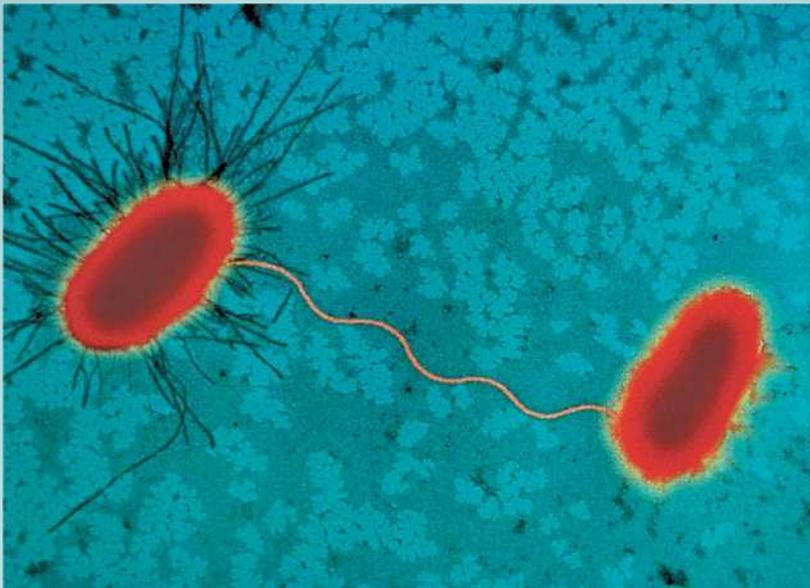




Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias



# Regulación de la Transferencia Conjugativa de los Plásmidos Simbióticos de *Sinorhizobium meliloti* 1021



Helena Blanca Ordóñez

Tesis Doctoral

2013



UNIVERSIDAD DE GRANADA



**Regulación de la Transferencia  
Conjugativa de los Plásmidos Simbióticos  
de *Sinorhizobium meliloti* 1021**



Helena Blanca Ordóñez  
Postgrado oficial en Biología Fundamental y de Sistemas  
Tesis Doctoral  
2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Helena Blanca Ordóñez  
D.L.: GR 2242-2013  
ISBN: 978-84-9028-647-0



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Regulación de la Transferencia  
Conjugativa de los Plásmidos Simbióticos  
de *Sinorhizobium meliloti* 1021**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología  
Helena Blanca Ordóñez para optar al grado de Doctor

Fdo. Helena Blanca Ordóñez

VºBº  
El director de Tesis

VºBº  
La directora de Tesis

Fdo. Juan Sanjuán Pinilla  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Profesor de Investigación del CSIC

Fdo. Joaquina Nogales Díaz  
Doctora en Ciencias Biológicas



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo Interacciones Planta-Bacteria perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), gracias a una Beca Predoctoral de “Ayuda para la Formación de Doctores en Centros de Investigación y Universidades Andaluzas” (Junta de Andalucía).

Algunos de los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

### **Congresos**

Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Soto, M.J., Olivares, J. y Sanjuán J. (2012) The concerted action of one- and two-component signal transduction regulators governs conjugative transfer of the *Sinorhizobium meliloti* symbiotic megaplasmids. *International Plasmid Biology Conference*. Santander, España.

Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Soto, M.J., Olivares J. y Sanjuán J. (2008) Identification of two new genes involved in the conjugative transfer of pSymA in *Sinorhizobium meliloti*. *International Plasmid Biology Conference*. Gdansk, Polonia.

Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Soto, M.J., Olivares, J. y Sanjuán J. (2008) Identificación de dos nuevos genes implicados en la transferencia conjugativa del pSymA en *Sinorhizobium meliloti*. *I congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno y XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)*. Estoril, Portugal.

Blanca-Ordóñez, H., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Olivares, J., Soto, M.J. y Sanjuán, J. (2006) Papel del sistema VirB de *Sinorhizobium meliloti* en la transferencia conjugativa de pSyms y en el establecimiento de simbiosis con leguminosas. *XI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno*. El Escorial, Madrid.

Oliva-García, J.J., Blanca-Ordóñez, H., Pérez-Mendoza, D., Olivares, J., Sanjuán, J. y Soto, M.J. (2006) The VirB system of *Sinorhizobium meliloti*: Role in conjugal transfer and symbiosis with legume plants. *II FEMS Congress of European Microbiologists*. Madrid, España.

Soto, M.J., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Blanca-Ordóñez, H., Herrera-Cervera, J.A., Olivares, J. y Sanjuán J. (2005) Functional characterization and regulation of a *Sinorhizobium meliloti* type IV secretion system. *XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Mérida, México.

## Publicaciones

Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2013) Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environmental Microbiology* **15**: 811-821.

Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Soto, M.J., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2011) Transferencia Genética Horizontal en *Rhizobium*. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos, pp. 171-183. Sociedad Española de Fijación de nitrógeno (SEFIN) 2011. ISBN 978-84-614-7364-9.

Blanca-Ordóñez, H., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Soto, M.J., Olivares, J., Sanjuán, J. y Nogales, J. (2010) pSymA-dependent mobilization of the *Sinorhizobium meliloti* pSymB megaplasmid. *Journal of Bacteriology* **192**: 6309-6312.

Blanca-Ordóñez, H., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Olivares, J., Soto, M.J. y Sanjuán, J. (2006) Papel del sistema VirB de *Sinorhizobium meliloti* en la transferencia conjugativa de pSyms y en el establecimiento de simbiosis con leguminosas In: J. Barriuso-Maicas & A. García Villaraco (eds), *XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno*, pp. 61. Madrid.

Soto, M.J., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Blanca-Ordóñez, H., Herrera-Cervera, J.A., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2006) Functional Characterization and Regulation of a *Sinorhizobium meliloti* Type IV Secretion System In: F. Sánchez, C. Quinto, I.M. López-Lara & O. Geiger (eds.), *Biology of Plant-Microbe Interactions*, pp. 484-488. International Society for Plant-Microbe Interactions, Cancún (México). ISBN 978-0-9654625-4-9.

La doctoranda D<sup>a</sup> Helena Blanca Ordóñez y los directores de la tesis Juan Sanjuán Pinilla y Joaquina Nogales Díaz, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, marzo de 2013

Juan Sanjuán Pinilla

Director de la Tesis

Joaquina Nogales Díaz

Director de la Tesis

Helena Blanca Ordóñez

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:



## Símbolos y abreviaturas

ABC	ATP-binding cassette	pb	Pares de bases
ADN	Ácido desoxirribonucleico	PBS	Solución de tampón fosfato
ADNc	ADN complementario	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADNss	ADN de cadena sencilla	pmol	Picomoles
ADN-T	ADN de transferencia	pp	Páginas
AHLs	Acil homoserina lactonas	pSym	plásmido simbiótico
Ap	Ampicilina	QS	Quórum sensing
ARN	Ácido ribonucleico	Rif	Rifampicina
ATP	Adenosín trifosfato	Rpm	revoluciones por minuto
bv	Biovariedad	RTqPCR	Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR
CFUs	Unidades formadoras de colonia	SDS	Dodecil sulfato sódico
cm	Centímetros	Sm	Sulfato de estreptomina
Ct	Ciclo Umbral	sp	Especie
DMSO	Dimetilsulfóxido	Spc	Sulfato de Espectinomicina
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato	SSC	Solución de citrato sódico
DO	Densidad óptica	TBE	Tampón tris-borato-EDTA
Dtr	Funciones de procesamiento del ADN	Tc	Tetraciclina
eds	editores	TGH	Transferencia genética horizontal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	TMDs	Dominios transmembrana
<i>et al</i>	y colaboradores	Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
EPS	Exopolisacáridos	T4SS	Sistemas de secreción tipo IV
FBN	Fijación biológica de nitrógeno	TY	Medio de Tripsina y extracto de levadura
g	Gramos	V	Voltios
Gm	Gentamicina	VBP	VirD2 Binding Protein
h	horas	Wt	Silvestre
HSL	homoserina lactona	X-gal	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -galactósido
ICES	Elementos integrativos y conjugativos	X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucurónido
Inc	Grupo de incompatibilidad	°C	Grados centígrados
IR	Secuencias repetidas invertidas	Mb	Mega base
IS	secuencias de inserción	mg	Miligramos
Kb	Kilobase	min	Minutos
Km	Kanamicina	ml	Mililitros
KPS	Polisacárido capsular	$\mu$ g	Microgramos
LB	Medio de Luria-Bertani	$\mu$ m	Micrómetros
LPS	Lipopolisacáridos	$\mu$ M	Micromolar
M	Molar	$\beta$ -Gluc	Actividad glucuronidasa
Mm	milímetros		
MM	Medio mínimo		
mM	Milimolar		
Mpf	Formación del par conjugativo		
mRNA	RNA mensajero		
ng	Nanogramo		
nM	Nanomoles		
NTP	Nucleotidil tripfosfato		
ORF	Marco de lectura abierto		
<i>oriT</i>	Origen de Transferencia		



## **ÍNDICE**



## RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

<b>1. <i>Rhizobium</i> EN LA AGRICULTURA SOSTENIBLE</b>	<b>1</b>
<b>2. SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSA</b>	<b>4</b>
2.1. Importancia de la fijación biológica de nitrógeno	4
2.2. Proceso de nodulación	5
<b>3. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL EN BACTERIAS</b>	<b>9</b>
3.1. Transferencia genética mediada por transformación natural	11
3.2. Transferencia genética mediada por transducción	12
3.3. Transferencia genética mediada por conjugación	13
<b>4. MECANISMO DE TRANSFERENCIA CONJUGATIVA</b>	<b>13</b>
4.1. Funciones implicadas en el procesamiento del ADN (Dtr)	15
4.2. Origen de transferencia u <i>oriT</i>	19
4.3. Proteínas acopladoras	19
4.4. Formación del par conjugativo (Mpf)	22
4.5. Establecimiento de la información genética adquirida en la célula receptora	26
<b>5. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN BACTERIAS DE LA FAMILIA</b>	
<i>Rhizobiaceae</i>	<b>28</b>
5.1. Contenido y organización de los genomas de la Familia <i>Rhizobiaceae</i> : Plásmidos e islas simbióticas	28
5.2. Transferencia conjugativa en <i>Rhizobium</i> .	32
5.3. Mecanismos de regulación de la transferencia conjugativa	37
5.3.1. Regulación del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
5.3.1.1. Regulación del sistema de transferencia conjugativa.	38
5.3.2. Regulación de la transferencia conjugativa en <i>Rhizobium</i>	41
5.3.2.1. Sistemas conjugativos regulados por quorum-sensing.	43
5.3.2.2. Sistemas conjugativos regulados por el sistema RctA.	47
<b>OBJETIVOS</b>	<b>53</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS</b>	<b>57</b>
<b>2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>62</b>
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	62
2.2. Medios de cultivo para rizobios	63
2.3. Conservación de cepas bacterianas	64
2.4. Antibióticos	64
<b>3. TRANSFERENCIA DE ADN ENTRE CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>65</b>
3.1. Conjugaciones	65
3.1.1. Conjugaciones biparentales	65
3.1.2. Conjugaciones triparentales	65
3.2. Transducción	65
3.3. Transformación de células competentes	66
3.3.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	66
3.3.1.1. Preparación de células competentes químicamente	66
3.3.1.2. Preparación de células electrocompetentes.	67
3.3.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	67
3.3.2.1. Transformación de células competentes.	67
3.3.2.2. Transformación por electroporación.	68
<b>4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	<b>68</b>
4.1. Preparación de ADN plasmídico	68
4.1.1. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	68
4.1.2. GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich™ inc.)	69
4.2. Preparación de ADN genómico	70
4.2.1. Preparación de ADN genómico mediante protocolo diseñado para rizobios	70
4.2.2. AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad)	71
4.2.3. Obtención de ADN a partir de colonias bacterianas	71
4.3. Aislamiento de ARN total de <i>S. meliloti</i>	71
4.4. Concentración de muestras de ARN total de <i>S. meliloti</i>	72

<b>5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN Y ARN</b>	<b>73</b>
<b>5.1. Método de Sambrook.</b>	73
<b>5.2. Medida de la concentración de ARN y ADN mediante Nanodrop®</b>	73
<b>6. MANIPULACIÓN DEL ADN</b>	<b>74</b>
<b>6.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción</b>	74
<b>6.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa</b>	74
<b>6.2.1. Electroforesis de ADN</b>	74
<b>6.2.2. Revelado de geles y fotografía.</b>	74
<b>6.2.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción</b>	75
<b>6.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa</b>	75
<b>6.3.1. Purificación mediante electroelución</b>	75
<b>6.3.2. Purificación mediante Kit: Qiaex-II® (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA)</b>	76
<b>6.4. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación</b>	76
<b>6.4.1. Reacción de ligación</b>	76
<b>6.4.2. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5'</b>	77
<b>6.4.3. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 3'</b>	77
<b>6.5. Secuenciación y análisis informático.</b>	77
<b>6.5.1. Secuenciación automática de ADN de doble cadena</b>	77
<b>6.5.2. Análisis informático de secuencias de ADN</b>	78
<b>7. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN ADN-ADN</b>	<b>78</b>
<b>7.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon</b>	78
<b>7.2. Marcaje de sondas de ADN no radioactivas</b>	79
<b>7.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radioactiva</b>	80
<b>8. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	<b>80</b>
<b>8.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de</b>	

la polimerasa (PCR)	80
8.2. Amplificación de fragmentos de ADN de gran tamaño	82
8.3. Mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante	83
<b>9. EXPERIMENTOS DE TRANSCRIPTÓMICA CON MICROARRAYS</b>	<b>84</b>
9.1. Reversotranscripción de ARN	84
9.2. Hidrólisis del ARN	84
9.3. Marcaje del ADNc	85
9.4. Procesamiento del microarray previo a la hibridación	86
9.5. Hibridación de los Sma6kOligo microarrays usando un cubreobjetos y una cámara de hibridación	86
9.6. Procesamiento del microarray tras la hibridación	87
9.7. Adquisición de la imagen y tratamiento de datos	87
<b>10. RT-qPCR (REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE REAL-TIME PCR)</b>	<b>88</b>
10.1. Síntesis de cDNA para RT-qPCR.	88
10.2. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa. RT-qPCR.	88
<b>11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD <math>\beta</math>-GLUCURONIDASA</b>	<b>90</b>
11.1. Actividad $\beta$ -glucuronidasa	90
11.2. Determinación de proteína (reactivo de Biorad®)	91
 <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	
 <b>CAPÍTULO I. MOVILIZACIÓN DEPENDIENTE DE pSymA DEL MEGAPLÁSMIDO pSymB DE <i>Sinorhizobium meliloti</i>.</b>	
Resumen	97
1.1. Genes conjugativos de pSymA y pSymB de <i>S. meliloti</i> 1021	98
1.2. Caracterización de los genes <i>traA1</i> y <i>traA2</i>	101
1.3. Transferencia conjugativa del pSymB de <i>S. meliloti</i> 1021	102
1.3.1. Verificación de la transferencia conjugativa de los pSyms de <i>S. meliloti</i> 1021	105

1.3.2. Transferencia de los pSyms de <i>S. meliloti</i> por la maquinaria VirB presente en pSymA	107
1.4. Evaluación de la preferencia en <i>cis</i> de las relaxasas TraA1 y TraA2 por sus respectivos <i>oriTs</i>	108
1.5. Importancia de homólogos a genes VBP de <i>A. tumefaciens</i> para la Transferencia conjugativa de pSyms de <i>S. meliloti</i> 1021	110
1.6. Discusión	115
 ANEXO CAPÍTULO I	 123
 CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ELEMENTOS REGULADORES DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS DE <i>S. meliloti</i> .	
 Resumen	 133
2.1. Identificación del ortólogo del gen <i>rctB</i> de <i>R. etli</i> en el genoma de <i>S. meliloti</i> 1021	134
2.1.1. La sobreexpresión de <i>SMA0974</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 promueve la transferencia conjugativa del pSymA	134
2.1.2. La sobreexpresión de <i>SMA0974</i> provoca un aumento de la transcripción de los genes implicados en la transferencia del pSymA de <i>S. meliloti</i> 1021	136
2.1.3. Análisis del transcriptoma de un mutante RctA <sup>-</sup> de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	137
2.1.4. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>SmrctB</i> sobre el transcriptoma de <i>S. meliloti</i> 1021	139
2.1.5. Estudio del gen <i>SMA0941</i>	140
2.1.6. Estudio del gen <i>SMA0907</i>	143
2.2. Identificación y estudio del gen <i>rctR</i> ( <i>SMA0955</i> ), un regulador transcripcional implicado en la transferencia del pSymA de <i>S. meliloti</i>	145
2.2.1. Identificación de <i>SMA0955</i>	146
2.2.2. Caracterización funcional del gen <i>SMA0955</i> de <i>S. meliloti</i>	148
2.2.2.1. Construcción de mutantes <i>SMA0955</i> mediante mutagénesis dirigida.	148
2.2.2.2. Complementación genética del mutante 1021RctR <sup>-</sup> .	149

2.2.3. Análisis del transcriptoma del mutante 1021RctR <sup>-</sup>	150
2.2.3.1. Fenotipo conjugativo de un mutante doble en <i>rctR</i> y <i>rctB</i>	152
2.2.4. Estudio de los genes <i>SMa0950</i> , <i>SMa0951</i> , <i>SMa0952</i> y <i>SMa0953</i>	154
2.2.5. Estudio de los genes <i>SMa0956</i> , <i>SMa0958</i> y <i>SMa0959</i>	156
2.2.6. Estudio del gen <i>SMa0961</i>	160
2.3. Discusión	164
ANEXO CAPÍTULO II	173
CONCLUSIONES	195
BIBLIOGRAFÍA	199

## RESUMEN

*Sinorhizobium meliloti* 1021 posee dos megaplásmidos, pSymA de 1,354 Kb y pSymB de 1,683 Kb, que contienen genes esenciales para el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno con alfalfa y otras especies de leguminosas, así como para la supervivencia de la bacteria en la rizosfera. Pérez-Mendoza y colaboradores (2005) mostraron que el pSymA es autotransmisible aunque sus funciones conjugativas están normalmente inhibidas, bajo control del represor transcripcional RctA. Se desconocen tanto las condiciones como los elementos genéticos que intervienen en la desrepresión de la actividad conjugativa de este plásmido. Además, nunca antes se ha demostrado si el pSymB es o no susceptible de transferencia por conjugación.

