el fragmento de 322 pb fue amplificado con los *primers* M13 Fw-40 y pRL8 left. Por otro lado, para los clones 1, 3 y 7 se observa el fragmento de 289 pb amplificado con los *primers* M13 Rv-40 y pRL8 left, y el fragmento de 322 pb con los *primers* M13 Fw-40 y pRL8 right. Esto nos indica que en dichos clones el fragmento se encuentra en la orientación B.

Para corroborar la secuencia de los fragmentos clonados, se secuenciaron el clon 3 del vector pK18mob conteniendo la región intergénica 1, y los clones 1 y 2 del vector pK18mob conteniendo la región intergénica 2.

En la figura III.9. podemos observar que la región intergénica 1 en su secuencia genómica tiene únicamente una base diferente con el secuenciamiento experimental. Es por esto, que se procede a analizar los picos. En esa sección, se observa que una de las citocinas (C) no tiene su pico correspondiente (recuadro rojo). Sin embargo, el programa interpretó que en ese lugar debía encontrarse dicha base. Esto probablemente es erróneo. Si quitamos esa base, el alineamiento se corre y tendríamos un 100% de similitud entre la secuencia teórica y el secuenciamiento.

El mismo proceso de análisis se repitió para los dos clones restantes, confirmando el correcto clonado de las regiones seleccionadas.

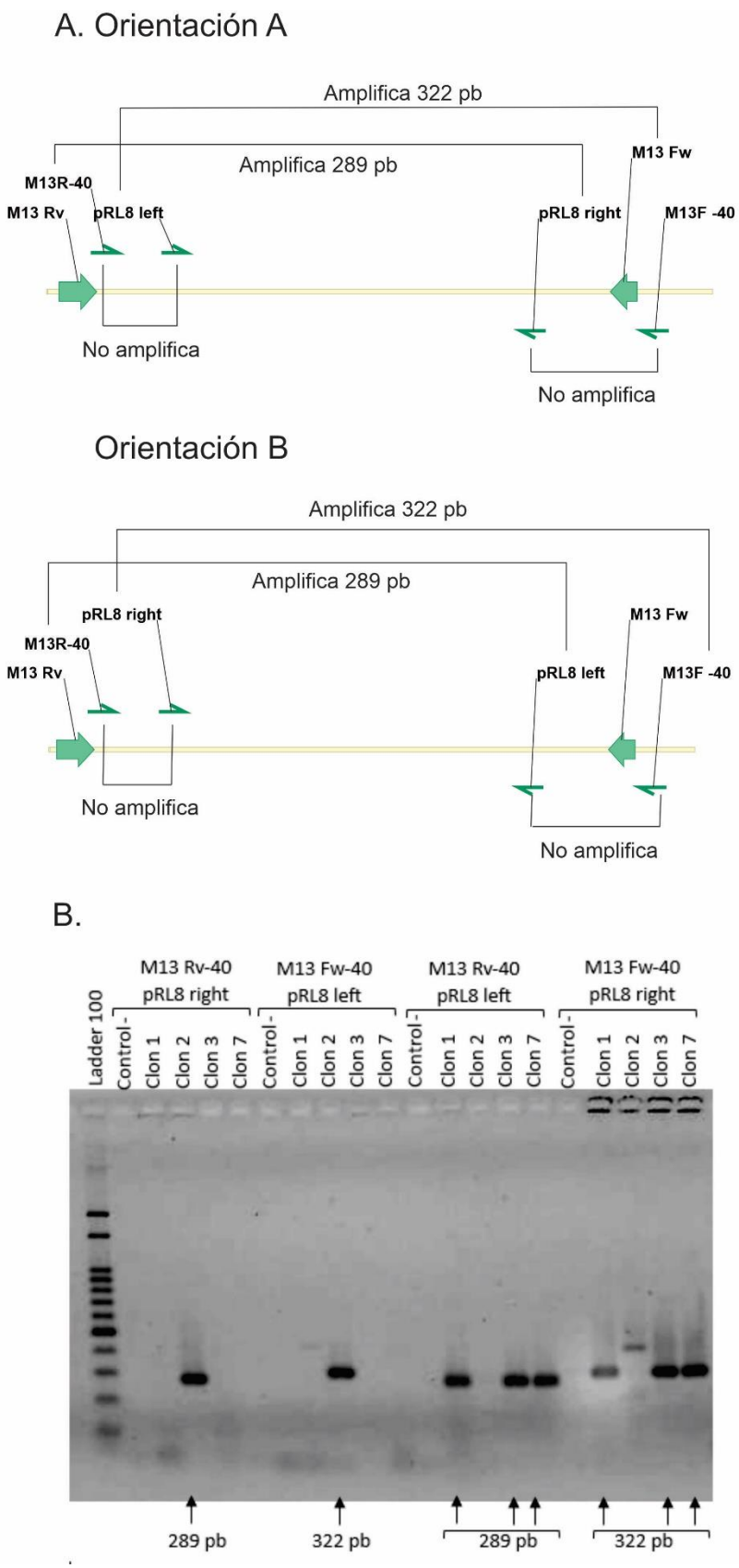


**Figura III.8. Evaluación de la orientación del fragmento obtenido de pRL8 clonado en pK18mob. A.** Esquema de las dos posibles orientaciones del fragmento amplificado. **B.** Electroforesis de los productos de PCR, utilizando los pares de *primers* M13 Rv-40-pRL8 right, M13 Fw-40-pRL8 left, M13 Rv-40-pRL8 left y M13 Fw-40-pRL8 right sobre los clones que contienen la región intergénica 2 en el vector pK18mob.