En este trabajo se muestra por primera vez la transferencia conjugativa de pSymB como un evento de movilización en *trans* que requiere el sistema de secreción tipo IV codificado por pSymA. pSymB posee un *oriT* funcional así como un gen *traA2*, que codifica para una probable relaxasa, el cual es también transcripcionalmente reprimido por *rctA*. Ambos megaplásmidos simbióticos parecen requerir la presencia de los genes codificantes para las correspondientes relaxasas en *cis* con sus respectivos *oriTs* para alcanzar máximas frecuencias de transferencia conjugativa.

Por otro lado, en esta tesis se ha llevado a cabo la identificación y caracterización parcial de nuevos elementos reguladores en la cascada de transducción de señales implicados en la regulación de la conjugación de pSymA de *S. meliloti*. Se ha identificado el gen *SMa0974* (*SmrctB*) como un ortólogo del gen *rctB* de *Rhizobium etli*, el cual antagoniza la represión ejercida por RctA. Además, se ha encontrado que en *S. meliloti* existen dos genes adicionales, *rctR* y *rctC*, que participan en el control de la expresión de *SmrctB*. *rctR* (*SMa0955*) codifica para una proteína con homología a reguladores transcripcionales de la familia GntR, la cual está implicada en la represión de *SmrctB*. Un mutante *rctR* promueve la transferencia conjugativa de pSymA y muestra un incremento en la expresión de los genes *tra*, *virB* y *SmrctB*, incluso en presencia de un gen represor *rctA* intacto. Entre los genes reprimidos por *rctR*, *rctC* (*SMa0961*) codifica para una proteína con homología a reguladores de respuesta, requerida para activar la transcripción de *SmrctB* y, por consiguiente, para la desrepresión de las funciones conjugativas. Aunque los plásmidos simbióticos de *R. etli* y *S. meliloti* contienen una pareja represor-antirrepresor *rctA-rctB* de cuya actividad depende la expresión de la capacidad conjugativa de dichos plásmidos, el genoma de *R. etli* no contiene

homólogos de los genes *rctR* y *rctC* identificados en *S. meliloti*. En este trabajo se concluye que la transferencia conjugativa de los pSyms de *S. meliloti* y *R. etli*, que se encuentra normalmente reprimida por RctA, se desreprime en ambos casos por un mecanismo similar, vía *rctB*; sin embargo, la cascada regulatoria que conduce a la activación de *rctB* es probablemente diferente en ambas especies bacterianas.

# **INTRODUCCIÓN**



## **1. RHIZOBIUM EN LA AGRICULTURA SOSTENIBLE**

El suelo es un factor crítico para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres y un recurso clave para el éxito de la agricultura. Como consecuencia del deterioro de la estructura y composición del suelo, así como de la diversidad de microorganismos que lo habitan, debido a la agricultura intensiva y el uso de fertilizantes y otros agroquímicos, surgen nuevas formas de agricultura menos perjudiciales (Kennedy y Smith, 1995), englobadas en el concepto de agricultura sostenible, que implica el manejo de los recursos para la agricultura a fin de que satisfaga las necesidades de la población mientras que se mantiene o se mejora la calidad del ambiente y los recursos naturales (Altieri, 1994).

El concepto de agricultura sostenible es muy dinámico, reconoce las necesidades futuras de producción al tiempo que se preserva la calidad del ambiente, incluida la calidad productiva de los recursos de agua y suelo. Así, mientras que el objetivo a largo plazo es el mantenimiento de los beneficios de la explotación, el objetivo a corto plazo busca reconocer los problemas que deben resolverse, como el uso inadecuado del suelo y su erosión acelerada, la disminución de su fertilidad y una caída en el contenido de la materia orgánica del mismo, la contaminación de los recursos hídricos y un uso excesivo de los recursos naturales no renovables (Kennedy y Smith, 1995). Para el éxito de una agricultura sostenible es fundamental una buena planificación, así como un control adecuado de todos los procesos que intervienen en la actividad agrícola.

Para llevar a cabo estas mejoras en el modelo de desarrollo agrícola, es necesario un estudio del suelo como sistema complejo que es. El suelo alberga gran riqueza de microorganismos, los cuales establecen relaciones muy variadas y contribuyen a conformar las características propias del suelo, participan en los ciclos del carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros elementos, y aportan a la fertilidad del suelo y a la degradación de compuestos xenobióticos. Además, el crecimiento de las plantas está condicionado por una amplia gama de microorganismos que habitan el suelo, en particular alrededor de la rizosfera de los vegetales (Bowen y Rovira, 1999). Dentro del amplio grupo de microorganismos beneficiosos, denominados PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Kloepper y Schroth, 1978), tanto para los cultivos agrícolas como forestales, se pueden diferenciar 2 grupos principales: los que facilitan la captación de nutrientes por la planta (Bashan y Levany, 1991), los cuales pueden ser a su vez bacterias u hongos, de vida libre o

simbióticos (García de Salamone *et al.*, 2001; Glick, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003), y los que protegen a la planta o evitan el ataque de patógenos.

Actualmente la agricultura sostenible intenta reducir el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas en general, mediante una mayor sensibilización de la sociedad sobre el potencial riesgo del empleo indiscriminado de los mismos. Esto ha abierto nuevas perspectivas en el empleo de productos biológicos para el manejo agrícola integrado, sobre todo en la protección de cultivos (biocontrol) y como fertilizantes “amigos” del medioambiente (biofertilizantes) (Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Glick, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Por tanto, se está estudiando el empleo de microorganismos en la mejora de la agricultura, aunando para ello técnicas de microbiología tradicional con metodologías moleculares, incluyendo los avances en las metodologías genómicas, que contribuirán a mejorar el conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo con el consiguiente potencial de aplicación biotecnológica. Como se ha mencionado anteriormente, en el contexto de la agricultura sostenible es particularmente atractiva la inoculación de plantas con microorganismos que protejan de enfermedades o disminuyan la dependencia de fertilizantes químicos (Smith y Goodman, 1999; Weller *et al.*, 2002). El uso de inoculantes microbianos para mejorar la nutrición de los cultivos, el control biológico de enfermedades o la biorremediación de suelos contaminados, constituyen tecnologías de gran interés por su impacto positivo sobre la sustentabilidad agrícola y su carácter respetuoso con el medio ambiente (Deaker *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso masivo de tales inoculantes ha despertado serias preocupaciones sobre el posible impacto ecológico de su liberación al medio ambiente, en especial en aquellos casos de manipulación genética del microorganismo. La liberación de microorganismos al medio ambiente, como cualquier tecnología, no está exenta de riesgos potenciales, como podría ser el impacto que su aplicación puede tener sobre las comunidades microbianas nativas. La evaluación de dicho impacto es muchas veces difícil debido a limitaciones de tipo técnico, así como la dificultad para determinar si la alteración de algún parámetro medioambiental como consecuencia del uso de inoculantes microbianos puede afectar de forma negativa al equilibrio de los ecosistemas del suelo. Es de reseñar el posible riesgo que supone la transferencia genética horizontal entre los inoculantes y las poblaciones nativas del suelo. La transferencia genética horizontal entre microorganismos es un fenómeno bien reconocido como generador de biodiversidad en cualquier ecosistema, aunque en el caso de productos biotecnológicos sus efectos no han sido bien estudiados (Smets y Barkay, 2005).

A diferencia de la transferencia lateral de resistencias a antibióticos entre bacterias de importancia clínica, que es un fenómeno de conocido impacto sobre la eficacia de ciertas terapias, la posibilidad de transferencia genética entre los inoculantes y las poblaciones microbianas nativas es un fenómeno poco explorado que plantea gran incertidumbre en relación a su potencial impacto sobre la biodiversidad existente, sobre la fertilidad de los suelos o incluso sobre la eficacia a largo plazo de los propios inoculantes (Sorensen *et al.*, 2005).

Sin embargo, experimentos realizados por distintos laboratorios no han puesto de manifiesto variaciones en la biodiversidad a corto plazo, aún reconociendo que es un proceso difícilmente evaluable en el tiempo de duración de un proyecto de investigación. Es importante conocer cambios cualitativos y cuantitativos en las poblaciones microbianas como consecuencia de la introducción de nuevas poblaciones (inoculantes) en los ecosistemas concretos, que de alguna forma nos ayuden a predecir las posibles consecuencias positivas, negativas o neutras que las futuras prácticas agrícolas pueden tener en el equilibrio de los ecosistemas actuales (Lupwayi *et al.*, 2000).

Los inoculantes para leguminosas, basados en bacterias del tipo *Rhizobium*, proporcionan a estos cultivos el nitrógeno necesario para su nutrición y desarrollo, y se aplican comercialmente desde hace más de un siglo sin que se haya descrito ningún tipo de impacto negativo (Castro-Sowinski *et al.*, 2007). La presencia de plásmidos de elevado peso molecular es un hecho generalizado en bacterias pertenecientes a la familia de las Rhizobiaceas, y que se consideran como eficientes vehículos de transferencia de genes desde inoculantes de *Rhizobium* hasta poblaciones nativas del suelo (Sanjuan *et al.*, 2000). También es cierto que pocos estudios han valorado las posibilidades de transferencia genética desde los inoculantes. El descubrimiento de que en condiciones naturales la información simbiótica es transferible hacia los rizobios del suelo que carecen de la misma (denominados no simbióticos), ha marcado un antes y un después en el entendimiento de la ecología evolutiva de los rizobios (Johnston *et al.*, 1978; Brewin *et al.*, 1980; Hooykaas *et al.*, 1981; Lamb *et al.*, 1982; Sullivan *et al.*, 1995). Se han obtenido datos de cepas no simbióticas de *Rhizobium* aisladas del suelo, que obtuvieron la capacidad simbiótica tras adquirir un plásmido o una isla simbiótica donado por rizobios inoculantes, mediante procesos conjugativos. Entre otras consecuencias, la dispersión de estos elementos conjugativos puede provocar que los nuevos simbioses pasen a ser competidores del inoculante para establecer una simbiosis con la planta

hospedadora, lo que en determinadas situaciones conllevaría una reducción de la eficacia tecnológica de la inoculación. La adquisición de esta nueva capacidad determina un cambio drástico en los hábitos de vida de las bacterias, al poder colonizar un nuevo nicho ecológico tan exclusivo como son los nódulos de las leguminosas. Todo esto, unido al cada vez más amplio abanico de microorganismos, bacterias y hongos, que se emplean como inoculantes para todo tipo de especies vegetales, genera una gran inquietud sobre el potencial impacto ecológico de su aplicación (Sanjuan *et al.*, 2000).

En cualquier caso, puesto que no es posible determinar el posible impacto de la liberación de microorganismos en todos los ambientes, parece más razonable diseñar sistemas de contención de este fenómeno, que impidan o al menos minimicen las posibilidades de transferencia genética (Chen *et al.*, 2005). Por tanto, la determinación de las condiciones óptimas en que ocurre la transferencia genética en el suelo es un paso previo al diseño de sistemas de contención de dicho fenómeno. El desconocimiento de los factores y situaciones ambientales que favorecen los procesos de transferencia genética horizontal es todavía hoy la parte más oscura e inexplorada de este fenómeno.

## **2. SIMBIOSIS *RHIZOBIUM* – LEGUMINOSA**

### **2.1. Importancia de la fijación biológica de nitrógeno**

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa y constituye, después del agua, el principal limitante de la producción agrícola. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico se halla en forma de gas o dinitrógeno ( $N_2$ ) que la mayoría de los seres vivos no pueden utilizar directamente. La forma nitrogenada utilizada comúnmente por las plantas y por casi todos los microorganismos es el nitrógeno combinado inorgánico.

La conversión del nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) a formas reducidas tales como el amonio, es un proceso vital dentro de la biosfera. La fijación biológica del nitrógeno constituye la mayor entrada de nitrógeno en forma reducida en los sistemas biológicos naturales. La diazotrofia (la capacidad de fijar  $N_2$ ) es una propiedad restringida al mundo procariota, eubacterias y archaeas (Widmer *et al.*, 1999; Zehr *et al.*, 2003). Los microorganismos de vida libre llevan a

cabo la fijación de nitrógeno para abastecer sus propias necesidades en ambientes donde son limitantes otras fuentes nitrogenadas. Sin embargo, los microorganismos diazotrofos simbióticos, aunque son capaces de desarrollarse en vida libre, suelen fijar nitrógeno sólo tras el establecimiento de interacciones mutualistas con plantas, como las de la familia *Fabaceae* (Martínez-Romero, 2000). Este proceso simbiótico se produce principalmente con miembros de algunas familias del orden Rhizobiales, perteneciente a las  $\alpha$ -Proteobacterias, y unos pocos géneros de  $\beta$ -Proteobacterias. Por esta razón, la interacción Rizobio-leguminosa tiene una enorme importancia agronómica y ecológica.

Una característica importante de la interacción de los miembros del orden *Rhizobiales* con las leguminosas suelen ser el elevado grado de especificidad, de tal modo que generalmente cada rizobio es capaz de interaccionar con una o pocas especies vegetales relacionadas filogenéticamente. Sin embargo, en ciertas ocasiones no existe un grado de especificidad tan marcado; así la planta de judía (*Phaseolus vulgaris*) establece simbiosis con múltiples especies de rizobios diferentes. A su vez, *Rhizobium* sp. NGR234 lleva a cabo interacciones exitosas con más de 100 géneros de leguminosas diferentes (Romero y Brom, 2004).

## 2.2. Proceso de nodulación

El establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno entre plantas leguminosas y rizobios es el resultado de un continuo y adecuado intercambio de señales entre planta y bacteria (Broughton *et al.*, 2000) que culmina con la formación del nódulo fijador. Se conocen al menos tres grupos de señales que son intercambiadas entre planta y bacteria durante el establecimiento simbiótico. Por un lado, los flavonoides exudados por la planta activan la expresión de un grupo de genes bacterianos, los genes de la nodulación (*nod*, *nol*, *noe*) que son los encargados de la biosíntesis de los denominados factores Nod (Lorkiewicz, 1997; Van de Sande y Bisseling, 1997; Broughton y Perret, 1999). La composición de los exudados radicales es diversa y compleja, y varía según la especie de planta, su estado fisiológico, la disponibilidad de nutrientes e incluso del tipo de microorganismos presentes (Saeki, 2011). Los genes *nod* codifican aproximadamente 25 proteínas para la síntesis y exportación del factor Nod, que constituyen el segundo grupo de señales, en este caso producidas por la bacteria. El factor Nod es una molécula señal de tipo lipo-quitina-oligosacárido que consiste en un esqueleto de entre tres y seis unidades de N-acetil glucosamina (oligoquitina) en el que la

glucosamina del extremo no reductor está esterificada con un ácido graso. Esta estructura básica presenta una serie de modificaciones de distinta naturaleza que varían entre los diferentes rizobios, consistente en la existencia de sustituyentes en el citoesqueleto oligosacárido así como variaciones en la longitud y el grado de insaturación del ácido graso. Cada especie o estirpe bacteriana produce generalmente varios tipos de factores Nod, que son reconocidos específicamente por los hospedadores compatibles de dicha bacteria. De esta forma, la producción de factores Nod por la bacteria resulta ser el mayor determinante de la especificidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, definiendo el rango de hospedadores susceptibles de ser infectados por una cierta estirpe o especie de rizobio (Perret *et al.*, 2000). El factor Nod induce en la raíz vegetal una serie de respuestas dirigidas a la formación del nódulo y a facilitar su infección por la bacteria (Bladergroen y Spaink, 1998; Schultze y Kondorosi, 1998; Debelle *et al.*, 2001, Jones *et al.*, 2007).

Un tercer grupo de señales son los polisacáridos de superficie de la bacteria, necesarios para el desarrollo adecuado de los canales de infección por los que las bacterias alcanzan el córtex nodular, en donde serán endocitadas por las células vegetales. Además de lo indicado anteriormente, también influye en el establecimiento de la simbiosis el denominado polisacárido capsular (o antígeno K). Este polisacárido solo se ha encontrado en *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii* y *Rhizobium* sp. NGR234 (Margaret *et al.*, 2010). *S. meliloti* tiene la capacidad de producir varios polisacáridos de superficie, incluidos el lipopolisacárido (LPS), el polisacárido capsular (KPS), dos exopolisacáridos (EPS I y EPS II) y glucanos cíclicos (Pellock *et al.*, 2000; Sharypova *et al.*, 2006).

Una de las primeras fases del reconocimiento entre la bacteria y la leguminosa es la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta. Una vez que los rizobios se han adherido a los pelos radicales, se induce un cambio en la dirección del crecimiento apical. En las leguminosas típicas, los rizobios penetran a través de la pared celular del pelo radical, quedando envueltos en una estructura tubular, conocida como cordón de infección, que progresa hacia la base del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz polisacáridica de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal. Simultáneamente, y en respuesta a los factores Nod, ciertas células del córtex en posición opuesta a los polos del protoxilema entran de nuevo en el ciclo celular y se dividen proliferando activamente y originando el primordio nodular (revisado por Gage, 2004). El crecimiento de los cordones de infección transporta los rizobios hasta las células del primordio nodular. Allí, los cordones de

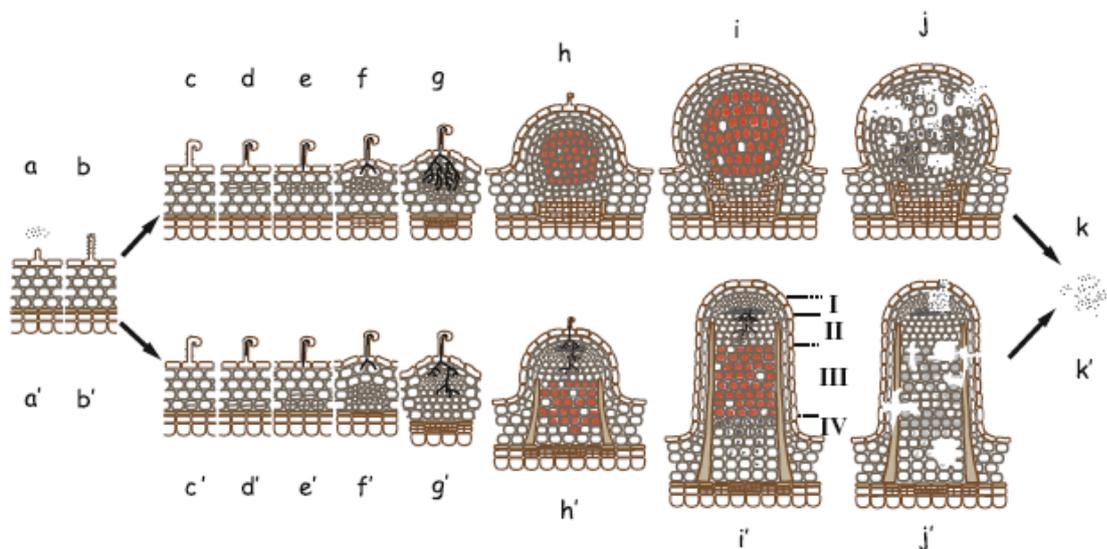
infección se ramifican y, mientras continúa el desarrollo del nódulo, se produce la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células vegetales. Las bacterias endocitadas no entran en contacto directo con el citoplasma vegetal sino que son rodeadas por una membrana vegetal, conformándose así la unidad simbiótica mínima, el simbiosoma. Esta estructura básica, constituida por un microorganismo rodeado de una membrana que lo separa de la célula hospedadora, no es única de esta simbiosis sino que está conservada estructuralmente en muchas otras endosimbiosis (Roth *et al.*, 1988). Desde que *Rhizobium* es endocitado hasta que se activa el proceso de fijación de nitrógeno ocurren una serie de cambios morfológicos y metabólicos en ambos simbiosomas, seguramente como resultado del intercambio de nuevos grupos de señales todavía desconocidas. En el caso de las bacterias, éstas deben diferenciarse en los llamados bacteroides, caracterizados por un tamaño, morfología y sobre todo un metabolismo diferentes a los de las bacterias en vida libre. En el bacteroide se expresan otros genes simbióticos que codifican para las proteínas necesarias para la reducción del dinitrógeno por la enzima nitrogenasa (genes *nif* y *fix*) (Fisher, 1994). Los bacteroides proporcionan a la planta una forma de nitrógeno asimilable, y a cambio reciben de ésta un fotosintetizado utilizable por el bacteroide como fuente de carbono. Por otro lado, el correcto funcionamiento del proceso simbiótico garantiza a la planta una independencia de otras fuentes de nitrógeno exógenas, mientras el rizobio encuentra un nicho exclusivo donde multiplicarse (para aspectos ecológicos más concretos ver Bever y Simms, 2000; Denison, 2000; Simms y Bever, 1998; Timmers *et al.*, 2000).

La diferenciación a bacteroide suele estar acompañada de un aumento del volumen de la bacteria, así como de un cambio de su morfología de bacilo corto a formas más o menos distorsionadas, dependiendo del tipo de nódulo (ver Figura INT1). Además, en nódulos indeterminados ocurre un proceso de endoreduplicación del ADN, esto es, duplicación del ADN en ausencia de división celular. La endopoliploidía, que es característica de distintos órganos de algunas especies, sugiere que esta multiplicación del genoma debe contribuir a la diferenciación de algunos tipos celulares. La relación directa entre el contenido de ADN y el tamaño celular en tejidos endoreduplicativos indica que este aumento de tamaño se necesita para la formación de largas células en la planta (Kondorosi *et al.*, 2000).

Los nódulos inducidos por los rizobios se clasifican generalmente en determinados e indeterminados (Figura INT1). Los nódulos determinados se originan a partir de división de células del córtex externo. Las divisiones celulares en la región central del nódulo cesan

pronto y el aumento del tamaño nodular se produce por aumento del tamaño de las células ya existentes, lo que determina su forma esférica. La diferenciación de las células infectadas tiene lugar de modo sincrónico y el nódulo maduro contiene células simbióticas con una población homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno (Nokav *et al.*, 2011).

Los nódulos de tipo indeterminado se originan a partir de divisiones de células del córtex interno y son alargados, ya que el meristemo es persistente y continuamente da lugar a nuevas células que subsecuentemente son infectadas por los rizobios que residen en el nódulo (Margaret *et al.*, 2011). Puesto que el tamaño del meristemo es constante, la actividad de división celular y la producción de nuevas células meristemáticas se encuentra equilibrada con la salida del mismo número de células del ciclo mitótico. Este proceso provoca un gradiente de etapas de desarrollo en el nódulo, desde el meristemo en el extremo apical hasta el tejido senescente cercano a la raíz (Godiard *et al.*, 2011).



**Figura INT1. Proceso de desarrollo y descomposición del nódulo.** Se muestran el proceso para nódulos determinados (arriba) e indeterminados (abajo). Los *Rhizobium* saprofitos existen en la rizosfera (a). El *Rhizobium* se adhiere a los pelos de la raíz (b), detecta los flavonoides de las legumbres y secretan factores Nod para inducir la deformación del pelo radicular (c). El pelo radicular deformado recoge al *Rhizobium*, formando canales de infección, que contienen las células de *Rhizobium* atrapadas (d). Se elonga el canal de infección (e), se ramifica y penetra en las capas de células de la corteza exterior o interior (f, g). Las células rizobiales son entonces envueltas en una membrana derivada de la planta y lanzadas como gotas en el citoplasma de las células vegetales (h). Los rizobios se diferencian a bacteroides y comienza la fijación de nitrógeno (i). Después de un período de fijación de nitrógeno, las células del nódulo inician la senescencia (j). La mayoría de los bacteroides en nódulos determinados y algunas células de rizobios indiferenciadas en nódulos indeterminados volverán a un estilo de vida saprofito (k). Se indican las zonas del nódulo indeterminado maduro, I: Zona meristemática; II: Zona de invasión; III: Zona de fijación de  $N_2$ ; IV: Zona de senescencia. Extraído de Saeki (2011).

Los nódulos de leguminosas son el resultado de una coevolución (Thompson, 1994, 2005) de las plantas y rizobios ancestrales (Doyle, 1998). Entre los procesos evolutivos que produjeron la divergencia de las leguminosas, se debe tener en cuenta la coevolución con los rizobios. Alternativamente, las bacterias podrían haber sido escogidas constantemente por las plantas, con una pequeña influencia de la bacteria en la evolución de la planta (necesaria para cumplir con los requisitos de la coevolución). Las evidencias de los efectos de las bacterias en la evolución de la planta son todavía escasas. La plasticidad genética puede ser indicativa de la gran capacidad de *Rhizobium* para adaptarse a las leguminosas.

### 3. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL EN BACTERIAS

Estudios recientes sobre las funciones de las bacterias y de su metabolismo en los ciclos biogeoquímicos, ponen de manifiesto la importancia de los mismos en sostener la vida en la Tierra. La mayoría de los procesos fundamentales de la vida fueron “inventados” durante los primeros dos billones de años en la Tierra, previo a la aparición del primer eucariota. Este éxito es especialmente sorprendente en el caso de las bacterias, considerando que carecen de reproducción sexual, el mejor mecanismo para la innovación genética. La transferencia genética horizontal es un proceso que puede compensar la ausencia de variabilidad genética por reproducción sexual en la vida procariota, y afecta a la adaptación microbiana, la especialización y la evolución (Smets y Barkay, 2005).

La transferencia horizontal o lateral de genes (TGH) es el movimiento de genes entre individuos de la misma o diferente especie en una misma generación. Aunque es común entre las bacterias, tradicionalmente se ha considerado como un evento extraordinario entre bacterias y eucariotas. Pero esta idea ha cambiado, y en la actualidad la TGH es considerada por muchos un catalizador evolutivo de primera magnitud. Esta capacidad de gran número de organismos de intercambiar material genético con otras especies, es un fenómeno que se conoce desde hace mucho tiempo. Los estudios experimentales de procesos de transferencia genética horizontal proporcionan evidencias suficientes de transferencia entre bacterias de la misma o diferente especie, e incluso entre bacterias y eucariotas (DeFlaun y Levy, 1989;

Heinemann, 1991; Mazodier y Davies, 1991; Heinemann y Sprague, 1989), de tal modo que la gran mayoría de los genes, si no todos, están sujetos a transmisión entre especies.

El ejemplo más común es el intercambio genético entre distintos grupos bacterianos. Una fracción significativa de la diversidad bacteriana existente se debe, en mayor o menor medida, a la adquisición de ADN de otras bacterias alejadas filogenéticamente. Los genomas bacterianos pueden ser extraordinariamente heterogéneos y dinámicos, en los que cantidades importantes de ADN son incorporadas o eliminadas, lo que se denomina la fracción accesoria del genoma. Las transferencias laterales han cambiado, por tanto, la ecología de las especies bacterianas, promoviendo su diversificación y especiación. Por medio de la transferencia horizontal de genes, las bacterias son capaces de adquirir resistencia a diferentes antibióticos, capacidades virulentas y diferentes propiedades metabólicas que les permiten explorar nuevos hábitats.

Este proceso de transferencia genética horizontal se lleva a cabo mediante elementos genéticos móviles que pueden ser intercambiados promiscuamente entre un amplio espectro de bacterias y contribuye a la plasticidad genómica bacteriana. Los elementos genéticos móviles incluyen secuencias de inserción, transposones, integrones, bacteriófagos, islas genómicas (como islas de patogenicidad), plásmidos y combinaciones de esos elementos. Los plásmidos son uno de los elementos genéticos móviles más importantes, ya que tienen una influencia en la adaptación de las bacterias a diferentes ambientes. Los plásmidos se encuentran en todas las comunidades bacterianas estudiadas hasta la fecha, incluidas bacterias del suelo, bacterias marinas y bacterias pertenecientes a ambientes clínicos. Sin embargo, están secuenciados un número relativamente bajo de plásmidos.

La TGH entre bacterias ha despertado una gran atención a consecuencia del debate suscitado sobre los riesgos potenciales que puede suponer la liberación accidental o deliberada de organismos modificados genéticamente. De hecho, en ciertos hábitats se encuentran condiciones altamente favorables para la transferencia. Sin embargo, los estudios que se han realizado hasta el momento indican que la transferencia horizontal desde organismos modificados genéticamente hasta poblaciones nativas es prácticamente indetectable (Sorensen *et al.*, 2005).

Existen tres procesos principales por los que puede tener lugar la transferencia genética horizontal: transformación, transducción y conjugación.

### 3.1. Transferencia genética mediada por transformación natural

La transformación genética natural se refiere a la captura de ADN extracelular libre por una célula y su incorporación estable al genoma bacteriano. La competencia de una bacteria para su transformación parece estar regulada por ciertas condiciones medioambientales. Factores como un descenso de la temperatura por debajo del punto de congelación del agua, la presencia de soluciones de electrolitos, lisozimas o enzimas proteolíticas, favorecen la expresión de la capacidad de transformación bacteriana, también llamada competencia. Estas son situaciones que probablemente se puedan encontrar en ambientes acuáticos y terrestres y han sido utilizadas para desarrollar métodos que permiten la transformación artificial o *in vitro*.

De los tres mecanismos principales, la transformación puede ser considerada el único proceso procariótico no relacionado con elementos genéticos externos, ya que los genes responsables de este proceso se localizan en el cromosoma bacteriano (Dubnau, 1991; Hahn *et al.*, 1987). Se conocen aproximadamente 90 especies bacterianas transformables, pero no se conocen todos los aspectos relacionados con la competencia de estas especies para captar ADN del medio natural. Los pasos para llevar a cabo el proceso de transformación son los siguientes: una inducción de la competencia, la unión del ADN, la fragmentación de ese ADN, la captación del ADN y el mantenimiento estable del ADN adquirido por recombinación con algún replicón genómico o por recircularización y autorreplicación del ADN entrante. Las maquinarias para la captación de ADN son similares en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas e incluyen componentes del pili tipo IV y sistemas de secreción de proteínas de tipo II (Sorensen *et al.*, 2005; Chen y Dubnau, 2004). Se sabe que en un cultivo en medio líquido, el estado de competencia es dependiente de la fase de crecimiento en la mayoría de los organismos estudiados. Por el contrario, células de biofilms de *Acinetobacter* spp. son continuamente competentes (Doughari *et al.*, 2011), y algunas bacterias son siempre capaces de captar ADN, como es el caso de *Thermus thermophilus* y *Helicobacter pylori* (Averhoff, 2009; Chen y Dubnau, 2004; Thomas y Nielsen, 2005; Sorensen *et al.*, 2005). Algunas bacterias reconocen un ADN similar al suyo por unas etiquetas en secuencias nucleotídicas específicas que están muy representadas en su propio ADN genómico. Sin embargo, bacterias como *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Acinetobacter* spp. captan ADN de especies no relacionadas con ellas mismas.

A diferencia de la transferencia genética por transducción o por conjugación, la mediada por transformación natural no requiere la presencia de un donador vivo. De hecho, durante la lisis o muerte celular se libera ADN suficiente para el proceso. Tampoco es necesaria una relación genética entre el donador y el receptor para la transformación, aunque se requiere un estado fisiológico activo del receptor para la captura del ADN.

### **3.2. Transferencia genética mediada por transducción**

La transducción genética es la transferencia intercelular de material genético no viral por medio de una partícula vírica. Se pueden distinguir dos tipos de transducción (Masters, 1996; Weisberg, 1996): especializada y generalizada. En el primer caso, sólo determinados genes del hospedador son transducidos (aquellos cercanos al sitio de inserción del fago) e incorporados de forma estable al genoma vírico, de tal modo que estos genes son empaquetados y replicados como si fuesen propios. En el segundo, no hay limitaciones para el tipo de genes que se pueden transducir.

La transferencia genética por transducción requiere un donador metabólicamente activo en el cual se producen las partículas del fago durante la reproducción viral. En este caso, el receptor puede estar espacial y temporalmente separado del donador ya que la información genética en la partícula transductora persiste. Sin embargo, el receptor debe estar relacionado con el donador por una sensibilidad común al bacteriófago (Lorenz y Wackernagel, 1994). Los fagos se adsorben a sitios específicos en la superficie de la célula bacteriana. Tras una primera etapa de asociación reversible, la unión se estabiliza y se hace irreversible. En este momento, el ácido nucleico del fago se transloca a través de la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana interna hasta alcanzar el citoplasma.

La transducción es un proceso específico de TGH, ya que los bacteriófagos tienen un rango limitado de hospedador. A pesar de ello, los bacteriófagos son vehículos importantes para la transferencia de genes, debido a su gran abundancia y a la habilidad que tienen de insertarse ellos mismos dentro de los cromosomas como profagos sin causar la lisis celular, alterando así el contenido genético de los hospedadores.

### 3.3. Transferencia genética mediada por conjugación

La conjugación bacteriana es un proceso especializado de transferencia unidireccional de ADN desde un donador a una célula receptora por un mecanismo que requiere un contacto específico. El proceso suele estar codificado por un plásmido o transposón conjugativo y supone una de las rutas de transferencia genética horizontal más comunes. A continuación pasaremos a detallar las características principales de la transferencia conjugativa.

## 4. MECANISMO DE TRANSFERENCIA CONJUGATIVA

El mecanismo molecular de la transferencia conjugativa de ADN se ha estudiado extensamente, especialmente en bacterias Gram-negativas. Aunque muchos sistemas conjugativos de Gram-positivas son similares en organización y funcionamiento a los de Gram-negativas, existen muchos otros cuya funcionalidad nada tiene que ver con estos (revisado por Grohmann *et al.*, 2003). No obstante, en este apartado se describen los elementos identificados en sistemas conjugativos principalmente de bacterias Gram-negativas.

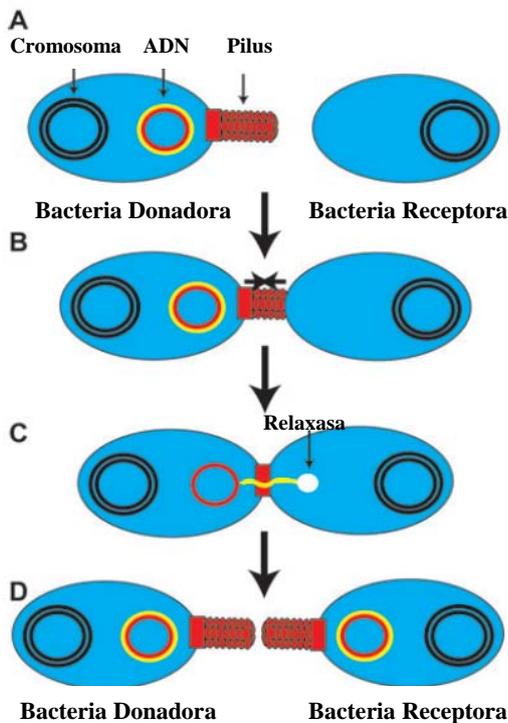
La molécula de ADN que va a ser transferida (usualmente un plásmido que codifica su propio aparato de transferencia) debe portar un origen de transferencia u *oriT* (una corta pero específica secuencia de ADN donde comienza y finaliza el proceso de transferencia conjugativa). El resto de la maquinaria consiste en no menos de 15 proteínas que se encargan de diferentes funciones, incluyendo el procesamiento del ADN y el transporte activo hacia la célula receptora. La maquinaria conjugativa puede ser dividida en tres módulos:

A).- Un complejo nucleoproteico (también llamado relaxosoma) formado por un *oriT*, una relaxasa y una o más proteínas de unión accesorias. La proteína relaxasa se va a unir específicamente al *oriT* en la cadena de ADN que va a ser transferida, permaneciendo covalentemente unida a ella. Las relaxasas conjugativas son proteínas de inicio de la replicación por círculo rodante, y sus secuencias diana en el *oriT* se relacionan con las secuencias *oriV* de inicio de la replicación del ADN (Waters *et al.* 1993). El relaxosoma es muy específico para cada sistema plasmídico.

B) El conducto transmembrana es un complejo multiproteico formado por 10 proteínas diferentes, que se expanden desde la membrana interna a la membrana externa. Estos

componentes pertenecen a la familia de transportadores conocidos como sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Cascales y Christie, 2003). Muchos de los miembros de la familia T4SS son constituyentes de patógenos de mamíferos que los usan para inyectar factores de patogenicidad en las células diana hospedadoras (Ding *et al.*, 2003; Nagai y Roy, 2003).

C) La proteína acopladora, que interacciona con el relaxosoma y el conducto, acercando ambas partes de la maquinaria de transferencia. Basándose en su similitud estructural con otros transportadores de ADN, se propone que empuja activamente la cadena de ADN transferente afuera del donador y hacia la célula receptora (Llosa *et al.*, 2002).