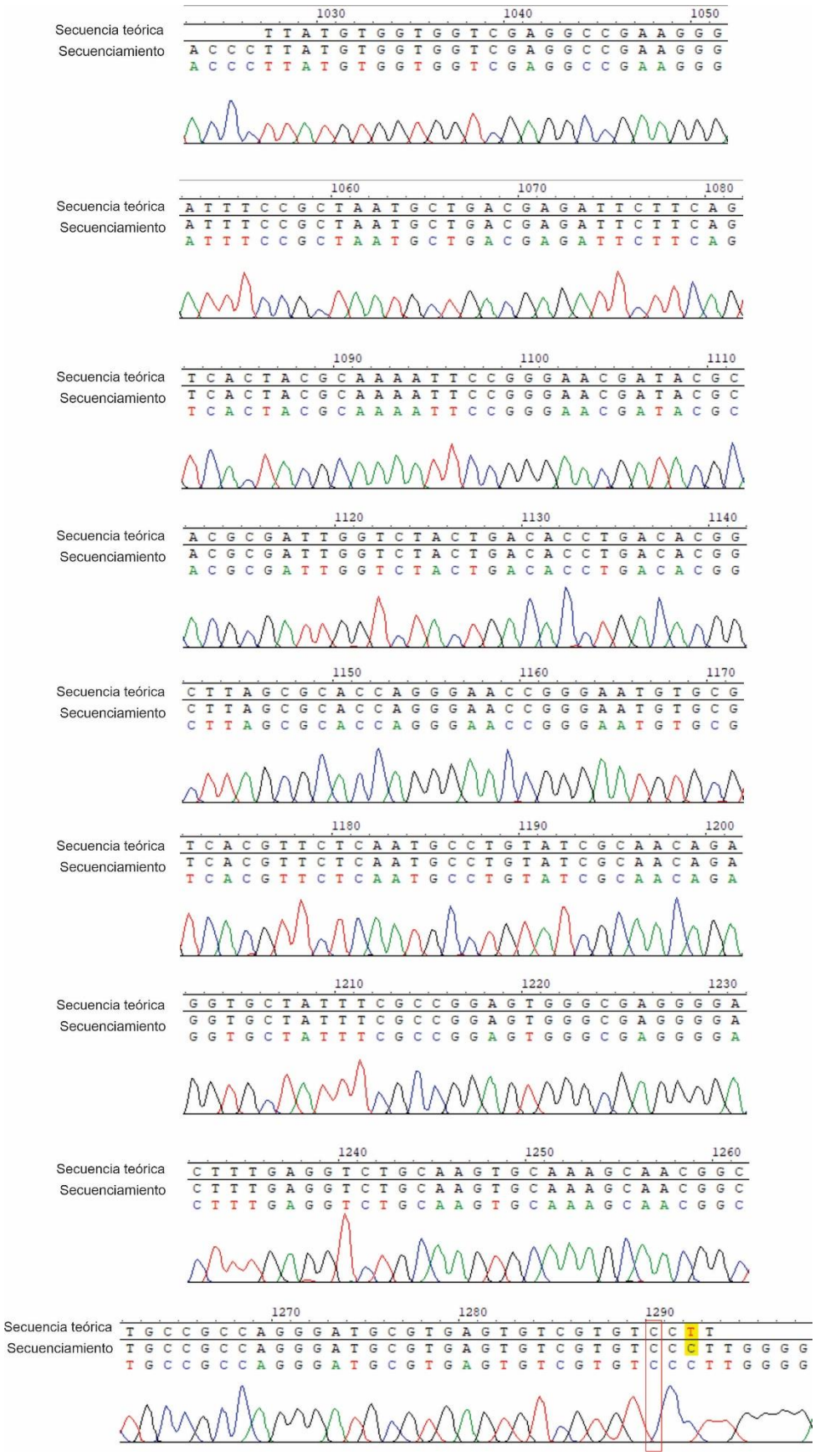


**Figura III.9. Evaluación por secuenciación del fragmento de *S. meliloti* SM11 clonado.** Alineamiento de la región intergénica proveniente de *S. meliloti* SM11 (secuencia genómica) y la secuenciación del vector pK18mob::pSmeSM11b.

## III.4. Marcación de plásmidos – Integración de los vectores

Una vez confirmados los clonados, se procedió a la movilización de los plásmidos mediante una conjugación triparental desde la cepa *E. coli* DH5-α hacia las cepas salvajes de *Sinorhizobium meliloti* SM11 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, utilizando el plásmido *helper* pRK600. Para esto, se utilizó el clon 3 conteniendo la región intergénica 1 y el clon 1 conteniendo la región intergénica 2.

Las conjugaciones se plaquearon en medio TY sólido suplementado con estreptomicina (resistencia presente en las cepas receptoras) y neomicina (resistencia localizada en el plásmido introducido) para la selección de transconjugantes.

Los transconjugantes seleccionados se analizaron mediante PCR utilizando un *primer* perteneciente al vector y otro localizado en el plásmido donde se buscó la integración. Para corroborar la integración en *Sinorhizobium meliloti* SM11 se usaron los pares de *primers* M13 Fw-40 - SM11 chequeo, y para *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, M13 Rv-40 - pRL8 chequeo, utilizando la enzima Taq polimerasa.

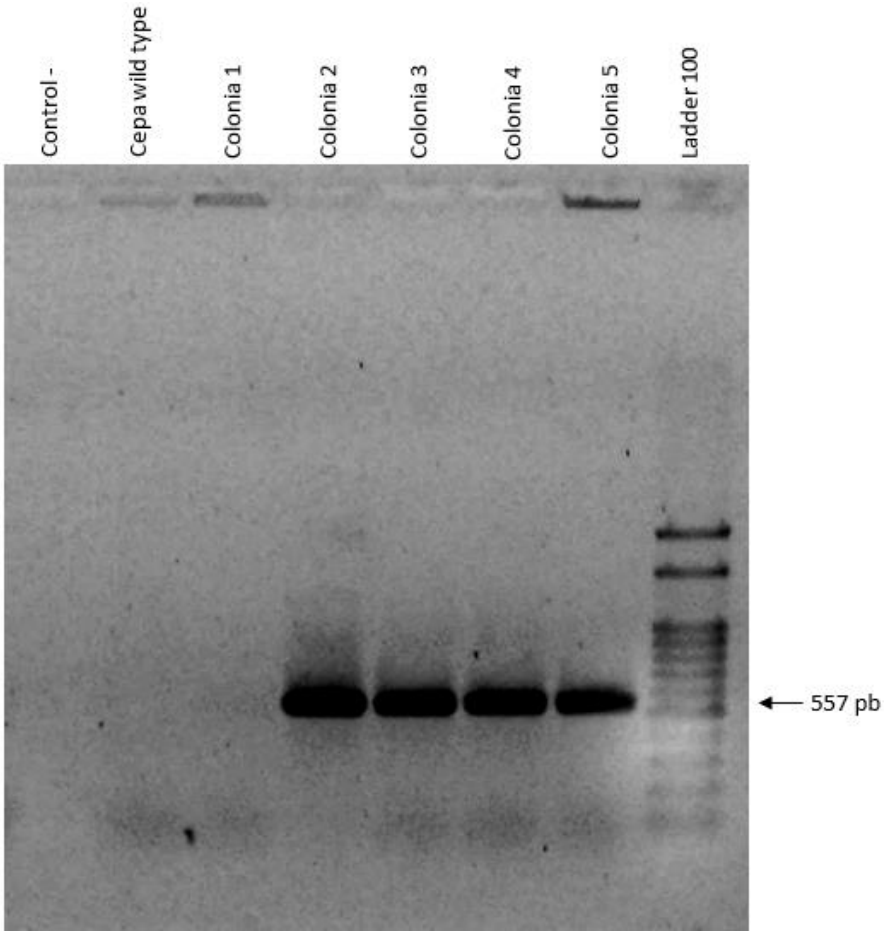


**Figura III.10. Electroforesis de los productos de PCR utilizando los *primers* M13 Fw-40 y pSM11 chequeo sobre los transconjugantes *S. meliloti* SM11 - Nm$^r$.**

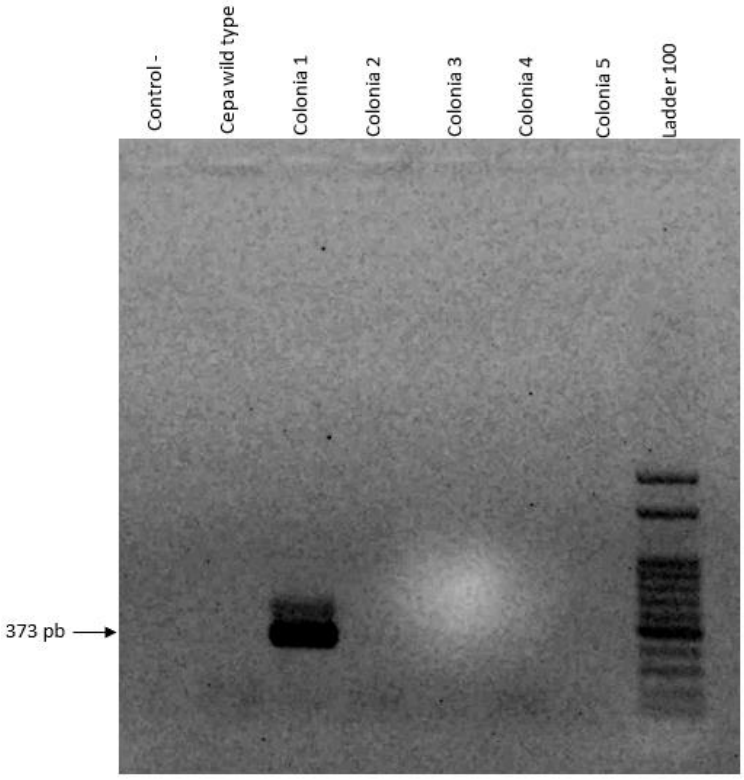


**Figura III.11. Electroforesis de los productos de PCR utilizando los *primers* M13 Rv-40 y pRL8 chequeo sobre los transconjugantes *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 - Nm$^r$.**