**Figura INT2. Conjugación.** Sistema de conjugación representa una larga subfamilia de T4SS que usan las bacterias en el proceso de la transferencia de ADN de la célula donadora a la receptora (A). El contacto célula-célula normalmente mediado por estructuras similares a pili (B). ADNss del elemento genético móvil se transfiere desde el donador a la bacteria receptora con ayuda de la relaxasa (C). Cadenas de ADN complementario se sintetizan en ambas células y la bacteria receptora se convierte en donador potencial del ADN móvil (D). Modificado de Juhas *et al.* (2008).

Si un plásmido codifica la maquinaria completa para su transferencia conjugativa, se denomina plásmido conjugativo o autotransmisible. Algunos plásmidos contienen un set mínimo de genes que les permiten ser transmitidos conjugativamente mediante la presencia de un plásmido auxiliar (“helper”). Este tipo de plásmidos se denominan movilizables y contienen al menos un origen de transferencia u *oriT*, y habitualmente también un gen que codifica a una relaxasa y una o más proteínas de unión accesorias. Por tanto, los plásmidos conjugativos tienden a ser de gran tamaño con un número bajo de copias, mientras que los

movilizables son de menor tamaño y tienen alto número de copias. Se puede generalizar y decir que los plásmidos movilizables contienen una región MOB, requerida para la movilización, mientras que los plásmidos conjugativos contienen además un sistema de secreción de tipo IV (T4SS) que permite el ensamblaje y la funcionalidad del canal de conjugación.

#### 4.1. Funciones implicadas en el procesamiento del ADN (Dtr)

La conjugación bacteriana es un mecanismo sofisticado y eficiente de transferencia de ADN entre bacterias. El único ingrediente esencial de la maquinaria MOB es la relaxasa, que es una proteína que inicia y termina el procesamiento del ADN conjugativo. La relaxasa escinde el fragmento de ADN que va a ser transferido mediante el reconocimiento de un sitio específico, denominado *oriT*, catalizando el corte del ADN específico de sitio y hebra, concretamente en el sitio *nic* del origen de transferencia. Como resultado de esta reacción, la relaxasa va a permanecer covalentemente unida al *oriT* del ADN en el extremo 5', generándose un complejo nucleoproteico que va a ser transportado a la célula receptora por el sistema T4SS (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009).

Las proteínas relaxasas son grandes y usualmente contienen dos o más dominios proteicos. Los dominios relaxasa adecuados se localizan siempre en el extremo N-terminal de la proteína. En el extremo C-terminal se localizan casi siempre, una ADN helicasa, una ADN primasa u otros dominios sin función conocida. En algunos casos, las relaxasas contienen un motivo denominado 3H, compuesto por una tríada de histidinas que la proteína usa para unir cationes bivalentes (Llosa y de la Cruz, 2005). Las relaxasas son herramientas filogenéticas usadas para la clasificación de plásmidos, como es el caso de la clasificación de plásmidos movilizables (Francia *et al.*, 2004). Garcillán-Barcia *et al.*, (2009) han expandido la clasificación de Francia y colaboradores, permitiendo así poder clasificar también a los plásmidos conjugativos. Esto permite la clasificación de los sistemas de conjugación en familias MOB: MOB<sub>F</sub>, MOB<sub>H</sub>, MOB<sub>Q</sub>, MOB<sub>C</sub>, MOB<sub>P</sub> y MOB<sub>V</sub>.

La familia MOB<sub>F</sub> está bien analizada y contiene 114 miembros. Para dos de sus relaxasas existen estudios detallados de estructura y bioquímica: TraI<sub>F</sub> (Larkin *et al.*, 2005; Hekman *et al.*, 2008) y TrwC<sub>R388</sub> (Guasch *et al.*, 2003; González- Pérez *et al.*, 2007). Las relaxasas de la familia MOB<sub>F</sub> son proteínas grandes que consisten en dos dominios: un dominio N-terminal en donde hay dos tirosinas catalíticas y un dominio helicasa C-terminal.

También los *oriTs* MOB<sub>F</sub> son comparativamente grandes y complejos, presumiblemente reflejan secuencias de ADN altamente reguladas.

La familia MOB<sub>H</sub> representa una nueva familia, no representada en su conjunto por plásmidos movilizables. El prototipo de esta familia es TraI del plásmido R27 del grupo de incompatibilidad IncHI1 (TraI\_R27).

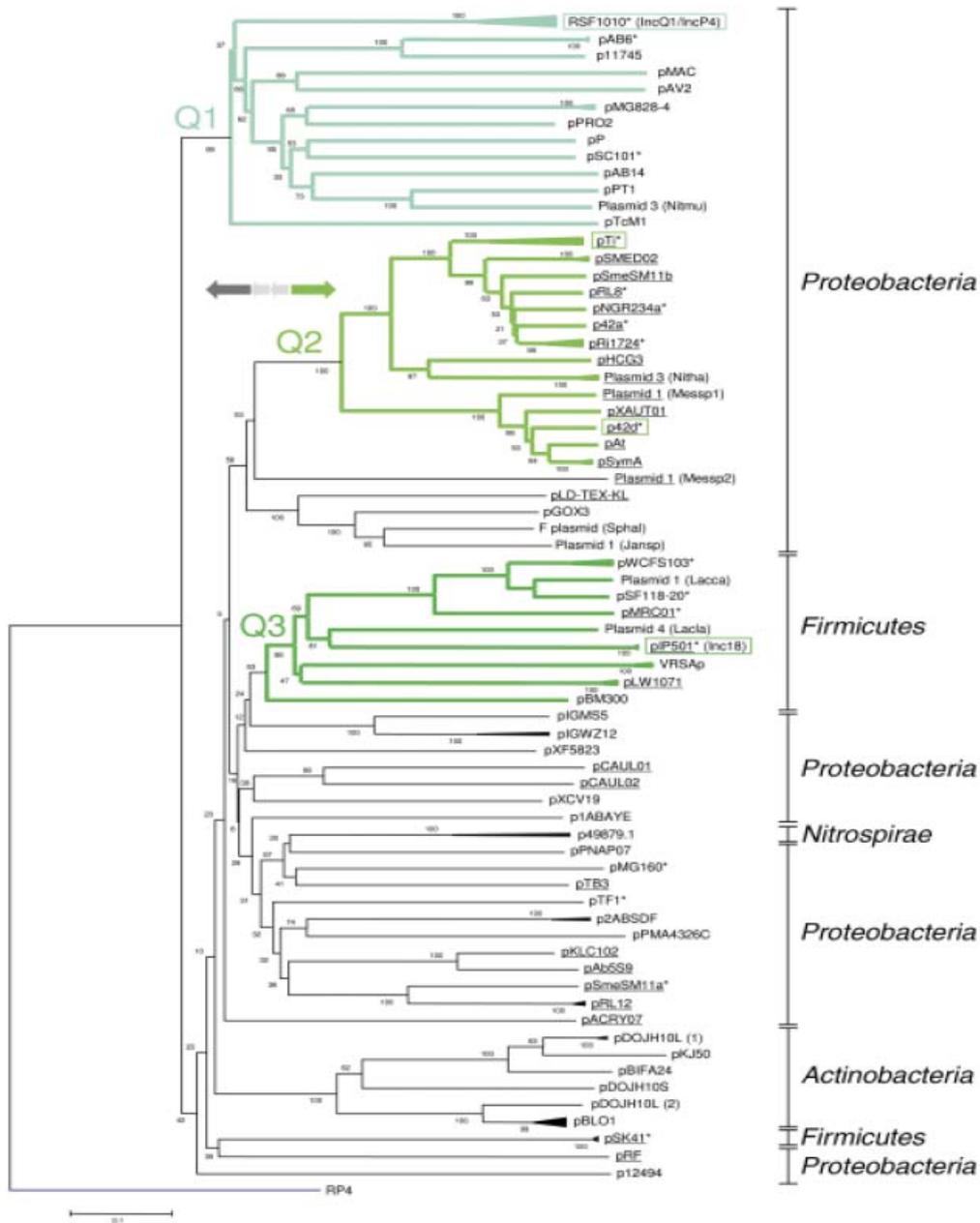
La familia MOB<sub>C</sub> es una familia de relaxasas bien distinguible. Contiene dos relaxasas analizadas experimentalmente: MobC\_CloDF13 (Nuñez y de la Cruz, 2001) y TraX\_pAD1 (Francia y Clewell, 2002). Esta familia incluye a plásmidos conjugativos y movilizables, así como ICEs o elementos relacionados. Los genes que codifican para las proteínas acopladoras se localizan adyacentes y aguas arriba de los genes relaxasa, con algunas excepciones en las que la localización es aguas abajo. Los *oriTs*, cuando se conocen, se localizan aguas abajo de los genes *mob*, excepto en los enterococos en los que se localiza entre 2 operones *mob* que se transcriben de forma divergente. La posición de los genes se ha visto que está conservada en la región de movilización en la mayoría de los elementos genéticos de Proteobacterias y estos elementos se distribuyen ampliamente entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo a *Yersinia enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, por lo que deben de contribuir a la transmisión de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos (Schubert *et al.* 2004; Lin *et al.* 2008).

La familia MOB<sub>Q</sub> tiene como prototipo a la relaxasa MobA del plásmido RSF1010. Esta familia incluye relaxasas tanto de plásmidos conjugativos como movilizables. Los prototipos de esta familia son TraA\_pTi (la relaxasa conjugativa del plásmido pTi de *Agrobacterium*, que se ha de distinguir de la relaxasa VirD2, responsable de la transferencia del ADN-T a células de plantas) y TraA\_p42d (prototipo de algunos plásmidos de *Rhizobium*), además de MobA\_RSF1010 y TraA\_pIP501. Este grupo se divide en dos clados: MOB<sub>Q1</sub> que incluye a plásmidos movilizables relacionados con el plásmido IncQ RSF1010, cuyo prototipo es MobA\_RSF1010 y están relacionados con MOB<sub>p</sub>. Las relaxasas de este clado son muy divergentes. MOB<sub>Q2</sub> se compone de plásmidos conjugativos de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, entre otros en el orden *Rhizobiales*. El prototipo para este clado es la relaxasa TraA\_p42d (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006). Estas relaxasas contienen un dominio helicasa en el extremo C-terminal, como las relaxasas MOB<sub>F</sub>. La relaxasa de *Agrobacterium*, TraA, es la responsable de la transferencia del plásmido pTi y forma parte de este grupo. Otra

característica de estas relaxasas es que tienen preferencia por actuar en *cis* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006; Cho y Winans, 2007) (ver Figura INT3).

El grupo **MOB<sub>P</sub>** representa una familia muy amplia de relaxasas. A este grupo pertenecen las relaxasas del clado MOB<sub>Q1</sub>, descrito en la sección anterior, y todas las descritas previamente como MOB<sub>HEN</sub> (Francia *et al.*, 2004), de las que MbeA\_ColE1 es su prototipo. Este grupo se divide en diferentes clados: MOB<sub>P1</sub> (que agrupa IncP, IncI, IncQ2, IncG, IncP6), MOB<sub>P2</sub> (VirD2 de los plásmidos de *Agrobacterium*), MOB<sub>P3</sub> (IncX), MOB<sub>P4</sub> (plásmidos IncU), MOB<sub>P5</sub> (cuya totalidad incluye la familia MOB<sub>HEN</sub>), MOB<sub>P6</sub> (IncI2) y MOB<sub>Q1</sub>, además de otros clados cuya filogenia no ha sido resuelta todavía. El clado MOB<sub>P1</sub> incluye relaxasas distribuidas por todas las divisiones de las *Proteobacterias*. Su promiscuidad debe ser una característica importante para estos plásmidos y es una característica del representante más conocido, el plásmido RP4. Las relaxasas MOB<sub>P2</sub> pertenecen todas a plásmidos de las  $\alpha$ -Proteobacterias, y la más analizada hasta la fecha es VirD2 de los plásmidos Ti de *Agrobacterium*. El análisis molecular de VirD2\_pTiC58 demuestra que las proteínas VirD2 son similares a las relaxasas conjugativas en detalles moleculares de su actividad (Pansegrau *et al.*, 1993). En general, las relaxasas MOB<sub>P</sub> son proteínas grandes y contienen la actividad relaxasa en el dominio N-terminal. El prototipo general es la relaxasa MOB<sub>P1</sub> TraI\_RP4 (Pansegrau y Lanka, 1996). Las relaxasas MOB<sub>P</sub>, a diferencia de las relaxasas MOB<sub>F</sub> analizadas, solo poseen una única tirosina activa en su centro catalítico, por lo que debe haber una diferencia importante en el mecanismo de acción entre relaxasas MOB<sub>F</sub> y las relaxasas MOB<sub>P</sub>. Si atendemos a su estructura, las relaxasas MOB<sub>P</sub> podrían ser similares a la relaxasa MobA\_RSF1010, incluida en la familia MOB<sub>Q</sub>, descrita anteriormente.

La familia **MOB<sub>V</sub>** incluye a 98 relaxasas asociadas a plásmidos y 6 relaxasas codificadas por verdaderas ICEs e IMEs. Los plásmidos pertenecientes a esta familia están extendidos en todos los filos bacterianos, principalmente *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (donde existen varios genes de resistencia a antibióticos), pero también hay pequeños clados de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Spirochaetes*. Las similitudes detectadas mediante un análisis PSI-BLAST sugieren que las familias MOB<sub>V</sub> y MOB<sub>F</sub> están ancestralmente emparentadas con esta familia. Sin tener en cuenta su enorme diversidad, los elementos MOB<sub>V</sub>, incluyendo los transposones de *Bacteroidetes*, muestran la misma organización genética de las regiones Mob y similitudes en sus *oriTs* (Francia *et al.*, 2004).



**Figura INT3. Árbol filogenético de las relaxasas MOB<sub>Q</sub>.** Los asteriscos indican que la transferencia conjugativa de los plásmidos está comprobada. Están subrayados los plásmidos en los que su gen relaxasa está proximo a un gen que codifica para una acopladora (y por tanto se presume que son conjugativos). Las flechas en los clados señalan la conservación de relaxasa (verde) y proteínas acopladoras (gris). Nitmu, *Nitrosospira multififormis*; Nitha, *Nitrobacter hamburguensis*; Messp1, *Mesorhizobium* sp. BCN1 – accession number YP\_665951; Messp2, *Mesorhizobium* sp. BCN1 – accession number YP\_665867; Sphal, *Sphingopyxis alaskensis*; Jansp, *Jannaschia* sp.; Lacca, *Lactobacillus casei*; Lacla, *Lactococcus lactis* [pDOJH10L (1), accession number NP\_694600; pDOJH10L (2), accession number NP\_694596]. Extraído de Garcillán-Barcia *et al.* (2009).

## 4.2. Origen de transferencia u *oriT*

El origen de transferencia desempeña una función central en el proceso de transferencia y replicación conjugativa. Es el único elemento que se requiere en *cis* para la transferencia de un determinado ADN (Lanka y Wilkins, 1995). Se han descrito cinco grupos principales de secuencias mediante la comparación de un gran número de *oriTs* (Guzmán y Espinosa, 1997; Lanka y Wilkins, 1995). También se ha descrito una interesante correspondencia entre los orígenes de replicación vegetativa de plásmidos y bacteriófagos de ADNss y los *oriTs* de plásmidos tipo IncP (Pansegrau y Lanka, 1996; Waters y Guiney, 1993).

La alta conservación de las secuencias que forman los *oriTs*, particularmente alrededor del sitio *nic* (donde se produce la rotura endonucleolítica en cadena sencilla previa al inicio de la transferencia del ADN), en distintos elementos conjugativos, da una idea de la importancia de la preservación inalterada de este tipo de secuencias para un correcto reconocimiento por la relaxasa. Se ha demostrado en numerosas ocasiones que un solo cambio nucleotídico puede ocasionar la pérdida total de la funcionalidad del *oriT* y de su procesamiento por la relaxasa (Stern y Schildbach, 2001). Esto ha generado, además, un cierto fenómeno de coevolución entre las relaxasas y sus respectivos *oriTs*, de manera que un tipo de relaxasa suele ir acompañada de un mismo tipo de *oriT*.

## 4.3. Proteínas acopladoras

Las proteínas acopladoras (T4CP) son proteínas integrantes de la membrana interna, con un extremo N-terminal que constituye la parte transmembrana y con un extremo C-terminal que constituye la parte citoplasmática, que debe ensamblarse como componente afín al T4SS o debe ser requerida cerca del aparato de transporte (Lee *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2002). Contienen dominios de unión a NTP, como un motivo Walker A (Motivo I) y B (Motivo II o caja DEXX) (Walker *et al.*, 1982) y usan la energía de la hidrólisis del NTP para conectar complejos nucleoproteicos transmisibles con el sistema de translocación (Firth *et al.*, 1996; Christie *et al.*, 1997; Cabezón *et al.*, 1997; Moncalián *et al.*, 1999).

Estudios (genéticos) mutacionales revelan que mutantes con la proteína acopladora inactiva, tienen afectada la capacidad de unión del NTP y/o la hidrólisis del mismo, dando lugar a fenotipos defectivos en conjugación (Lee *et al.*, 1999; Firth *et al.*, 1996; Moncalián *et*

*al.*, 1999; Balzer *et al.*, 1994). La inhibición de la conjugación también ocurre cuando la proteína acopladora se asocia con otras proteínas, como por ejemplo cuando TraG de RP4 interacciona con FopA de pKM101 y RifC del plásmido F (Santini *et al.*, 1998). Estudios de transporte en sistemas quimera, demuestran que la región principal para el transporte es la parte C-terminal citoplasmática de la proteína, ya que se pone en contacto con el T4SS (Cabezón *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 2000). En algunos casos, como en TraD del plásmido F, si se trunca su extremo C-terminal se afecta la eficiencia y la especificidad (Sastre *et al.*, 1998).

Las proteínas **TrwB** del plásmido R388 de *E. coli*, **TraD** y **TraG** de varios plásmidos de bacterias Gram-negativas y **VirD4** del plásmido Ti *A. tumefaciens* son proteínas T4CP asociadas con movilización nucleoproteica. Usando el modelo de Markov (Karplus, 1998), se pueden dividir en subfamilias. La primera, que incluye TrwB y TraD, contiene seis miembros de plásmidos conjugativos. Una segunda subfamilia agrupa a un conjunto grande de plásmidos, como TraG de RP4, y la proteína VirD4 del plásmido Ti, relacionada con la transferencia de ADN-T a células vegetales. Las proteínas incluidas en esta subfamilia conservan más del 30% de identidad en las secuencias aminoacídicas y exhiben la misma organización de dominios. En particular, TrwB presenta un 21-23% de identidad de secuencia con VirD4 de *A. tumefaciens* (Zupan *et al.*, 1998) y TraG de RP4 y R751, y del 28 al 30% con TraD de F y R100 (Lessl *et al.*, 1992; Llosa *et al.*, 1994).

Según los datos bioquímicos y estructurales acerca de la proteína TrwB, se podría pensar que esta proteína usa la energía procedente de la hidrólisis del ATP para empujar el ADN a través del canal transmembrana por un mecanismo similar al usado por las F<sub>1</sub>-ATPasas. Para el transporte de ADN, TrwB acopla el relaxosoma (complejo de ADN-proteínas) al canal de secreción. Se ha comprobado que la proteína TrwA, que forma parte del relaxosoma, estimula la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 (el dominio citoplasmático de TrwB), lo que revela una interacción específica entre las dos proteínas. Esta interacción ocurre a través del dominio C-terminal, observándose un complejo de 68 kDa entre TrwB $\Delta$ N70 y el dominio C-terminal de TrwA. La estructura cristalográfica de TrwB $\Delta$ N70 muestra una simetría hexamérica con 6 pliegues y un canal central de alrededor de 20 Å de diámetro (Gomis-Ruth *et al.*, 2001). La sorprendente similitud estructural entre TrwB y otros motores moleculares bien conocidos, como F<sub>1</sub>-ATPasa (Abrahams *et al.*, 1994), sugiere que TrwB podría también operar como un motor, empujando el ADN a través del canal usando la

energía derivada de la hidrólisis de ATP. Esto se sustenta por datos bioquímicos que indican que TrwB es una ATPasa dependiente de ATP (Tato *et al.*, 2005). La actividad ATPasa de TrwB es estimulada por la proteína TrwA, lo que implica interacciones específicas entre ambas proteínas. Esta modulación podría facilitar el acoplamiento dinámico entre TrwB y el ADN durante el proceso conjugativo (Tato *et al.*, 2007). Las proteínas acopladoras TraD del plásmido F, TraG del RP4 y HP054 de *Helicobacter pylori* unen ADN de cadena sencilla y doble de manera no específica (Panicker, *et al.*, 1992; Schröder, *et al.*, 2002). Ninguno de estos ortólogos muestra una actividad hidrolítica de NTP detectable *in vitro* bajo las condiciones ensayadas. Esta habilidad para unirse a ADN es inespecífica e independiente de la unión a NTP (Gomis-Rüth *et al.*, 2004).

En el patógeno anaerobio *Clostridium perfringens*, los plásmidos conjugativos portan genes de resistencia a antibióticos o toxinas extracelulares (Abraham *et al.*, 1985; Bannam *et al.*, 2006; Brynestad *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2007). El prototipo de plásmido conjugativo en *C. perfringens* es el plásmido pCW3, de 47kb y con resistencia a tetraciclina. Un análisis bioinformático del locus *tcp* relacionado con la conjugación de *C. perfringens*, identifica varias proteínas que presentan una baja homología con proteínas codificadas dentro de la región de transferencia del transposón conjugativo Tn916 (Bannam *et al.*, 2006). La proteína esencial para la conjugación TcpH, un componente de membrana asociado al complejo mpf, se localiza en los polos celulares de *C. perfringens* y se ha visto que interacciona consigo misma y con la proteína codificada por pCW3 TcpC (Teng *et al.*, 2008). La proteína TcpA contiene un dominio Ftsk/SpoIIIE que se localiza en translocasas de ADN (Bannaman *et al.*, 2006), lo que sugiere que TcpA sea una proteína implicada en el movimiento de ADN durante la transferencia conjugativa, presentando una función equivalente a otras proteínas acopladoras en otros sistemas de conjugación. Como tales proteínas, TcpA posee dos dominios transmembrana N-terminales (TMDs) y una región C-terminal citoplasmática que contiene tres motivos que previsiblemente se relacionan con la unión e hidrólisis de ATP (Bannman *et al.*, 2006). Estudios previos revelan que los motivos conservados, motivo I (caja Walker A), motivo II (caja Walker B) y motivo III (caja RAAG), son esenciales para la función de TcpA. Mediante análisis de dos híbridos se ha comprobado que TcpA interacciona con otras proteínas, como TcpC, TcpG y TcpH (Steen *et al.*, 2009).

#### 4.4. Formación del par conjugativo (Mpf)

Las bacterias no sólo son dependientes de su medio interno para lograr sus estrategias de supervivencia, sino que pueden secretar enzimas y otras macromoléculas al exterior para readaptar el medio a sus propios requerimientos. Del mismo modo, la patogenicidad de las bacterias es a menudo dependiente de maquinarias que permiten el transporte de moléculas tóxicas al exterior de la célula, o bien en el ambiente o en el interior de células hospedadoras (Kostakioti *et al.*, 2005). Estas maquinarias son sistemas especializados que reciben el nombre de sistemas de secreción.

Estos sistemas de secreción se expanden en la membrana celular y son los responsables del transporte de macromoléculas de diferente naturaleza. Se han identificado hasta 6 diferentes sistemas de secreción, que se denominan desde el tipo I al tipo VI (Shrivastava *et al.*, 2008). Todos los sistemas poseen elementos especializados que permiten el transporte de proteínas efectoras a través de varios compartimentos de las células bacterianas como son la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa. Cada sistema produce la translocación de moléculas de forma diferente, aunque en general podemos distinguir dos grupos:

- El T2SS y T5SS necesitan de la translocasa *sec* y secuencias señal en los extremos N-terminales de las proteínas para realizar su translocación.
- T1SS, T3SS, T4SS y T6SS son independientes de *sec*.

El sistema de secreción tipo IV (T4SS) es una estructura dotada de varias subunidades estructurales que se expanden por la envuelta celular, que transportan proteínas y complejos nucleoprotéicos a través de las membranas. T4SS media la transferencia horizontal de genes, contribuyendo a la plasticidad genómica y la evolución de patógenos a través de la diseminación de resistencia de antibióticos y genes de virulencia. Además, T4SS se usa también para la liberación de proteínas efectoras bacterianas a través de la membrana bacteriana y la membrana plasmática de células eucarióticas, contribuyendo directamente en la patogenicidad.

T4SS está codificado por genes organizados habitualmente en una unidad funcional simple. Los grupos de genes del T4SS hasta ahora descritos difieren significativamente en varios aspectos, incluyendo la organización de los determinantes genéticos, la homología que comparten y las relaciones evolutivas, que hacen que los T4SSs se clasifiquen en varios tipos siguiendo dos esquemas de clasificación diferentes (Lawley *et al.*, 2003; Christie *et al.*, 2005).

En la clasificación original inicialmente existían tres tipos principalmente, referidos como tipo F, P e I, basados en los grupos de incompatibilidad de los plásmidos representativos, IncF (plásmido F), IncP (plásmido RP4) e IncI (plásmido R64) respectivamente (Lawley *et al.*, 2003). En la clasificación alternativa, los tipos F y P se agrupan juntos como sistemas tipo IVA, que se asemejan al arquetipo de sistemas VirB/ViD4 de *A. tumefaciens*. El tipo I, que varía significativamente en sus componentes de los miembros de los tipos F y P, se denomina tipo IVB. Los determinantes genéticos del sistema tipo IVB se relacionan con el sistema arquetipo Dot/Icm de *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii*, correspondiente a bacterias patógenas intracelulares. Un tercer grupo, denominado GI y que no está bien caracterizado, estaría compuesto por todos los “otros” representantes del T4SS que tienen homología escasa o nula con los tipos IVA y IVB (Christie *et al.*, 2005) En ambos esquemas de clasificación, los miembros incluidos en cada tipo exhiben evidencias de ascendencia común. Por ejemplo, dentro de cada tipo existe una alta conservación del contenido genético y orden de los mismos.

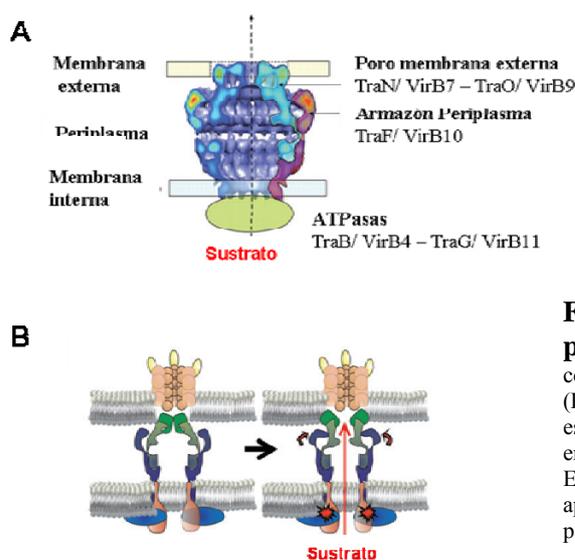
Al grupo GI recientemente identificado pertenece la isla genética ICEHin1056 que es un vector de resistencia a antibióticos en *Haemophilus influenzae*. Este sistema representa el cuarto linaje con una distancia genética más grande de la observada entre los linajes F, P e I. Este nuevo tipo de T4SS está presente en una amplia variedad de islas genómicas incluyendo pKLC101, PAPI, SPI-7 y el elemento *clc* así como otros derivados de un amplio espectro de cepas bacterianas incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella enterica* serovar *Typha* y *L. pneumophila*. Este linaje de T4SSs se han denominado tipo GI para enfatizar el hecho de que el T4SS se encuentra asociado hasta el momento sólo con las islas genómicas (Juhás *et al.*, 2007). Las relaciones dentro de los tipos y entre los tipos de T4SS se basan principalmente en tres genes, denominados *traB/virB10*, *traC/virB4* y *traD/virD4* (denominados así por genes del plásmido F de *E. coli* o del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, respectivamente). La alta variabilidad de la secuencia de *traD* significa que no es un candidato ideal para el análisis filogenético, mientras que *traB/virB10* y *traC/virB4* codifican proteínas esenciales del T4SS de bacterias Gram-negativas y son ideales para la comparación aminoacídica mediante alineamiento de secuencias y, como tales, estas diferencias en las secuencias son suficientemente importantes como para definir los miembros de los distintos tipos de T4SS. La identificación de estos genes, al igual que permite separar los distintos tipos de T4SS, podría también servir para la identificación de nuevos sistemas de

secreción tipo IV mediante la búsqueda de homólogos. Sin embargo, debe considerarse que *traB/virB10* no es un componente del sistema de conjugación de bacterias Gram-positivas, en tanto que *traC/virB4* permanece como el único altamente conservado en T4SS tanto de Gram-positivas como de Gram-negativas.

La mayoría de la información que concierne a las propiedades funcionales de los T4SS se ha obtenido a través del estudio del sistema VirB/VirD4 de *A. tumefaciens*. El T4SS de *A. tumefaciens* está codificado por aproximadamente 10 kb de ADN que constituyen el “operón *virB*”, el cual comprende 11 marcos abiertos de lectura y un gen separado denominado *virD4*, mediador de la transferencia de genes oncogénicos en la células de las plantas, resultando en tumorigénesis y subsecuentemente en la formación de una agalla o tumor. De los 11 determinantes proteicos VirB del T4SS VirB/VirD4 de *A. tumefaciens*, las proteínas VirB2 y VirB5 son componentes del pilus, VirB3 y VirB7 son proteínas asociadas al pilus, VirB4 y VirB11 son nucleósido trifosfatasa que proporcionan energía para la transferencia, mientras que VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 y VirB10 son componentes del canal transmembrana. VirB1 es una transglicosilasa lítica que degrada peptidoglucano de la pared celular en el sitio donde se ensambla el T4SS, y VirD4 es otra nucleósido trifosfatasa, la proteína acopladora que recluta el relaxosoma hasta los componentes del sistema de secreción (Christie *et al.*, 2005; Backert y Meyer, 2006). Es interesante que el extremo C-terminal de VirB1, que se designa como VirB1\*, parece que es escindido y secretado desde las células donde se ha formado el pilus del T4SS (Zupan *et al.*, 2007) (Figura INT4). Por tanto, VirB1 actúa como una proteína bifuncional que lisa peptidoglucano de la pared celular para facilitar la inserción del T4SS pero simultáneamente también promueve la formación del pilus mediante la interacción con las subunidades componentes del mismo (Zupan *et al.*, 2007).

El sustrato transportado por el T4SS VirB/VirD4 de *A. tumefaciens* consiste en un segmento del plásmido inductor de tumores (Ti), denominado región T, que se va a transferir a la célula receptora de la planta, resultando finalmente en una superproducción de fitohormonas (Hooykaas y Beijersbergen, 1994; Gelvin, 2000; Hansen y Chilton, 1999; McCullen y Binns, 2006). La transferencia de la región T ocurre como un ADN de cadena sencilla, denominado ADN-T, que codifica proteínas oncogénicas y la relaxasa VirD2, formándose un complejo ADN-proteína. Se ha visto que su reclutamiento por parte del sistema de secreción se facilita mediante la interacción con las proteínas **VBP** (de **VirD2 Binding Protein**; Guo *et al.*, 2007). Además de transportar el complejo ADN-T- relaxasa

VirD2, el T4SS de VirB/VirD4 transporta varias proteínas efectoras (VirD5, VirE2, VirE3 y VirF) al interior de las células vegetales, lo que incrementa las posibilidades de éxito de la infección (Vergunst *et al.*, 2000). VirE2 actúa como una potente maquinaria molecular de unión a ADN de cadena sencilla, permitiendo la infección mediante un lanzamiento activo del DNA-T hacia el interior de las células hospedadoras sin la necesidad de fuentes de energía externa (Grange *et al.*, 2008).



**Figura INT4. Estructura del complejo del poro del sistema T4SS.**

(A) Estructura del complejo del poro Cryo-EM 3D a 15 Å de resolución (Fronzes *et al.*, 2009). (B) Modelo funcional basado en la estructura que muestra la apertura del canal en la energización de VirB10 por las ATPasas citoplasmáticas. El cambio en la conformación de VirB10 podría causar la apertura de la constricción VirB9/B7, permitiendo el paso del sustrato. Modificado de Llosa *et al.* (2009).

Se han identificado otros T4SS que comparten ascendencia con el sistema VirB/VirD4 de *A. tumefaciens*. Algunos de ellos contienen un set completo de genes similar al de los genes *virB/virD4* de *A. tumefaciens*, mientras que otros son quimeras de genes *virB/virD4* y otros genes no relacionados (Christie *et al.*, 2005). Un buen ejemplo es el de *Helicobacter pylori*, que es un agente causante de gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico en humanos (Blaser y Atherton, 2004). Las cepas más virulentas de *H. pylori* albergan la isla de patogenicidad *cag*, que codifica un T4SS similar a VirB/VirD4. El T4SS de *H. pylori* contiene genes que codifican proteínas homólogas a VirB4, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11 y VirD4 de *A. tumefaciens*, además de otros genes sin función conocida. Además, estudios moleculares sugieren que existen proteínas de *H. pylori* no homólogas a las VirB/VirD4 con funciones similares a las proteínas VirB1, VirB2, VirB6 y VirB8 de *A. tumefaciens* (Buhrdorf *et al.*, 2003; Andrzejewska *et al.*, 2006). En estudios recientes se ha visto que la estructura del

T4SS de *H. pylori* estaría formada por análogos funcionales de todos los componentes del sistema VirB/VirD4 de *A. tumefaciens*, a excepción de VirB5 (Kutter *et al.*, 2008). La única proteína efectora del T4SS de *H. pylori* conocida hasta la fecha es CagA, que interacciona con algunas proteínas de las células hospedadoras, resultando alterada la fisiología de las células hospedadoras e incrementando las posibilidades de éxito de infección (Bagnoli *et al.*, 2005; Bourzac y Guillemin, 2005; Brandt *et al.*, 2005; Bourzac *et al.*, 2007; Moese *et al.*, 2007; Moese *et al.*, 2007; Zeaiter *et al.*, 2008). El mecanismo exacto por el que se transloca la proteína CagA por el T4SS de *H. pylori* sigue siendo difícil de explicar, sin embargo, mediante proteínas de fusión e inmunoprecipitación se ha identificado a CagF, como la proteína que interacciona con CagA (Couturier *et al.*, 2006). El resultado de este estudio indica que CagF es una proteína que reconoce y libera a CagA en el interior del canal del T4SS (Couturier *et al.*, 2006). Otra proteína crucial en la liberación de CagA en las células hospedadoras es la adhesina especializada CagL. Se localiza en la superficie del pilus del T4SS y lleva a cabo la liberación de CagA mediante la activación de receptores de integrinas en la superficie de las células hospedadoras (Kwok *et al.*, 2007).

En el caso de *Bartonella*, patógeno intracelular, un T4SS similar al VirB/VirD5 desempeña una importante función en la patogénesis (Schmid *et al.*, 2004). Algunos efectores protéicos translocados (Beps) se relacionan con una gran variedad de rasgos, incluyendo la activación de la preinflamación, apoptosis y reorganización del citoesqueleto (Schulein *et al.*, 2005; Backert y Meyer, 2006). Otro T4SS relacionado con el de *A. tumefaciens* y que se estudia debido a que es el agente causante de la tosferina, es el de *Bordetella pertussis* que libera la toxina pertúsica en el medio extracelular (Rambow-Larsen y Weiss, 2004). Recientemente, se ha presentado un modelo que sugiere que durante la primera fase la toxina pertúsica interacciona en el periplasma con el aparato de secreción parcialmente ensamblado y sólo después de esta interacción inicial, el T4SS completo termina ensamblándose y se produce la secreción de la toxina pertúsica a través de la membrana externa (Verma y Burns, 2007).

#### 4.5. Establecimiento de la información genética adquirida en la célula receptora

El establecimiento del plásmido transferido a la célula receptora requiere la circularización del plásmido y la síntesis de la hebra complementaria. El proceso de circularización está mediado por la relaxasa, la cual se piensa que permanece covalentemente

unida al extremo 5' del ADN transferido a la célula receptora. Se cree que el extremo 3' de esta cadena sigue extendiéndose por replicación en la célula donadora, generando un intermediario de transferencia que es más de una unidad de largo y el cual contiene uno o más de un sitio *nic* internos. La relaxasa, en la célula receptora, reconocería el sitio *nic* interno de este intermediario y catalizaría la reacción de transesterificación generando una molécula circular de ADN (Lanka y Wilkins, 1995).