Para la integración en pSme11b (Figura III.10), son transconjugantes aquellos clones que presenten una banda de 557 pb, tamaño que se amplifica con los *primers* mencionados al haberse integrado el vector en *S. meliloti* SM11. Sabiendo esto, podemos decir que las colonias 2, 3, 4 y 5 son transconjugantes y poseen una correcta integración del vector.

En el caso de pRL8 (Figura III.11), son transconjugantes aquellas colonias que presentan una banda de 373 pb mediante la PCR M13 Rv-40 y pRL8 chequeo. En este caso, solo la colonia 1 tiene integrado el vector en el lugar deseado.

## III.7. Evaluación del fenotipo conjugativo

A partir de las cepas *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 marcada con neomicina en el pRL8 o *Sinorhizobium meliloti* SM11 marcada con neomicina en el pSmeSM11b se realizaron conjugaciones y se calculó la frecuencia conjugativa de dichos plásmidos. En todas las conjugaciones, la cepa receptora fue *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2.

Promediando las frecuencias obtenidas en los distintos experimentos se observa que la transferencia del plásmido pRL8 desde *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 hacia *A. tumefaciens* UBAPF2 ocurre a una frecuencia conjugativa de 4,4 ± 2,3 x $10^{-5}$ transconjugantes por célula donadora y de 7,5 ± 2,6 x $10^{-6}$ transconjugantes por célula receptora (figura III.12). Para corroborar la transferencia, se realizó un gel de lisis *in situ* (gel tipo Eckhardt) para evaluar los perfiles plasmídicos de todas aquellas cepas involucradas en la transferencia del pRL8 (Figura III.13).

Para la transferencia del plásmido pSmeSM11b desde *S. meliloti* SM11 hacia *A. tumefaciens* UBAPF2 no se detectaron transconjugantes en ninguna conjugación (figura III.12), por lo que, la frecuencia conjugativa es menor a 1,4 ± 0,9 x$10^{-9}$ transconjugantes por célula donadora y a 1,7 ± 0,53 x $10^{-10}$ transconjugantes por célula receptora.

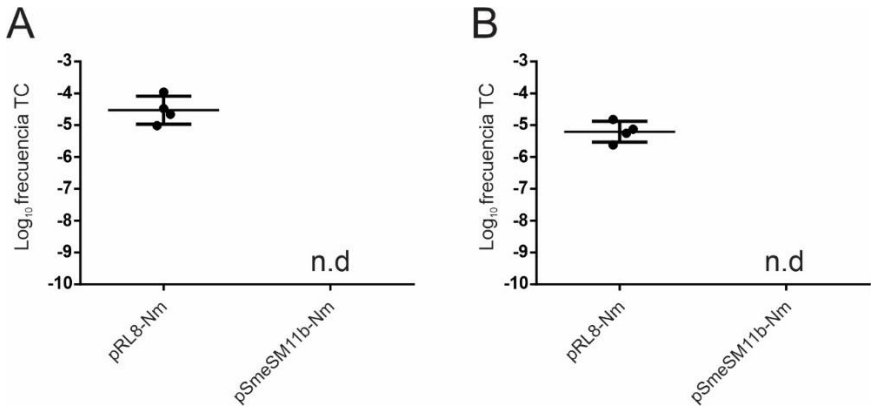


**Figura III.12. Frecuencias de la transferencia conjugativa de los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b desde su entorno parental hacia *A. tumefaciens* UBAPF2. A.** Transconjugantes por célula donadora de los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b. **B.** Transconjugantes por célula receptora de los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b.

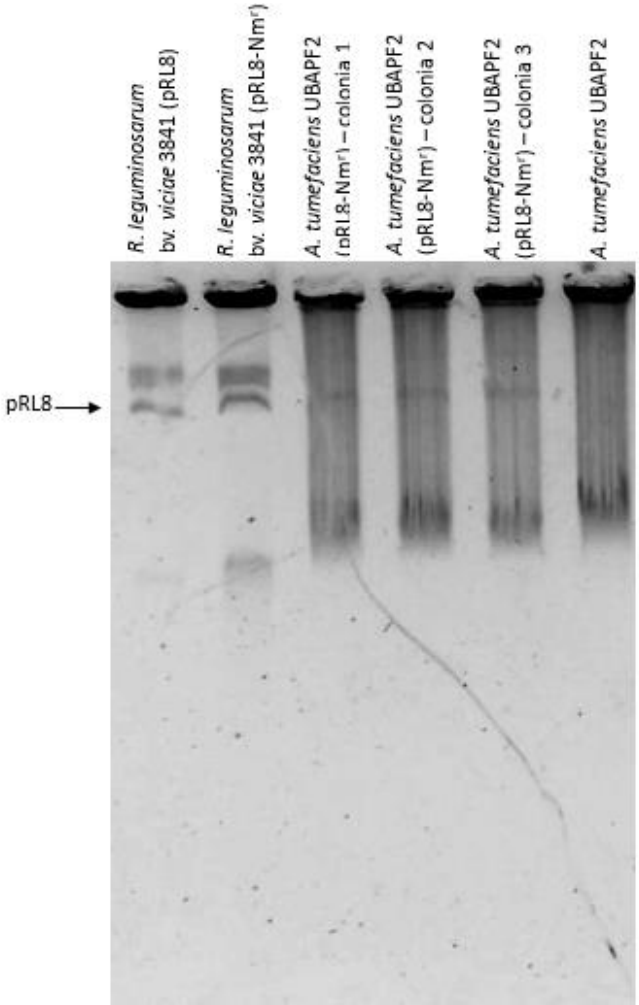


**Figura III.13. Perfiles plasmídicos de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 conteniendo el plásmido pRL8 sin marcar y marcado con antibiótico, y de *A. tumefaciens* UBAPF2 con y sin el plásmido marcado.**

Mediante un análisis bioinformático, se observó que existe un desplazamiento en el marco de lectura debido a la deleción de una base en el gen *trbE* del plásmido pSmeSM11b. La posición de esta deleción se encuentra señalada con una flecha en la figura III.14.

```
          (1536) 1536          1550      1560      1570      1580      1590
   pLPU83a(1536) TGGCGAGAGCGGGGAGGGGGCAAGTCTTGCCTTCTGCCCACTGTCGGAGCTTGAGACC
       pRL8(1536) CGGCGAGAGCGGAGAGGGGGCCAGTCTTGCCTTCTGCCCATTGTCGGAGCTTTCGACT
 pSmeSM11b(1536) TGGCGAAAGCGGGGAGGGGGTGAGTCTAGCGTTCTGCCCCCTGTCGGACCTGTCGACT
  Consensus(1536) TGGCGAGAGCGGGGAGGGGGC AGTCTTGCCTTCTGCCCACTGTCGGAGCTTTCGACT

                  1600      1610      1620      1630      1640      1650
                  GACGCTGATCGTGCATGGGCTTCCGAGTGGATCGAGACCCTAGTATCGCTTCAGGGCGTG
                  GACGCCGATCGAGCATGGGCTTCCGAGTGGATCGAGACCCTCGTTTCGCTTCAAGGAGTC
                  GACGCCGACCGGGCATGG-CTTCCGAATGGATCGAAACCCTCGTTTCCCTACAGGGCGTC
                  GACGCCGATCG GCATGGGCTTCCGAGTGGATCGAGACCCTCGTTTCGCTTCAGGGCGTC
                                ↑

                  1660      1670          1688
                  ACGATTGCGCCGGACCATCGAAACGCGATCTCGAG
                  ACGATTGCGCCGGACCATCGCAATGCAATCTCGAG
                  ACGATTGCCCCCGACCATCGAAATGCAATCTCAAG
                  ACGATTGCGCCGGACCATCGAAATGCAATCTCGAG
```

**Figura III.14. Alineamiento del gen *trbE* de los plásmidos pLPU83a, pRL8 y pSmeSM11b.**

La proteína TrbE pertenece a la superfamilia VirB4, por lo que tiene actividad ATPasa, y es requerida para la transferencia de ADN y para la maquinaria del sistema de secreción tipo 4 (Greve *et al.,* 2004). Al desplazarse el marco de lectura, se da lugar a una traducción diferente a la original. Esto genera que se frene o se desplace la traducción. En estudios previos, se observó que la mayoría de las mutaciones en *trbE* resultaban en la completa pérdida de actividad (Rabel *et al.*, 2003), por lo que este error de lectura podría ser la causa del fenotipo observado.

Con el objetivo de continuar con la evaluación de las propiedades conjugativas de los plásmidos del grupo I-C, por un lado, se realizó la complementación del plásmido pSmeSM11b (marcado con neomicina) con el gen que codifica para una proteína TrbE funcional para saber si sólo ese gen es responsable de la falta de conjugación, y, por otro lado, se evaluó la frecuencia conjugativa del pRL8 en otro entorno genómico.

## III.5. Amplificación del gen de la proteína TrbE

Como se explicó anteriormente, al no detectar transconjugantes para la transferencia del plásmido pSmeSM11b desde *S. meliloti* SM11 hacia *A. tumefaciens* UBAPF2, se decidió complementar la cepa de rizobio con el gen *trbE* proveniente de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Figura III.15). De esta forma, se podría evaluar la funcionalidad de la proteína TrbE en *S. meliloti* SM11 al mismo tiempo que se comprobaría si el *frameshift* mencionado es la causa por la que el plásmido no es capaz de ser transferido. Para esto, dicho gen se amplificó y clonó en el plásmido pBBR1MCS5, el cual es capaz de replicar en rizobios. A continuación, se realizó una conjugación triparental y este plásmido se transfirió a la cepa *Sinorhizobium meliloti* SM11 marcada,

complementando así la proteína TrbE truncada en esta última cepa. Por último, se midió la frecuencia conjugativa a esta nueva *Sinorhizobium meliloti* SM11.

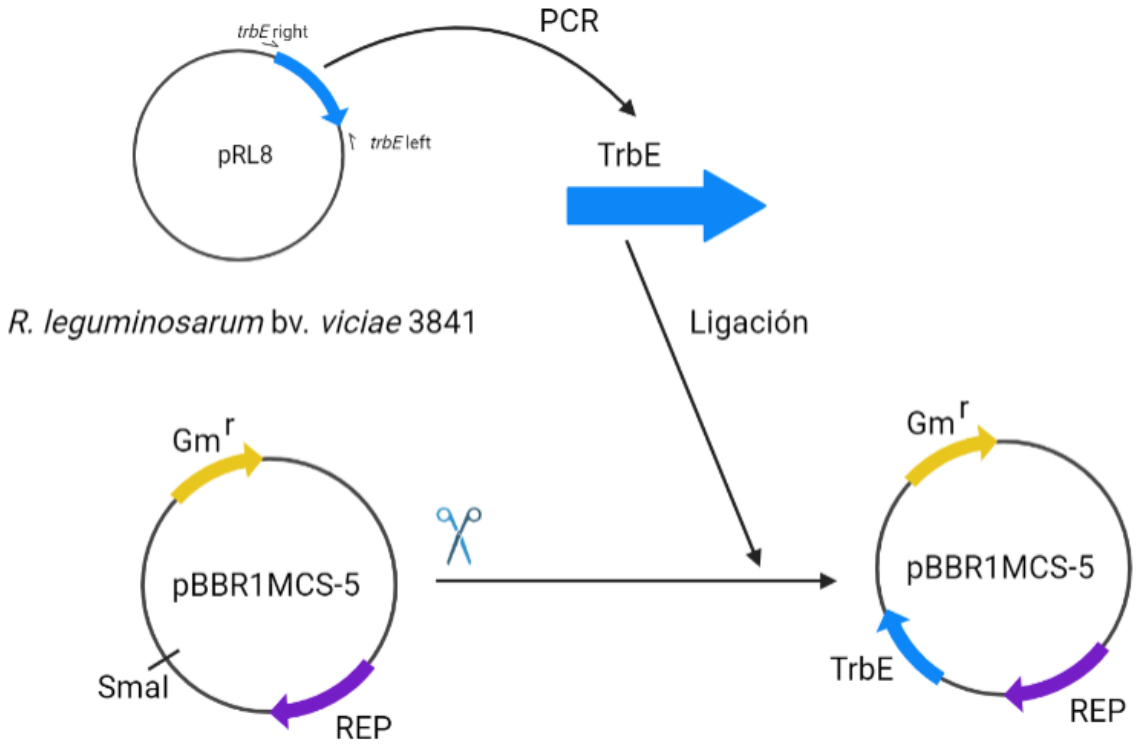


**Figura III.15. Estrategia para el clonado del gen de la proteína TrbE en el vector pBBR1MCS5.**

Para obtener el gen de la TrbE, se realizó una PCR con gradiente de temperatura (50, 55.7 y 58.3°C) utilizando la enzima Phusion polimerasa, los *primers* trbE left y trbE right y como molde ADN de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. Dicha PCR da como resultado un fragmento de 2536 pb, el cual se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% (figura III.16).