La iniciación y la terminación de una ronda de transferencia requieren diferentes secuencias específicas en el *oriT*. En particular, el proceso de terminación requiere unas secuencias repetidas invertidas (IR) que se suelen encontrar aguas arriba del sitio *nic* en la última porción del *oriT* que es transferido. Esta IR produce una estructura secundaria en el ADN que puede ser reconocida por la relaxasa covalentemente unida al extremo 5', lo que propiciaría su unión y posterior reacción de corte y religación (Bhattacharjee y Meyer, 1993). Experimentos de transferencia con el plásmido F indican que dicho plásmido tiene una tasa de transferencia de unos 775 nucleótidos por segundo. Esta alta tasa junto con la necesidad de minimizar la vulnerabilidad del ADNss, hacen pensar que la síntesis de la hebra complementaria se produce simultáneamente a la entrada del ADN que está siendo transferido a la célula receptora. Igualmente se piensa que la síntesis de ADN, con polaridad 5'→3', se produce de forma discontinua mediante el empleo de múltiples cebadores, lo que aceleraría el proceso. La síntesis de dichos cebadores en el plásmido F parece depender de funciones codificadas por la célula receptora. Se han determinado algunas de las señales de iniciación (*ssi*) implicadas en la síntesis de la hebra complementaria (Tanaka *et al.*, 1994), tales como *ssiE* del plásmido F (Nomura *et al.*, 1991).

En otros sistemas conjugativos, la síntesis de la hebra complementaria se lleva a cabo por funciones codificadas en el plásmido. El ejemplo clásico es la familia de las ADN-primasas (Frick y Richardson, 2001). Las mejor estudiadas corresponden a las primasas codificadas por el gen *sog* del plásmido Collb y por *traC* de los plásmidos IncP. Este tipo de proteínas parecen ser transferidas unidireccionalmente hasta el receptor por el sistema conjugativo. Estudios moleculares han demostrado que las primasas contribuyen a la “promiscuidad” de la transferencia (Lanka y Barth, 1981; Merryweather *et al.*, 1986; Krishnapillai, 1988). El análogo a estas proteínas en el sistema de transferencia del ADN-T estaría formado por la proteína VirE2. Esta proteína puede ser transferida tanto independiente como simultáneamente con el ADN-T por el sistema VirB de *A. tumefaciens* (Christie, 1997).

## 5. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN BACTERIAS DE LA FAMILIA *RHIZOBIACEAE*

Las bacterias del suelo de la familia *Rhizobiaceae*, conocidas genéricamente como rizobios, son  $\alpha$ -Proteobacterias Gram-negativas que constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en los siguientes géneros: *Rhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium* y *Devosia* (Ramírez Bahena, 2006).

### 5.1. Contenido y organización de los genomas de la Familia *Rhizobiaceae*: Plásmidos e islas simbióticas

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* se caracterizan por su capacidad de interactuar con las raíces de plantas leguminosas en una asociación simbiótica, donde la bacteria fija nitrógeno atmosférico que dona a la planta en forma de nitrógeno orgánico, a cambio de poderse establecer en un nicho protegido y recibir fuentes de carbono. Uno de los más importantes hallazgos de la biología molecular de estas bacterias fue el descubrimiento de que la mayor parte de la información requerida para el establecimiento de la simbiosis se encuentra localizada en plásmidos (denominados plásmidos simbióticos o pSyms), como ocurre en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* o *S. meliloti*, o en islas simbióticas de localización cromosómica, como en *M. loti* (Romero y Brom, 2004). El término de isla simbiótica se propuso por analogía con las islas de patogenicidad encontradas en bacterias patógenas. Al igual que éstas, las islas simbióticas están integradas en el cromosoma, adyacentes a genes que codifican ARN de transferencia, codifican una integrasa en uno de los extremos, y convierten cepas naturales en cepas capaces de formar asociaciones con eucariotas (Sullivan y Ronson, 1998; Juhas *et al.*, 2009).

La existencia de plásmidos es una característica importante de muchos rizobios, sobre todo en los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. El número y tamaño de estos plásmidos es muy variable entre diferentes especies o incluso dentro de una misma especie (desde 0 a 11 plásmidos, de entre 50 y 1700 kb). El tamaño del pSym es variable entre especies, desde el plásmido pRt843a de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, en el que solo 32 de las 180 kb del pSym son necesarias para generar nódulos fijadores (Innes *et al.*, 1988), hasta los megaplásmidos de especies como *S. meliloti* y *R. galegae*, cuyos pSyms tienen 1.35 Mb y 1

Mb, respectivamente. La contribución de los plásmidos al total del genoma en las especies de rizobios es bastante importante, pudiendo llegar a representar cerca del 50% del genoma. La mayoría de los plásmidos en los rizobios no tienen una función claramente asignada, ya que no portan genes indispensables para el proceso simbiótico, por lo que frecuentemente se han denominado plásmidos crípticos o no simbióticos. La clasificación de los plásmidos de los rizobios en simbióticos y crípticos ha sido muy discutida por el hecho de que aunque estos últimos son prescindibles para la simbiosis, pueden tener influencia en la competitividad, infectividad y eficiencia de este proceso (Brom *et al.*, 2000; García-de los Santos *et al.*, 1996; Sanjuan y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993). En algunos casos, la participación de estos plásmidos es considerada lo suficientemente importante como para denominarlos también pSyms. Por ejemplo, se considera que *S. meliloti* contiene dos plásmidos simbióticos: pSymA (1.35 Mb) y pSymB (1.68 Mb). El pSymA es el “verdadero” pSym en el sentido de que contiene la mayoría de los genes *nod* y *nif* necesarios para la simbiosis; el pSymB participa también en la simbiosis ya que es portador de genes para la biosíntesis de exopolisacáridos (Finan *et al.*, 2001).

A diferencia de las especies de crecimiento rápido, en las de crecimiento intermedio como *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* y en las de crecimiento lento como *Bradyrhizobium*, los genes simbióticos se localizan en el cromosoma. La única excepción es *M. amorphae*, que porta un pSym de cerca de 1 Mb (Wang *et al.*, 1999). En *B. japonicum*, los genes simbióticos están localizados en una isla simbiótica de 681 Kb que presenta una concentración anormalmente alta de IS (secuencias de inserción) en comparación con el resto del cromosoma, lo que sugiere que este sector podría provenir de un fenómeno de transferencia genética horizontal (Göttfert *et al.*, 2001; Hahn y Hennecke, 1987; Kaneko *et al.*, 2002). En *M. loti* los genes simbióticos se localizan en una isla simbiótica de unas 500 Kb integrada en el cromosoma (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998).

Una característica muy constante entre los plásmidos simbióticos es que al igual que en otros plásmidos, presentan un contenido G+C inferior al resto del genoma. El primer pSym completamente secuenciado fue el pNGR234a (536 kb) de *Rhizobium* sp. NGR234. Este plásmido tiene un bajo contenido en G+C (58,5%) si se compara con el correspondiente al resto del genoma (62,2%). Es uno de los pSyms que mejor se conocen debido a su gran similitud con el sistema de transferencia *tra/trb* de pTiC58 de *A. tumefaciens* (Freiberg *et al.*, 1997) y pRil724 de *Agrobacterium rhizogenes* (Nishiguchi *et al.*, 1987). La replicación de

este plásmido ocurre desde un origen simple (*oriV*) con la participación de un sistema RepABC. Adyacente a este sistema se encuentra el conjunto de genes *tra* y *trb* completos y una posible región *oriT*, lo que sugiere que el plásmido en cuestión puede ser autoconjugativo. El 15 % de sus genes están implicados en los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno. La mayoría de los genes *nod*, *nol* y *noe* se concentran en pNGR234a, únicamente cuatro de estos genes se localizan en otros replicones del genoma. Los genes de la nodulación no se encuentran en un sector continuo, sino que se dispersan a lo largo de una mitad del plásmido en tres regiones no continuas. Los genes para la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) se localizan en un sector continuo, situado en la otra mitad del plásmido. De nuevo, no todos los genes *fix* se localizan en pNGR234a, algunos de ellos probablemente se localizan en otros replicones del genoma. pNGR234a también codifica un sistema de secreción tipo III, asimismo involucrado en la interacción simbiótica con el hospedador (Freiberg *et al.*, 1997).

En *S. meliloti* 1021, la secuenciación del genoma reveló que el pSymA representa el 20% de genoma completo de la bacteria con un tamaño de 1.35 Mb. Al igual que en pNGR234a, pSymA tiene un contenido G+C (60.4%) más bajo que el resto del genoma (62.7%). La replicación es dependiente de un *oriV* simple, que está también bajo el control de un sistema RepABC. A diferencia de pNGR234a, pSymA sólo contiene cuatro genes *tra*: *traA* y *traCDG* y un sitio *nic* del mismo tipo que el presente en el plásmido pTiC58 (Barnett *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001). Sin embargo, no se han encontrado homólogos a los genes *traB* y *traF*, si bien *traB* no es esencial para la conjugación de pTiC58 (Farrand, 1998). La función Mpf se llevaría a cabo por un sistema de tipo *virB* codificado en el operón *SMA1322-virB1-B11* (Soto *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007). En pSymA también se localiza un sistema de pilus *pilA/cpa*, encontrándose una segunda copia de este sistema en el cromosoma. La mayoría de los genes *nod*, *nol* y *noe* están localizados junto con los genes *nif* y *fix* en una región de aproximadamente 275 kb. Algunos de los genes *fix* (como por ejemplo el operón *fixNOQP*) se encuentran repetidos dentro del pSymA. A diferencia de pNGR234a, no contiene genes para un sistema de secreción tipo III.

En cuanto al otro pSym de *S. meliloti* 1021, denominado pSymB, su secuencia nucleotídica revela la existencia de diversos genes con función en el proceso simbiótico. En particular, genes para la biosíntesis de exopolisacáridos (*exo*, *exp*), transporte de dicarboxilatos (*dct*), y el gen *bacA* que interviene en la diferenciación de bacteroides. Este plásmido tiene dos características notables, una gran cantidad de sistemas de transporte tipo

ABC (representando el 17% de los genes) y de genes relacionados con la biosíntesis de polisacáridos (12% de los genes). Asimismo, hay algunos genes esenciales localizados en este plásmido, con única copia en todo el genoma, como son <sup>Arg</sup>tRNA<sub>CCG</sub>, *minCDE* (Finan *et al.*, 2001). Dado que pSymB posee características típicas de cromosoma y plásmidos, se ha sugerido la denominación de “crómido” (Harrison *et al.*, 2010). También hay algunos genes relacionados con actividades catabólicas, resistencia a antibióticos, cuyas características sugieren que el pSymB es un plásmido importante para supervivencia y la competitividad de la bacteria bajo las condiciones predominantes en el suelo y en la rizosfera (Finan *et al.*, 2001). Respecto a funciones de movilidad, el pSymB sólo tiene un gen *traA* (*traA2*), que codifica para una posible relaxasa y un probable origen de transferencia funcional (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006).

Exceptuando los genes simbióticos, la conservación de otros genes entre pNGR234a y pSymA es muy baja. Esta observación sugiere la existencia de al menos dos líneas de evolución diferentes para estos pSyms. Si se compara el cromosoma de *S. meliloti* y el cromosoma circular de la bacteria patógena de plantas *A. tumefaciens*, se observa que existe cierta similitud (Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Esto ha llevado a sugerir que *S. meliloti* proviene de un ancestro común a *A. tumefaciens*, que recibió los plásmidos pSymA y pSymB (Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Las características estructurales de estos plásmidos sugieren que la adquisición de pSymB probablemente fue anterior a la de pSymA, que debió ser adquirido en un evento relativamente reciente (Galibert *et al.*, 2001).

La cepa *S. meliloti* GR4 presenta, además de los 2 plásmidos simbióticos (pSymA y pSymB), 2 plásmidos crípticos denominados pRmeGR4a y pRmeGR4b de 115 y 140 MDa, respectivamente (Toro y Olivares, 1986). Al menos en pRmeGR4b se ha descrito la presencia de genes que están directamente implicados en la eficiencia de nodulación de *S. meliloti* GR4. Este es el caso de los genes *nfe* (de “nodule formation efficiency”), localizados en el plásmido pRmeGR4b (Sanjuan y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993) y cuya expresión está regulada por el sistema NifA-RpoN (Sanjuan y Olivares, 1991). Aunque la función de estos genes (*nfeA*, *B*, *C*, *D*) no se conoce, presentan homología con genes tales como los *ocd* de *A. tumefaciens* (de “ornitina ciclodeaminasa”) (Soto *et al.*, 1994), lo que sugiere una función relacionada con el catabolismo de compuestos específicos, cuya utilización podría suponer una ventaja en las primeras etapas de la interacción simbiótica. También en el plásmido pRmeGR4b se ha detectado la presencia de genes implicados en la producción de sustancias como melanina

(Mercado-Blanco y Olivares, 1993), aunque a diferencia de otras especies de rizobios, no se ha encontrado una relación entre la producción de esta sustancia y la fijación de nitrógeno.

El plásmido pRetCFN42a de *R. etli* se comporta como un plásmido autotransferible que porta un sistema *tra/trb* con bastante homología al de pTiC58 de *A. tumefaciens*. Del mismo modo, el sistema de regulación de la transferencia es del tipo quorum-sensing, con la presencia de genes *traI*, *traR*, *cinR* y *traM* (Tun-Garrido *et al.*, 2003).

En cuanto a la organización de genes en las islas simbióticas, si se comparan las islas de las cepas MAFF303099 (611 Kb) (Kaneko *et al.*, 2000) y R7A (502 Kb) (Sullivan *et al.*, 2002) de *M. loti*, se observa que tienen un contenido en G+C similar y que muestran una zona común (aproximadamente 248 Kb) que se denomina “columna vertebral”, con un 98% de identidad en la secuencia de ADN (Sullivan *et al.*, 2002). Esta zona contiene todos los genes relacionados con nodulación, fijación de nitrógeno y con transferencia genética. En la isla MAFF303099 existe un sistema de secreción tipo III, mientras que en R7A este sector se sustituye por un sistema de secreción tipo IV, con una gran similitud al sistema *virB* de *A. tumefaciens* (Sullivan *et al.*, 2002). En la zona que forma la “columna vertebral” de la isla, los genes para la nodulación se localizan en tres grupos distribuidos de forma discontinua, que están separados y lejos de otros tres grupos de genes para la fijación de nitrógeno. La mayoría de los genes que participan en la transferencia de la isla (genes *tra* y *trb*) se localizan en un grupo sencillo, aunque algunos genes adicionales se encuentran repartidos en localizaciones diferentes del genoma. En la isla de R7A, la mayoría de los genes con homología a proteínas hipotéticas se encuentran formando grupos y están ausentes en el genoma de MAFF303099, representando elementos genéticos que han sido independientemente adquiridos por la isla de R7A. Además, cada isla presenta un patrón diferente de secuencias de inserción, lo que sugiere que la invasión de estas secuencias de inserción contribuye sustancialmente a la diversificación de estas dos islas.

## 5.2. Transferencia conjugativa en *Rhizobium*

El interés en estudiar la conjugación en *Rhizobium* se originó después del descubrimiento de los plásmidos simbióticos (pSyms). Uno se podría hacer la siguiente pregunta: ¿Tiene la transferencia de los plásmidos simbióticos algún impacto en la estructuración de las poblaciones rizobiales? Varias líneas de investigación sugieren que existe transferencia conjugativa de los pSyms en condiciones naturales (Rao *et al.*, 1994;

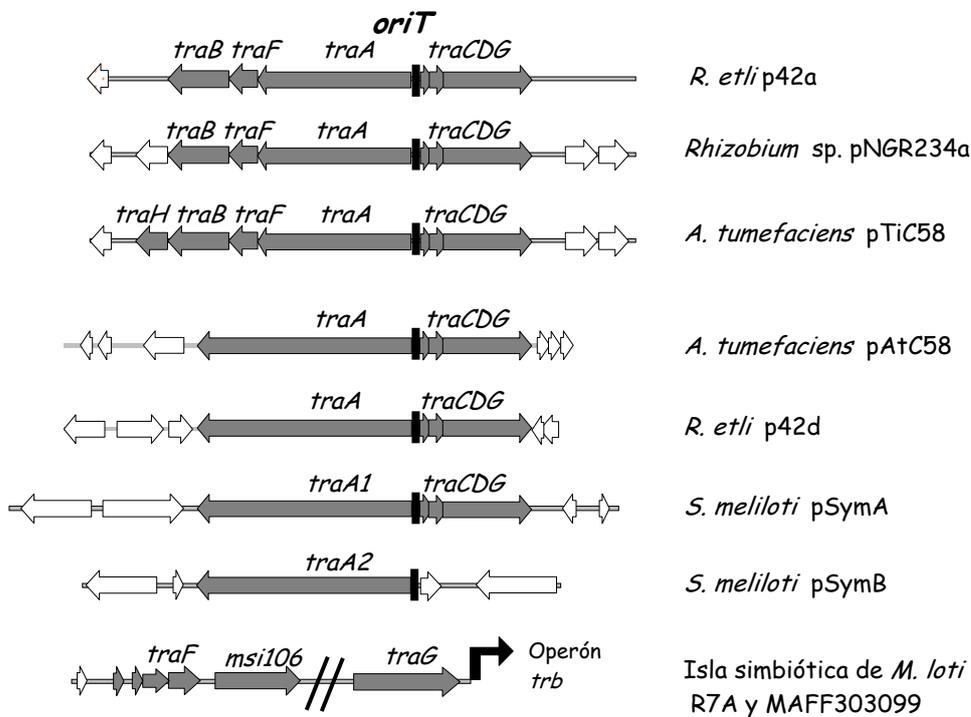
Schofield *et al.*, 1987). De igual modo, Sullivan y colaboradores pusieron de manifiesto la transferencia de la isla simbiótica R7A de la cepa de *M. loti* ICMP3153 a diferentes cepas nativas de un suelo cultivado con *Lotus corniculatus* en lo que ya es un experimento clásico. En el transcurso de 7 años desde la inoculación con la cepa *M. loti* ICMP3153, tan sólo un 19% de las bacterias aisladas de los nódulos demostraron corresponder a la cepa inoculada inicialmente, mientras el resto resultaron ser cepas autóctonas que habían captado la isla simbiótica de la cepa ICMP3153 (Sullivan *et al.*, 1995).