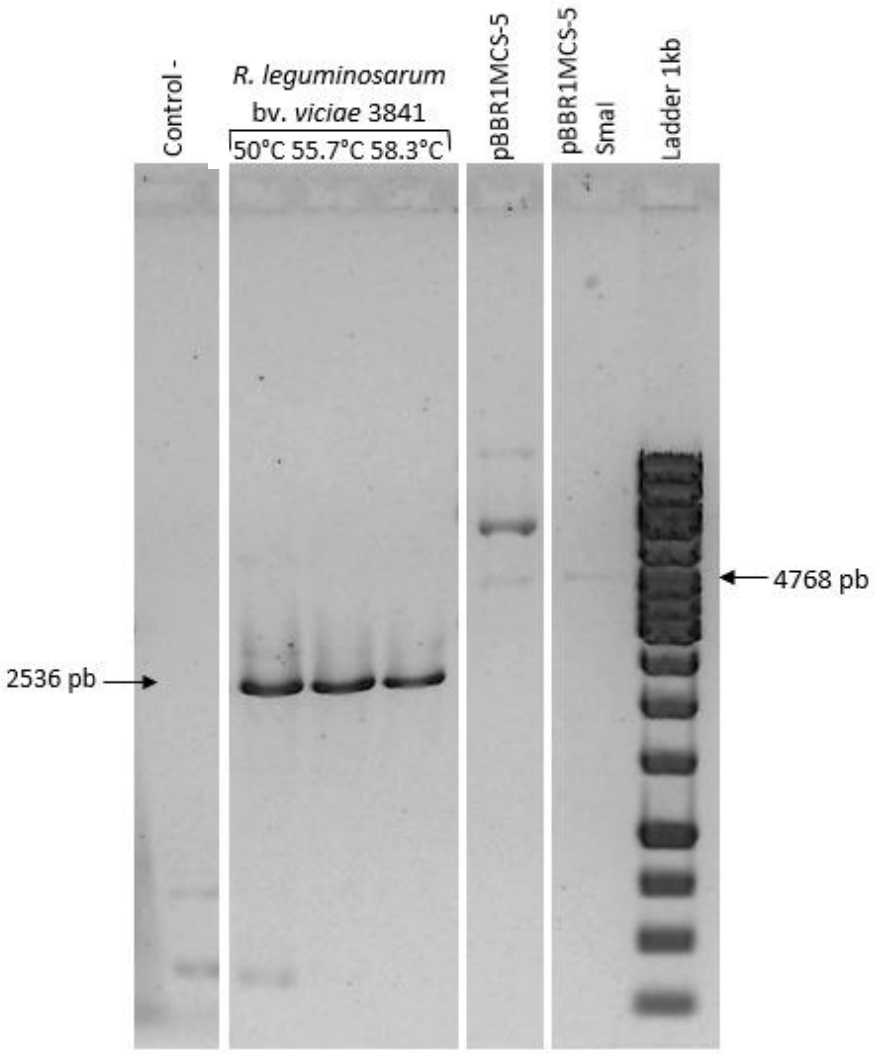


**Figura III.16. Electroforesis de los productos de PCR, utilizando los *primers* trbE left y trbE right sobre la cepa *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, y del producto de la digestión del vector pBBR1MCS5 con la enzima de restricción SmaI.** Se eliminaron del gel aquellas calles que no aportaban datos relevantes al resultado.

## III.6. Clonado del gen de la proteína TrbE

Para clonar el gen de la proteína TrbE, se utilizó como vector de clonado el plásmido pBBR1MCS5, el cual es de bajo número de copias, con promotor *lac*, replicativo en rizobios y resistente a gentamicina. Dicho vector fue digerido previamente con *SmaI* (observado en la figura III.16).

El gen de la proteína TrbE se ligó al pBBR1MCS5 digerido. El producto de ligación se electroporó en *E. coli* DH5-α y se plaqueó en medio LB sólido suplementado con Gm y X-gal para la selección de transformantes. En la figura III.15 se mostró un esquema general de este proceso.

De las colonias blancas obtenidas, solamente una amplificó el fragmento de tamaño correcto con los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40. Posteriormente, se evaluó la orientación del fragmento clonado mediante las combinaciones M13 Rv-40 – TrbE left y M13 Rv-40 – TrbE right (Figura III.16).

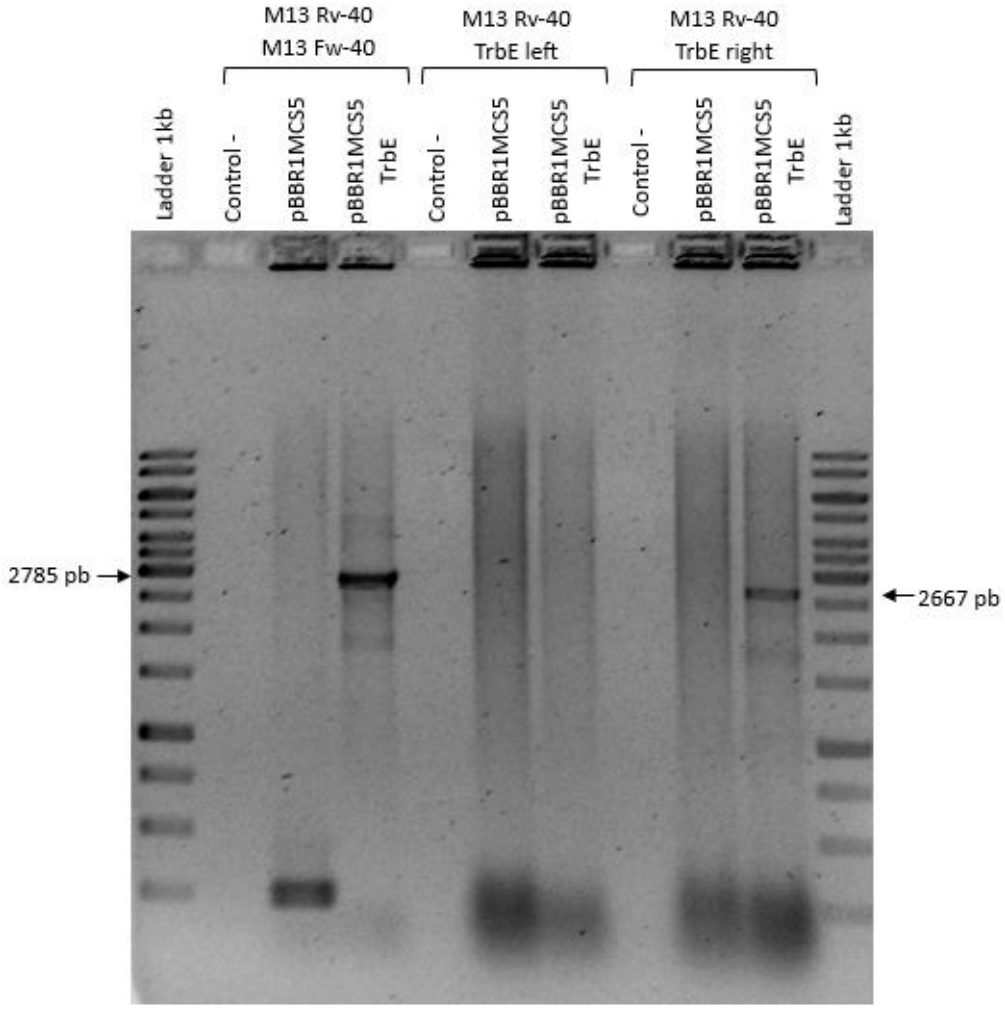


**Figura III.17. Electroforesis de los productos de PCR utilizando los pares de *primers* M13 Fw-40 – M13 Rv-40, M13 Rv-40 – TrbE left y M13 Rv-40 – TrbE right.**

En la figura III.16., podemos observar que con los *primers* M13 Fw-40 y M13 Rv-40 se amplificó un fragmento de 2785 pb, correspondiente al gen *trbE*. Esto confirma que el gen se encuentra dentro del vector. Respecto a la orientación, el fragmento de 2667 pb se observa utilizando los *primers* M13 Rv-40 y SM11 right. Si bien esta orientación no era la deseada, ya que el gen no queda bajo la expresión del promotor *lac*, se decidió continuar con el ensayo de complementación.

## III.7. Ensayos de complementación

El vector conteniendo la copia funcional de *trbE* se introdujo en la cepa *S. meliloti* SM11 - $Nm^r$ , y se evaluó el fenotipo conjugativo de esta cepa. Como control, se introdujo el vector pBBR1MCS5 sin inserto de manera independiente, también en la misma cepa.

Para el plásmido pSmeSM11b conteniendo el vector vacío no se observaron transconjugantes en ningún caso. Su frecuencia es menor a 3,6 ± 0,17 x $10^{-10}$ transconjugantes por célula donadora y menor a 9,6 ± 0,82 x$10^{-12}$ transconjugantes por célula receptora. Por otro lado, para el plásmido pSmeSM11b con la copia funcional de *trbE* se observaron transconjugantes. En este caso, la frecuencia conjugativa fue de 1,2 ± 0,21 x $10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora y 2,1 ± 0,25 x $10^{-7}$ transconjugantes

por célula receptora, confirmando que la copia de *trbE* es capaz de complementar a la cepa salvaje. Estos resultados pueden observarse en la figura III.17. Para finalizar, se evaluaron los perfiles plasmídicos de todas aquellas cepas involucradas en las conjugaciones mediante un gel de lisis in situ (gel tipo Eckhardt) (figuras III.18 y III.19).

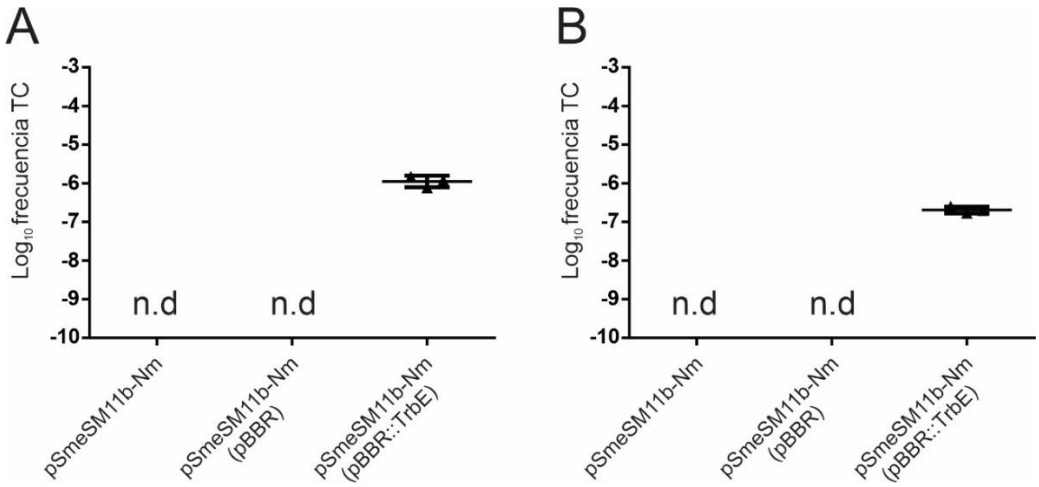


**Figura III.18. Frecuencias de la transferencia conjugativa del plásmido pSmeSM11b conteniendo el vector vacío o el vector con la copia funcional de *trbE*, comparadas con la frecuencia conjugativa del pSmeSM11b. A.** Transconjugantes por célula donadora. **B.** Transconjugantes por célula receptora.

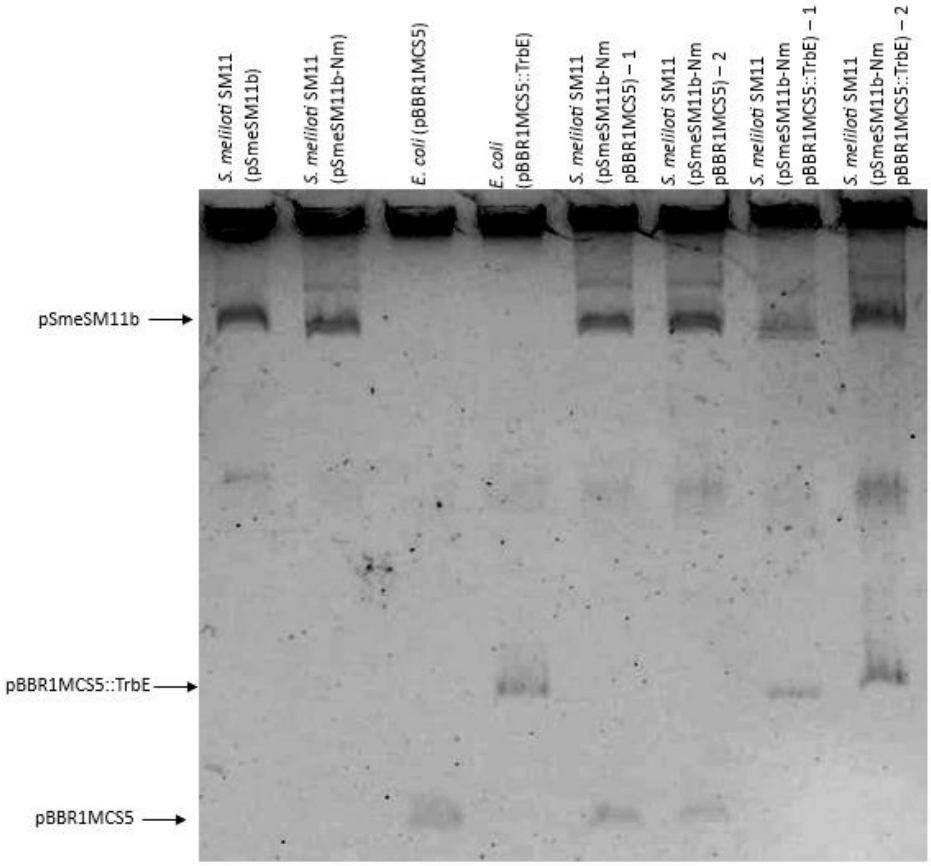


**Figura III.19. Perfiles plasmídicos de la transferencia de los plásmidos desde *E. coli* a *S. meliloti* SM11.** Se observa la cepa salvaje *S. meliloti* SM11 conteniendo el plásmido pSmeSM11 sin marcar y marcado con antibiótico, *E.* coli conteniendo el plásmido pBBR1MCS5 y el plásmido pBBR1MCS5 conteniendo el gen *trbE,* dos colonias de *S. meliloti* SM11 conteniendo el pSmeSM11b y el pBBR1MCS5 y dos colonias de *S. meliloti* SM11 conteniendo el pSmeSM11b y el pBBR1MCS5 con el gen *trbE*.