Mediante análisis filogenéticos se han podido poner de manifiesto antiguos eventos de transferencia genética horizontal en otros rizobios. Un ejemplo lo constituye el pSym presente en muchos de los rizobios que nodulan la judía. La mayor diversidad de *R. etli*, simbionte de la judía, se encuentra en Mesoamérica, centro de diversificación de esta leguminosa. Sin embargo, las judías son noduladas en Europa por miembros de varias especies entre las que se encuentra *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Estudios genéticos poblacionales han demostrado que mientras los cromosomas de *R. leguminosarum* bv. phaseoli y de *R. etli* son diferentes, sus pSyms son similares. Estos resultados sugieren que quizás el *R. leguminosarum* bv. phaseoli se originó mediante la transferencia del pSym de *R. etli* a un *R. leguminosarum* europeo, con la importación de la judía tras el descubrimiento de América (Segovia *et al.*, 1993). Posteriormente, se han identificado otros rizobios europeos portadores de este tipo de pSym, tales como *R. gallicum* bv. phaseoli y *R. giardinii* bv. phaseoli (Herrera-Cervera *et al.*, 1999).

La información derivada de los plásmidos Ti de *Agrobacterium* constituye el sistema conceptual más útil. Estos plásmidos son interesantes de estudiar debido a que poseen dos sistemas conjugativos completos. Uno de ellos (el sistema *tra/trb*) es el responsable de la conjugación del plásmido Ti entre células bacterianas. El otro sistema (el sistema *vir*) transfiere un segmento del plásmido Ti (el ADN-T) a células vegetales, conduciendo a la formación de tumores. En el sistema *tra/trb* las funciones de transferencia del ADN (Dtr) están codificadas en dos operones que se transcriben divergentemente (*traCDG* y *traAFB*) (Figura INT5), mientras que las funciones para la formación del poro conjugativo (Mpf) están codificadas por el operón *traI-trbBCDEJKLFGHI*, donde *traI*, *traR* y *traM* son los reguladores del sistema. En el sistema *vir*, las funciones Dtr están codificadas por los genes *virD1*, *virD2*, *virD4*, *virE1* y *virE2*, y las funciones Mpf están localizadas en el operón *virB1-virB11*. El sistema está regulado por los productos de los genes *virA* y *virG* (Figura INT5). El

análisis de los genomas disponibles de rizobios ha revelado la existencia de genes homólogos a funciones Dtr/Mpf del plásmido pTiC58 de *A. tumefaciens*.

El plásmido **pNGR234a** presenta tanto un sistema Dtr (incluido el *oriT*) como un sistema Mpf muy similares al sistema que media la transferencia conjugativa del plásmido Ti entre bacterias, con la diferencia de que el gen *trbE* se encuentra dividido en 2 ORFs en el rizobio, *trbEa* y *trbEb*, así como el hecho de que, mientras que las regiones Dtr (genes *tra*) y Mpf (genes *trb*) están separadas unas 100 Kb en pTiC58, en pNGR234a se encuentran contiguas.



**Figura INT5. Representación de las regiones Dtr de plásmidos e islas simbióticas de distintas bacterias del orden Rhizobiales; *oriT*, origen de transferencia.**

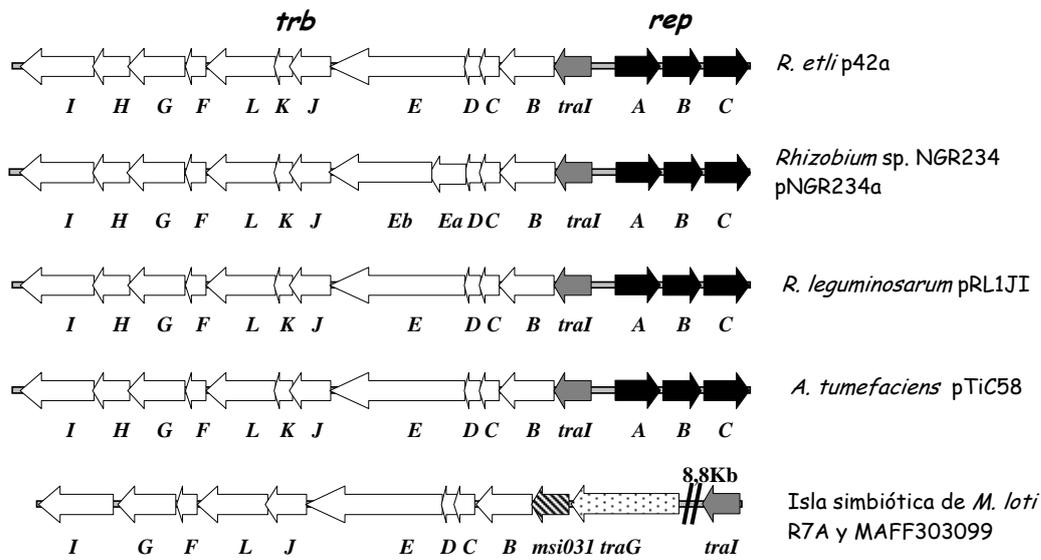
En *R. etli* CFN42, el plásmido autoconjugativo **p42a** porta un sistema *tra/trb* completo con homología al de pTiC58. También presenta un sistema de regulación de la transferencia de tipo quorum-sensing, con la presencia de cuatro genes reguladores (*traI*, *traR*, *cinR* y *traM*) (Tun-Garrido *et al.*, 2003). La secuencia de este plásmido también revela funciones Mpf de un sistema *trb* (*trbB*, -C, -D, -E, -J, -K, -L, -F, -G, -H, e -I) (Li *et al.*, 1998). El plásmido

simbiótico de *R. etli*, **p42d**, presenta una región Dtr que contiene claros homólogos a los genes *traA* y *traCDG*, así como un *oriT* del mismo tipo que el presente en el plásmido no tumorigénico pAtC58 (Figura INT5). Sin embargo, no se han encontrado homólogos a los genes *traB* y *traF*; *traB* no es esencial para la conjugación de pTiC58 y *traF* estrictamente hablando es una función Mpf y no Dtr. p42d no presenta un operón tipo *trb* a diferencia de pTiC58, siendo en principio un operón tipo *virB* (*virB1-virB11*), homólogo al presente en pAtC58 de *A. tumefaciens*, el único sistema Mpf posible para este plásmido (González *et al.*, 2003) (Figura INT6).

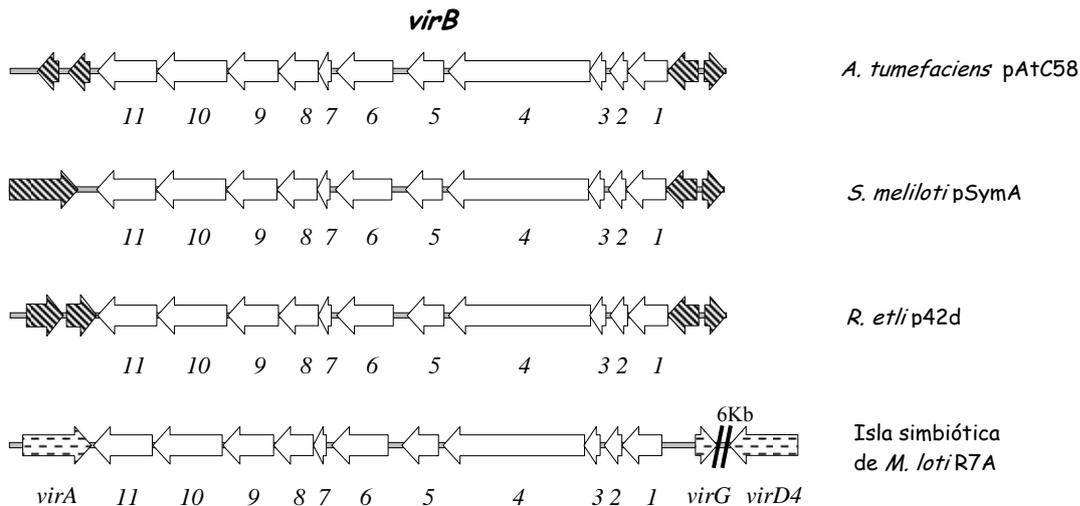
El **pSymA** de *S. meliloti* muestra una región que contiene claros homólogos a *traA* y *traCDG*, así como una secuencia *oriT* de tipo RSF1010 (Figura INT5) (Barnett *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001). No se encuentran homólogos para *traB* y *traF*. El operón *trb* está ausente también en pSymA. La función Mpf se llevaría a cabo por un sistema de tipo *virB* codificado en el operón *SMA1322-virB1-virB11*, localizado a más de 200kb de distancia del operón *traA* y *traCDG* (Figuras INT6). Para la autotransferencia conjugativa de pSymA debe existir una cooperación entre estos dos sistemas, como la transferencia conjugativa de pAtC58 que ocurre mediante la cooperación de un sistema *traA* y *traCDG* y un sistema *avhB*, parecido al sistema *virB* en cuanto a nivel de organización de genes y proteínas (Chen *et al.*, 2002). Por su parte, el plásmido **pSymB** de *S. meliloti* tan sólo presenta un homólogo a *traA*, así como un *oriT* adyacente a éste, sin que hayan sido identificados otros genes *tra* o algún T4SS en su secuencia (Figura INT6).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae*, la transferencia del plásmido autoconjugativo **pRL1JI**, depende del operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* (Figura INT6). Aguas abajo de este operón hay un gen denominado *bisR* y un homólogo a *traR*, denominado *triR*. Mutaciones en *traI*, *bisR* o *triR* reducen la transferencia conjugativa de pRL1JI. La transferencia de pRL1JI responde a una serie de sistemas de quorum-sensing codificados por el propio plásmido y por el cromosoma de la cepa (Wilkinson *et al.*, 2002). Un análisis de las N-acil-homoserina lactonas producidas por la cepa A34 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* permitió la caracterización de cuatro homoserina lactonas sintetas tipo LuxI (RhiI, CinI, RaiI y TraI) y cinco reguladores tipo LuxR (RhiR, CinR, RaiR, TraR y BisR) (Lithgow *et al.*, 2000; Wisniewski-Dye *et al.*, 2002). Se ha visto que CinS también interviene en la regulación por quórum sensing (Edwards *et al.*, 2009).

A)



B)



**Figura INT6. Regiones Mpf. Representación de regiones *trb* A) y *virB* B) de plásmidos e islas simbióticas de distintas bacterias del orden Rhizobiales.**

La región de transferencia de las **islas simbióticas de *M. loti* R7A y MAFF303099** también presenta ciertas similitudes con la región *trb* del pTiC58. Ambas islas portan un operón *trb* prácticamente completo, con la excepción de los genes implicados en el sistema de regulación de la transferencia *traI* y *traR* (los cuales se localizan en otro lugar distante en ambas islas), y no presentan homólogos a los genes *trbK* y *trbH* (Figura INT6A). Aunque *trbK* no es esencial para la transferencia de pTiC58, *trbH* sí lo es. Además del sistema *trb*, la isla de *M. loti* R7A también porta un sistema *virB* (Figura INT6B). Ya que al menos la isla de

*M. loti* R7A parece ser autoconjugativa, la ausencia de *trbH* no parece ser un problema en la transferencia de dicha isla simbiótica. Aunque el Mpf de estas islas simbióticas es similar al del plásmido pTiC58, sus regiones Dtr son muy diferentes al de éste. Ambas islas presentan un gen homólogo a *traG*, pero alejado de la hipotética región Dtr, formada por 5 genes (*msi106-msi110*) incluyendo *traF*, en la isla de *M. loti* R7A (Figura INT5). La función de la mayoría de estos genes es desconocida aunque *msi106* presenta cierta homología con VirD2, relaxasa implicada en la transferencia del ADN-T de pTiC58, por lo que ha sido propuesta como la hipotética relaxasa de esta isla simbiótica (Sullivan *et al.*, 2002). Esta región Dtr se encuentra presente de forma análoga en pMLb y en la isla simbiótica de la cepa MAFF303099 aunque en este último caso esta región parece estar interrumpida por el gen de una transposasa. Fuera de la isla simbiótica MAFF303099, se localizan genes que presentan homologías con otros genes de transferencia, tales como *traA* (*mll0964* y *mll5729*) y *traD* (*mll0965*).

### 5.3. Mecanismos de regulación de la transferencia conjugativa

Como ocurre en casi todos los procesos biológicos más o menos complejos que conllevan un gasto de energía considerable, los sistemas de transferencia conjugativa suelen presentar un sistema de regulación que permite minimizar el coste metabólico del hospedador, así como optimizar las ventajas adaptativas de la transferencia. El conocimiento de estos circuitos regulatorios es crucial para determinar las relaciones existentes entre las condiciones ambientales y la eficiencia de transferencia genética conjugativa.

Las dificultades en el estudio de la transferencia de plásmidos de rizobios están principalmente ligadas a las bajas frecuencias relativas de la transferencia de plásmidos observadas en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los datos derivados del análisis de secuencias de genomas, junto con datos experimentales permiten predecir el funcionamiento de la transferencia de plásmidos. La organización de los genes de los sistemas conjugativos de los rizobios son en muchos casos similares a los descritos para el plásmido pTi de *A. tumefaciens*, lo cual no de extrañar dato que esta bacteria también pertenece a la familia *Rhizobiaceae*.

### 5.3.1. Regulación del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*

El plásmido Ti codifica dos sistemas de transferencia de ADN. El sistema *vir*, que transfiere el ADN-T a células vegetales (unas 20 Kb del plásmido Ti) y el sistema *tra/trb*, responsable de la transferencia del plásmido Ti entre bacterias (Clewel, 1993). Existen dos tipos de plásmidos Ti que han sido bien estudiados: el tipo nopalina/agrocinopina (por ejemplo, pTiC58) y el octopina/manitolopina (por ejemplo, pTiR10). Ambos tipos presentan sistemas de transferencia virtualmente idénticos, cuyos componentes han demostrado ser funcionalmente intercambiables (Cook y Farrand, 1992; Cook *et al.*, 1997).

#### 5.3.1.1.- Regulación del sistema de transferencia conjugativa

*A. tumefaciens* posee un sistema de conjugación regulado por quorum-sensing muy bien estudiado en el plásmido inductor de tumores pTi (Farrand, 1998). Se denomina quorum-sensing al fenómeno por el cual una población bacteriana es capaz de regular actividades celulares en respuesta a la densidad de población. Algunos ejemplos bien caracterizados incluyen bioluminiscencia, expresión de factores de virulencia, formación de biofilms, síntesis de exopolisacáridos y transferencia de plásmidos (Ding y Hynes, 2009). En proteobacterias, la forma más común de quorum-sensing es mediada por moléculas conocidas como N-acil-homoserina lactonas (AHLs). Los grupos acilo en dichos compuestos permiten la especificidad de distintos sistemas quorum-sensing. En *A. tumefaciens*, la AHL sintasa TraI dirige la síntesis del autoinductor N-3-oxo-octanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL). A baja densidad de población, la 3-oxo-C8-HSL difunde fuera de las células y se diluye rápidamente. Cuando la densidad de población aumenta, la 3-oxo-C8-HSL se acumula intracelularmente, se une a TraR que se activa y actúa como un activador transcripcional de la transcripción de genes diana incluyendo *traAFB*, *traCDG*, los operones *traI-trb*, los genes *rep* y *traM* (Farrand, 1998; McAnulla *et al.*, 2007).

TraR es un miembro de la familia LuxR, formada por activadores de la transcripción génica que son activados por AHLs. La regulación de TraR es compleja y ocurre a nivel de transcripción, plegamiento de proteínas, resistencia a proteólisis y formación de estructuras cuaternarias con otras subunidades de TraR. Además del sistema de quorum-sensing, la transferencia del plásmido Ti requiere la presencia de las opinas secretadas por la planta. Las opinas, cuya biosíntesis está codificada por el ADN-T transferido de la bacteria a la planta durante la infección, además de servir como nutrientes para el desarrollo de la población

bacteriana, también sirve como señal química para activar la transferencia conjugativa del plásmido. Por tanto, la activación de la expresión de *traI* por los complejos TraR-3-oxo C8 HSL representan una retroalimentación positiva, como se describe para otros sistemas tipo LuxR-LuxI (Whitehead *et al.*, 2001).

En los plásmidos Ti tipo nopalina, *traR* es el cuarto gen en el operón de 5 genes *arc* que se transcribe divergentemente desde el operón *acc* (Beck von Bodman *et al.*, 1995). El regulador transcripcional AccR está codificado por el primer gen del operón *acc*. Los otros miembros del operón son requeridos para el catabolismo de las opinas, la agrocinopina A y B. En presencia de agrocinopina A o B, la represión de los operones *arc* y *acc* por AccR es menor, resultando la transcripción de todos los genes de estos operones, incluyendo a TraR (Beck von Bodman *et al.*, 1992; Piper *et al.*, 1999).

En los plásmidos Ti tipo octopina, la opina conjugativa es octopina. La octopina se une a su diana intracelular, el regulador transcripcional OccR, resultando en la activación del operón *occ* (Fuqua y Winans, 1996). El gen *traR* está en el extremo distal de este operón, mientras que algunos genes necesarios para la captación y catabolismo de las opinas se localizan aguas arriba de *traR* (Fuqua y Winans, 1996). Cuando *traR* se expresa desde un promotor constitutivo, la conjugación ya no requiere octopina. Por tanto, la regulación de la expresión de *traR* por OccR explica completamente el requerimiento de octopina para la conjugación del plásmido Ti (Figura INT7).