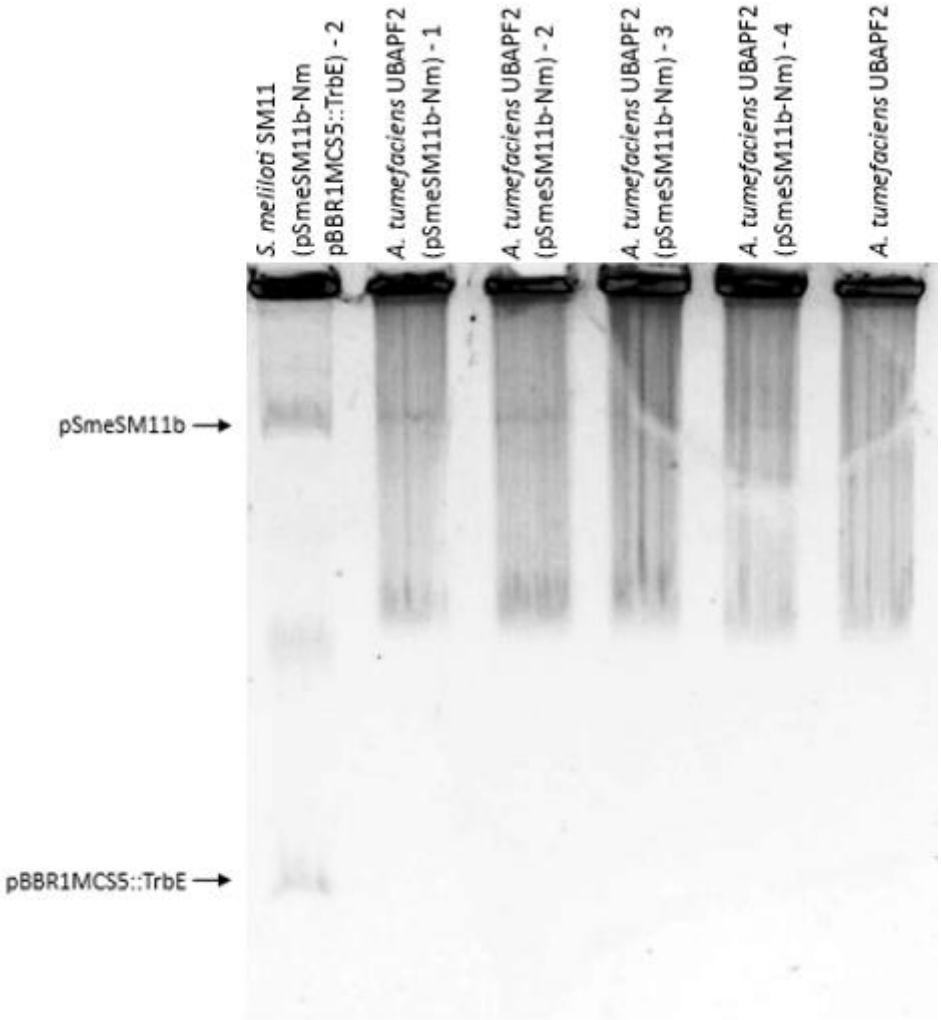


**Figura III.20. Perfiles plasmídicos de la transferencia de pSmeSM11b complementada con *trbE*.** Se observan los perfiles plasmídicos de colonias de *S. meliloti* SM11 conteniendo el pSmeSM11b y el pBBR1MCS5 con el gen *trbE*, cuatro colonias de *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pSmeSM11b y *A. tumefaciens* sin el plásmido pSmeSM11b.

## III.8. Evaluación del fenotipo conjugativo del pRL8 desde otro entorno genómico

Estudios previos utilizando el plásmido pLPU83a demostraron que el entorno genómico puede afectar la transferencia del plásmido (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Con el objetivo de profundizar aún más en las propiedades conjugativas de plásmidos del grupo I-C, se procedió a evaluar el fenotipo conjugativo del plásmido pRL8 desde un entorno diferente al parental.

La cepa *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2, ahora conteniendo el plásmido pRL8 con la marca del antibiótico, fue evaluada en su frecuencia conjugativa utilizando como cepa receptora *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2 con resistencia a gentamicina y fluorescencia roja.

Para evaluar el fenotipo conjugativo, se realizaron conjugaciones cuantitativas por cuadruplicado o triplicado y, utilizando el recuento de bacterias (como se indica en la sección II.3.a.), se calculó la frecuencia conjugativa. Dicha frecuencia dio como resultado 2,9 ± 0,66 x $10^{-7}$ transconjugantes por célula donadora, y 9,3 ± 1,6 x $10^{-7}$ transconjugantes por célula receptora. En la figura III.20 se observan estos resultados a los obtenidos previamente en la cepa parental.

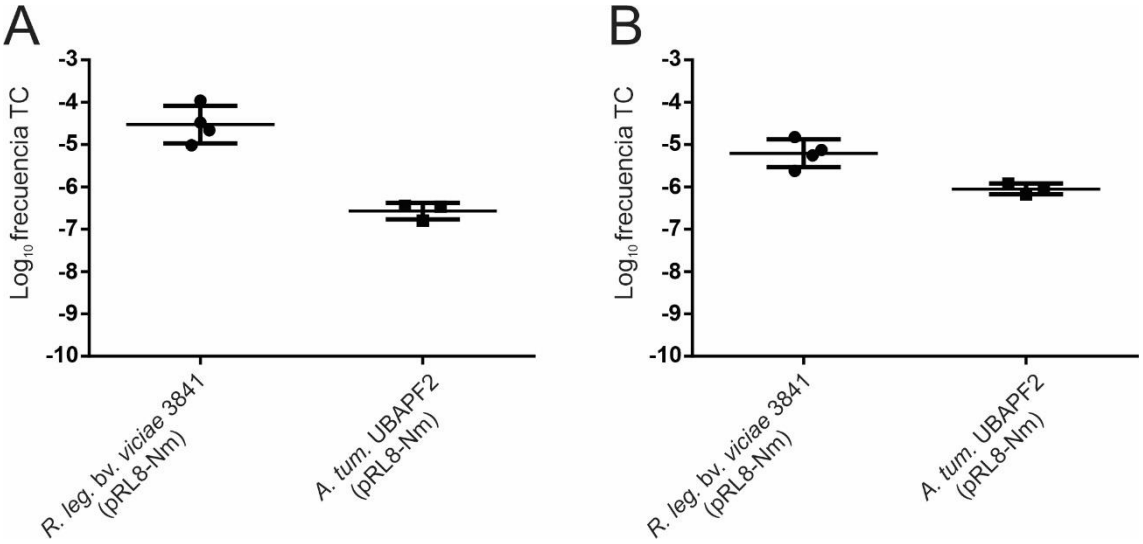


**Figura III.21. Frecuencias de la transferencia conjugativa del plásmido pRL8 desde su cepa parental *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (*R. leg.* bv. *viciae* 3841 (pRL8-Nm)) y desde *A. tumefaciens* UBAPF2 (*A. tum.* UBAPF2 (pRL8-Nm))**

# *Capítulo IV.*
# *Discusión y conclusiones*

La conjugación es uno de los mecanismos más eficientes de intercambio de ADN entre bacterias (Amábile-Cuevas *et al.*, 1993, Fry *et al.*, 1990), contribuyendo así a la plasticidad de las bacterias para adaptarse a condiciones cambiantes del entorno. Los rizobios poseen numerosos plásmidos que pueden ser transferidos por conjugación, aunque sólo en pocos casos se ha estudiado en profundidad la naturaleza regulatoria de este mecanismo.

En el laboratorio donde se realizó este trabajo, se ha caracterizado el plásmido pLPU83a de *Rhizobium favelukesii* LPU83, perteneciente a un grupo de plásmidos que presentan características distintivas en cuanto a la organización de los genes conjugativos y su regulación. pLPU83a es un plásmido modelo que pertenece al grupo I-C de plásmidos. Con el objetivo de conocer el comportamiento de otros plásmidos pertenecientes a este grupo, en este trabajo hemos estudiado las propiedades conjugativas de los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y *Sinorhizobium meliloti* SM11, respectivamente.

En primer lugar, pudimos marcar con una resistencia a antibiótico los plásmidos pRL8 y pSmeSM11b mediante la integración de un vector. Al evaluar el fenotipo conjugativo del plásmido pRL8 desde la cepa parental, hemos observado una frecuencia conjugativa de $4,4 \pm 2,3 \times 10^{-5}$ transconjugantes por célula donadora y de $7,5 \pm 2,6 \times 10^{-6}$. El plásmido modelo pLPU83a, desde la cepa parental, tiene una frecuencia de $2,77 \pm 5,41 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora (Torres Tejerizo *et al.*, 2014) y $2,07 \pm 1,45 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula receptora (Torres Tejerizo *et al.,* 2010). Al comparar la frecuencia de transconjugantes por célula donadora vemos que pRL8 se transfiere con un orden más de magnitud que pLPU83a. Por otro lado, para el plásmido pSmeSM11b no se detectaron transconjugantes, su frecuencia conjugativa está por debajo de los límites de detección. A partir de estos resultados, se decidió continuar trabajando con cada uno de los plásmidos de diferente manera.

A partir de un estudio bioinformático se encontró que existe un desplazamiento en el marco de lectura del gen *trbE* en el Mpf del plásmido pSmeSM11b. Como se observó que este plásmido no conjuga a una frecuencia detectable, se procedió a complementar dicho plásmido con un gen *trbE* funcional. Si bien el *trbE* clonado no quedó bajo el promotor *lac* del vector pBBR1MCS5, los ensayos de complementación mostraron una frecuencia conjugativa del plásmido pSmeSM11b complementado de $1,2 \pm 0,21 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora y $2,1 \pm 0,25 \times 10^{-7}$ transconjugantes por célula receptora. De esta manera, hemos demostrado que solamente el *trbE* truncado de pSmeSM11b es el causante de la falta de conjugación.

Para el plásmido pRL8, ya que presentaba un fenotipo conjugativo desde la cepa parental, decidimos realizar la conjugación desde otro entorno genético. Al observar los resultados desde *A. tumefaciens* UBAPF2, podemos ver que pRL8 conjuga a una frecuencia de $2,9 \pm 0,66 \times 10^{-7}$ transconjugantes por célula donadora, y $9,3 \pm 1,6 \times 10^{-7}$ transconjugantes por célula receptora. Este valor es mucho mayor que el observado de pLPU83a desde UBAPF2, siendo $2,9 \pm 0,86 \times 10^{-9}$ transconjugantes por célula donadora (Castellani *et al.,* 2022). Si bien en ambos casos la frecuencia conjugativa disminuye

respecto a aquella determinada para el entorno parental, el valor para el pRL8 disminuye en menor magnitud que el valor para pLPU83a. De esta manera, evidenciamos que la regulación de la conjugación en pRL8 y pLPU83 es parcialmente diferente, ya sea por la presencia de otros genes en el plásmido como por la posible expresión diferencial de ciertos genes.

Con el fin de comprender, en mejor medida, la regulación de la transferencia conjugativa en los plásmidos del grupo I-C, abordaremos estudios de genómica comparativa para determinar cuáles son genes compartidos entre los plásmidos pLPU83a y pRL8, como así también los presentes únicamente en uno de ellos. A partir de este conjunto de genes, evaluaremos cómo influyen en la regulación de este fenómeno y así extender el conocimiento de la regulación de la transferencia conjugativa en rizobios.

# *Capítulo V. Bibliografía*

Amábile-Cuevas CF & Chicurel ME (1993) Horizontal gene transfer. *Am Sci* **81**: 332-342.
BÉCQUER, C.J.. La simbiosis leguminosa rizobio: Características generales e importancia productiva. Pastos y Forrajes, [S.l.], v. 25, n. 2, feb. 2012. ISSN 2078-8452.

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

Brom S, Pistorio M, Romero D & Torres-Tejerizo G (2014) Boundaries for Conjugative Transfer of Rhizobial Plasmids: Restraining and Releasing Factors. *Plasticity in Plant Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria,*(Katsy IE, ed.) p.^pp. 43-54. Springer New York, New York, NY.

Canfield, D.E., Glazer, A.N., and Falkowski, P.G. (2010). The evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science*.

Castellani, L. G., Luchetti, A., Nilsson, J. F., Pérez-Giménez, J., Struck, B., Schlüter, A., Pühler A., Niehaus K., Romero D., Pistorio M. & Torres Tejerizo, G. (2022). RcgA and RcgR, Two Novel Proteins Involved in the Conjugative Transfer of Rhizobial Plasmids. *Mbio*, *13*(5), e01949-22.

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

Clarke M, Maddera L, Harris RL & Silverman PM (2008) F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17978-17981.
Ding H & Hynes MF (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can J Microbiol* **55**: 917-927.

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

Farrand SK (1998) Conjugal plasmids and their transfer. *The Rhizobiaceae: molecular biology of plant-associated bacteria,*(Spaink HP, Kondorosi A & Hooykaas PJ, eds.), p.^pp. 199-233. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
Fry JC & Day MJ (1990) *Bacterial genetics in natural environments.* Chapman and Hall, London.

Gonzalez V, Acosta JL, Santamaria RI, *et al*. (2010) Conserved symbiotic plasmid AND sequences in the multireplicon pangenomic structure of Rhizobium etli. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1604-1614.

Graham, Peter H., and Carroll P. Vance. 2003. "Legumes: Importance and Constraints to Greater Use." *Plant Physiology*.

Greve, B., Jensen, S., Brügger, K., Zillig, W., & Garrett, R. A. (2004). Genomic comparison

of archaeal conjugative plasmids from Sulfolobus. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, *1*(4), 231 239. https://doi.org/10.1155/2004/151926

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

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.

Johnston AWB, Beringer JE: Identification of rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers. J Gen Microbiol. 1975, 87: 343-350.

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.

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.

Luo ZQ, Qin Y & Farrand SK (2000) The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J Biol Chem* **275**: 7713-7722.

Miller RV (2004) Bacteriophage-mediated transduction: An engine for change and evolution. *Microbial Evolution: Gene Establishment, Survival, and Exchange,*(Miller RV DM, ed.) p.^pp. 144–157. ASM Press, Washington DC.

Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature reviews. Microbiology*, *17*(6), 371–382.

Nogales J, Blanca-Ordonez H, Olivares J & Sanjuan J (2013) Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environ Microbiol* **15**: 811 821.

Peoples, M. B. and D. F. Herridge (1990). “Nitrogen fixation by legumes in tropical and sub tropical agriculture.” *Adv. Agron.* **44**: 155-224.

Peoples, M. B. and E. T. Craswell (1992). “Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture.” *Plant Soil* **141**: 13-39.

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

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

Rabel, C., Grahn, A. M., Lurz, R., & Lanka, E. (2003). The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *Journal of bacteriology*, *185*(3), 1045–1058. https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1045-1058.2003

Robertson, G. Philip, and Peter M. Vitousek. 2009. "Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource." *Annual Review of Environment and Resources*.

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

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41.

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell, 32(1), 15–41. https://doi.org/10.1105/TPC.19.00279

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

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.

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

Stiens, M., Schneiker, S., Pühler, 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*(2), 297–309.

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

Thomas, C., Nielsen, K. (2005) Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 711–721.

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

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

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

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