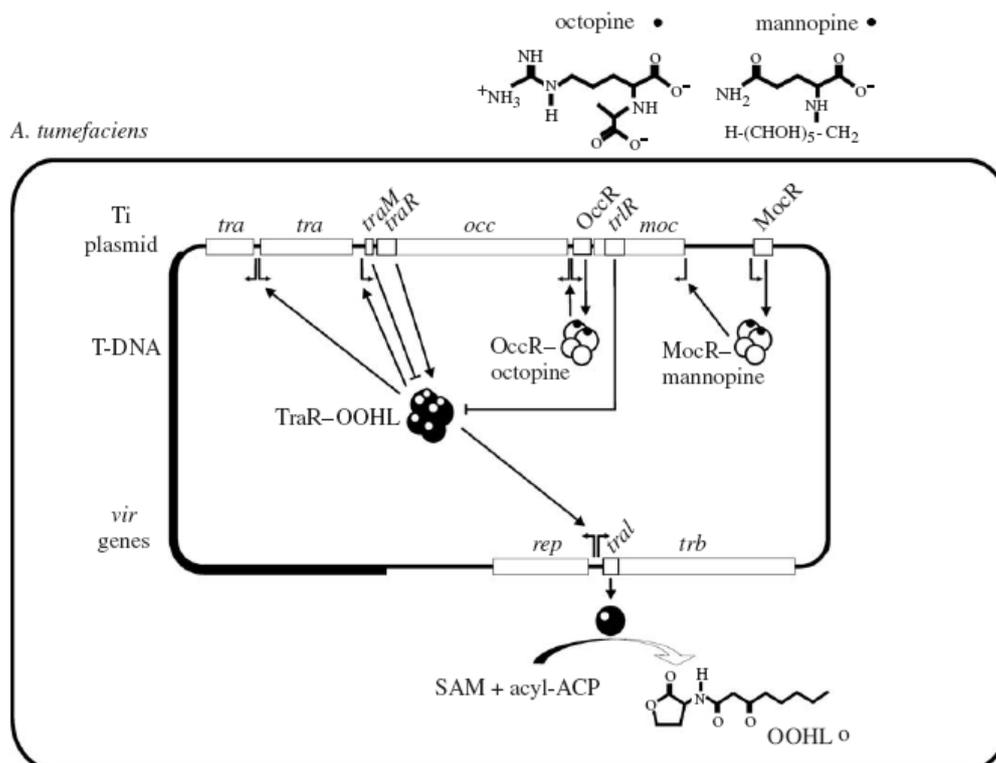
El control de la expresión por opinas, por tanto, ha evolucionado independientemente en estos dos tipos de plásmidos Ti. Los genes del operón *arc* y *occ* no son similares, excepto para *traR*. Además, *traR* es el único gen en cada uno de estos operones que se requiere para la conjugación (Fuqua y Winans, 1996; Piper, 1999).

Los reguladores de los operones *occ* y *arc* son también diferentes. OccR es un activador transcripcional tipo LysR, que se une al promotor de ADN tanto en presencia como en ausencia de señal inductora (Wang *et al.*, 1992). El ligando se une a proteínas tipo LysR y el resultado es un cambio en el ángulo de curvatura en el ADN hacia una curvatura más relajada, permitiendo a la ARN polimerasa unirse al promotor (Schell 1993; McFall *et al.*, 1998). Se ha demostrado *in vitro* que en respuesta a octopina se produce una unión directa entre OccR y el promotor y se produce un cambio de conformación de ADN-OccR (Wang *et al.*, 1992). Por el contrario, AccR es parecido a un represor Lac: la unión de señales

inductoras a esta proteína produce un cambio conformacional que perturba su unión al ADN, lo que produce desrepresión de la expresión génica (Lewis 2005).

Existen evidencias de que TraR es una proteína no estructurada y requiere de 3-oxo-C8 HSL para estabilizarse y acumularse *in vivo*. Cuando TraR se sobreexpresa fuertemente en *E. coli* o *A. tumefaciens* se acumula, pero forma cuerpos de inclusión insolubles. Los datos que se describen arriba sugieren que si se induce la producción de 3-oxo-C8-HSL, TraR se estabiliza en la célula y puede activar la transcripción de genes diana (Zhu y Winans, 1999, 2001). Sin embargo, la actividad de complejos estables de TraR-3-oxo-C8-HSL puede ser todavía inhibida directamente por las proteínas TraM y TrlR. Una mutación que anule al gen *traM* produce una hiperconjugación del plásmido pTi a baja densidad de población (Piper y Farrand, 2000). El efecto de anti-activación de TraM se produce mediante la interacción proteína-proteína directa con los complejos TraR-3-oxo-C8 HSL (Hwang *et al.*, 1999; Swiderska *et al.*, 2001). TraM inhibe a TraR mediante una interacción proteína-proteína que ocurre entre las regiones C-terminales de ambas proteínas. Existen varios estudios para explicar la forma en que TraM recluta a TraR aunque aún no ha quedado del todo claro. Los estudios llevados a cabo por Cheng y colaboradores (2004) sugieren que los monómeros de TraR se unen a uno o dos monómeros de TraM, mientras que los resultados de otro estudio (Vanini *et al.*, 2004) indicarían que dos dímeros de TraR se unen a dos dímeros de TraM. En los plásmidos tipo nopalina y tipo octopina, se ha demostrado que el gen TraM se activa por TraR en presencia de 3-oxo-C8-HSL, lo que resulta en un sistema de retroalimentación negativa (Fuqua *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1995).

El gen *trlR* se piensa que se formó originariamente por un evento de duplicación del gen *traR* (Oger *et al.*, 1998). Es igual a TraR excepto por un cambio en el marco de lectura aguas arriba del dominio C-terminal de unión a ADN. La similitud de los extremos N-terminales de ambas proteínas sugiere que la inactivación de TraR se produciría por la formación de heterodímeros (que podrían tener un solo dominio de unión de ADN en vez de dos). Como TraR, TrlR requiere 3-oxo-C8-HSL para su solubilización, y se han visto heterodímeros inactivos de TrlR-TraR *in vitro* usando proteínas purificadas (Chai *et al.*, 2001). Sin embargo, se han identificado en varios plásmidos Ti tipo octopina genes idénticos a *trlR*, lo que indica que la alteración del gen no es un artefacto producido en el laboratorio (Zhu y Winans, 1998).



**Figura INT7. Modelo de sistema de quorum-sensing en plásmidos Ti tipo octopina.** El gen *traR* es transcrito en respuesta a octopina y se une a 3-oxo-C8 HSL, la señal de quorum-sensing producida por TraI. Los complejos TraR-3-oxo-C8 HSL activan la transcripción de *traM* y los operones *tra*, *trb* y *rep* del plásmido Ti. Los complejos TraR-3-oxo-C8 HSL pueden ser inactivados a través de interacciones directas con TraM y TrlR. La transcripción de *trlR* es activada por MocR en respuesta a manopina. Extraído de White y Winans (2007).

### 5.3.2. Regulación de la transferencia conjugativa en *Rhizobium*

Se han descrito varios pSyms con capacidad autoconjugativa tales como los plásmidos pRL1JI (Johnston *et al.*, 1978) y pRL5JI (Brewin *et al.*, 1980) de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, el plásmido pSym5 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hooykaas *et al.*, 1981) y pRP2JI de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Lamb *et al.*, 1982). En otros casos las frecuencias de transferencia son prácticamente indetectables ( $10^{-9}$ ), como es el caso del plásmido pNGR234a (Freiberg *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003). Se ha visto que en los plásmidos crípticos la capacidad autoconjugativa es más patente, como es el caso de los plásmidos pRL8JI y pIJ1001 de *R. leguminosarum* 300 (Johnston *et al.*, 1982), pRleVF39a y pRleVF39b de *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 (Hynes *et al.*, 1988), pRme41a de *S. meliloti* Rm41 (Huguet *et al.*, 1983), pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 (Mercado-Blanco y Olivares, 1993) y el plásmido pRetCFN42a de *R. etli* CFN42 (Brom *et al.*, 2000). También se ha visto que alguno de estos plásmidos pueden favorecer la transferencia de otros plásmidos presentes en la misma cepa

mediante procesos de cotransferencia, como es el caso del plásmido pRmeGR4a, que puede movilizar al plásmido pRmeGR4b (Mercado-Blanco y Olivares, 1993; Herrera-Cervera *et al.*, 1996) o el plásmido pRetCFN42a de *R. etli* CFN42 el cual cotransfiere al plásmido simbiótico de la cepa mediante un proceso de cointegración entre ambos plásmidos (Brom *et al.*, 2000; Tun-Garrido *et al.*, 2003).

En cuanto a la transferencia de las islas simbióticas, se ha detectado tanto en condiciones naturales como en laboratorio la transferencia de la isla simbiótica de *M. loti* R7A (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998), no habiéndose detectado la transferencia conjugativa de otros elementos tales como la isla simbiótica de *B. japonicum* USDA110, de la cual se piensa que ha perdido su capacidad conjugativa (Kaneko *et al.*, 2002). En los mesorizobios que forman simbiosis con *Biserrula*, los genes simbióticos se encuentran en una isla simbiótica móvil que se integra en un gen que codifica el ARNt de la fenilalanina (Nandasena *et al.*, 2006), mientras que no se encontró en *M. ciceri*. Además, la isla simbiótica de los mesorizobios de *Biserrula* contiene un gen que codifica un fago P4-como integrasa (*intS*) que es responsable de la escisión y la inserción de las islas de simbiosis (Nandasena *et al.*, 2006)

Los megaplásmidos e islas simbióticas de estas bacterias, salvo excepciones, no suelen presentarse como elementos autoconjugativos en condiciones de laboratorio, o su transferencia ocurre a frecuencias muy bajas. Esto se puede explicar por la existencia de sistemas de regulación de la transferencia. Los plásmidos de los rizobios se dividen en dos grupos dependiendo de la regulación de su transferencia conjugativa. El primer grupo incluiría a los plásmidos regulados por sistemas de quorum-sensing, donde encontramos plásmidos como pRetCFN42a (el plásmido más pequeño de la cepa CFN42 de *R. etli*), pRL1JI (plásmido simbiótico de la cepa 248 de *R. leguminosarum*) o pNGR234a (plásmido de menor tamaño de la cepa NGR234 de *Rhizobium* sp.). El segundo grupo lo componen aquellos plásmidos regulados por RctA: pRetCFN42d (el pSym de *R. etli*), pATC58 de *A. tumefaciens* y pSymA de *S. meliloti* 1021 (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Ding y Hynes (2009) proponen un tercer grupo de plásmidos conjugativos, en el que se incluyen los siguientes plásmidos: pRL10, pRL11, PRL12JI, pRleVF39d, pRleVF39e y pRleVF39f (todos ellos de *R. leguminosarum* bv. *viciae*) que podrían ser diferentes a los dos tipos conocidos de plásmidos conjugativos en términos de regulación y organización, si bien no existen datos experimentales que apoyen dicha hipótesis. Recientemente, Ding y colaboradores (2013) han

llevado a cabo la caracterización de un cuarto sistema de conjugación de plásmidos rizobiales, en el que se encontraría el plásmido pRleVF39b de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, y que sería autotransmisible. Parece haber una cierta correlación entre el tipo de sistemas de transferencia que se encuentra en un plásmido de rizobios y otros atributos del plásmido como su tamaño, su grupo de incompatibilidad o los genes que porta (Crossman *et al.*, 2008). Ninguno de los plásmidos tipo III son autotransmisibles, debido a la falta de un componente Mpf. Análisis filogenéticos muestran que las relaxasas de pSmeLPU88b de *S. meliloti* LPU88, pSmed03 de *S. meliloti* WSM419, pSmeGR4a de *S. meliloti* GR4, pSmeSM11c de *S. meliloti* SM11 y pRleVF39b de *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM forman un grupo filogenético diferente y por tanto fueron llamados relaxasas tipo IV (Giusti *et al.*, 2012). pRleVF39b, a diferencia de pRleVF39a, no porta ningún sistema de conjugación similar a pRL8JI de *R. leguminosarum* 3841. Los requerimientos necesarios para la transferencia de pRleVF39b son un set completo de genes del Mpf, un gen *traG*, una relaxasa *traA*, todos ellos necesarios para la transferencia conjugativa del plásmido. Además parece tener dos posibles orígenes de transferencia dentro de ésta agrupación de genes. Además, se ha encontrado un gen regulador *trbR* que reprime la expresión de genes y, por tanto, la transferencia conjugativa (Ding *et al.*, 2013).

Además de la transferencia de plásmidos dependiente de quorum-sensing o del sistema RctA/RctB, se ha descrito que la transferencia de ciertos plásmidos de rizobios puede ser dependiente de otros factores, como factores nutricionales. Un ejemplo de esto se encuentra en la transferencia de plásmidos no simbióticos de *S. meliloti* GR4, cuya transferencia está regulada por amonio. Se ha determinado que la transferencia del plásmido pRmeGR4a y vinculada a éste la del plásmido pRmeGR4b, se inhibe en presencia de amonio (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). Esta inhibición no parece deberse a un efecto sobre el crecimiento del donador o del receptor, ni parece afectar a la transferencia de otros plásmidos. El efecto inhibitorio ejercido por el amonio parece actuar a nivel del receptor ya que sólo ha sido observado cuando se usa como receptor *S. meliloti*, no viéndose efecto alguno cuando el receptor es *A. tumefaciens* (Herrera-Cervera *et al.*, 1996).

#### 5.3.2.1. Sistemas conjugativos regulados por quorum-sensing

La isla simbiótica de *M. loti* **R7A** contiene genes para el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno y es considerada como un elemento integrativo y autotransferible por conjugación. Se han definido recientemente un conjunto de islas

genómicas móviles, denominándolas “elementos integrativos y conjugativos o ICEs” (Burrus *et al.*, 2002; Burrus y Waldar, 2004), que son capaces de escindirse desde el cromosoma y transferirse a células receptoras mediante conjugación y (re)integrarse en un sitio específico tanto en el donador como en el receptor. Las 502 Kb de la ICE de *M. loti* se insertan aguas arriba del gen *phe-tRNA* en el cromosoma de *M. loti* y está flanqueada por repeticiones directas de 17 pb que representan la secuencia central del sitio de integración (Sullivan y Ronson, 1998). La isla simbiótica ICE*MISym*<sup>R7A</sup> contiene 400 marcos abiertos de lectura (ORF), incluyendo un gen en su extremo izquierdo *intS* que codifica una integrasa parecida al fago P<sub>4</sub> requerida para la integración y escisión de la isla (Sullivan *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2006).

Como otras ICEs, ICE*MISym*<sup>R7A</sup> se escinde del genoma y forma un intermediario circular previo a la transferencia conjugativa. Para una escisión y transferencia conjugativa eficientes se requiere la codificación por parte de ICE*MISym*<sup>R7A</sup> de una serie de factores de direccionalidad RdfS así como de IntS (Ramsay *et al.*, 2006). Existe un agrupamiento de genes conservados que contiene homólogos a los genes RdfS junto con genes que codifican homólogos de TraF y la relaxasa RlxS en muchas supuestas islas genómicas en  $\alpha$  y  $\beta$ -Proteobacterias (Ramsay *et al.*, 2006). Muchas de estas islas contienen también un cluster de genes *trb* con la misma organización que el cluster *trb* encontrado en ICE*MISym*<sup>R7A</sup> (Sullivan *et al.*, 2002; Toussaint *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2006) que se requiere para la transferencia conjugativa.

La porción de células en las que se escinde ICE*MISym*<sup>R7A</sup> durante el cultivo en medios de cultivo de laboratorio varía dependiendo de la fase de crecimiento, siendo mayor en fase estacionaria (Ramsay *et al.*, 2006). Esta observación sugiere que la escisión debe regularse en respuesta a fase de crecimiento o densidad celular. ICE*MISym*<sup>R7A</sup> codifica un hipotético gen de la familia LuxR, que se denomina *traR*, y dos hipotéticas AHL sintasas *traI1* y *traI2* (Sullivan *et al.*, 2002), que muestran homología con las proteínas TraR y TraI de *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* que regulan la transferencia de plásmidos vía quorum-sensing (White y Winans, 2007; Danino *et al.*, 2003). Los genes *traR* y *traI2* se localizan aguas arriba y en la misma orientación como dos hipotéticos ORF, *msi172* y *msi171*, mientras que el gen *traI1* se localiza a 162 Kb en un operón monocistrónico (Sullivan *et al.*, 2002). Si introducimos un plásmido que expresa *traR* y *traI2* en *M. loti* R7A, se produce un 100% de escisión de ICE*MISym*<sup>R7A</sup> de las células y se produce un aumento de la producción

de AHL, lo que sugiere que la escisión se regula por quorum-sensing (Ramsay *et al.*, 2009). Si se introduce *traR* solo en un plásmido se produce el 100% de escisión y se aumenta 1000 veces la síntesis de 3-oxo-C6-HSL. Ambos fenotipos son dependientes de la presencia de una copia funcional de *traI*. A su vez, la actividad de TraR es inhibida por el antiactivador QseM, codificado en el operón *qseCM*, cuya expresión es regulada por QseC (Ramsay *et al.*, 2013). *qseCM* podrían representar un conmutador bimodal, presente en muchas otras ICEs y plásmidos, que restringe la capacidad de excisión de la ICE a una pequeña proporción de células de la población bacteriana (Ramsay *et al.*, 2013), lo que explica que en condiciones de laboratorio, los niveles de excisión y transferencia de la ICE sean generalmente bajos.

Como se comentó anteriormente, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* existen al menos 4 genes responsables de la producción de 4 N-acil-homoserina lactonas diferentes. Los genes *cinI* y *raiI* presentan una localización cromosómica, mientras que *rhlI* y *traI* se localizan en pRL1JI (el plásmido simbiótico de la cepa; Lithgow *et al.*, 2000). *CinI* es responsable de la producción de N-(3-hidroxi-7-cis-tetra-decenoil)-L-homoserina lactona (3OH-C14-HSL), y su expresión está regulada por *CinR* (Lithgow *et al.*, 2000; Wisniewski-Dye' *et al.*, 2002). *CinI* y *CinR* parecen encontrarse en la zona alta del sistema regulador activando la producción del resto de N acil-homoserina lactonas. Se ha demostrado que la presencia del plásmido simbiótico pRL1JI reduce la expresión de *cinI*. Sin embargo, son necesarias mutaciones en *cinI* tanto en el donador como en el receptor para ocasionar una reducción drástica en la frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico de la cepa (desde  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ; Lithgow *et al.*, 2000). *raiI* y *raiR* son necesarios para la producción de N-acil-homoserina lactonas. Se localizan adyacentes a los genes *dad* (implicados en el catabolismo de la D-alanina). *RaiR* es un regulador de quorum-sensing tipo LuxR, necesario para la expresión de *raiI*. El gen *raiR* se expresa a un nivel basal, posiblemente desde un promotor constitutivo, y su expresión se incrementa bajo la influencia del promotor de *raiI*, situado aguas arriba. Los genes *cinI* y *cinR* influyen en la expresión del gen *raiI* (mutantes en dichos genes hacen caer sus niveles de expresión). Por tanto, los genes *raiIR* y *cinIR* forman parte de un complejo regulatorio que interviene en la biosíntesis de N-acil-homoserina lactonas en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Wisniewski-Dye' *et al.*, 2002). Se requiere un regulador tipo LuxR para aumentar la expresión de *raiR* y *RaiR* se necesita para inducir a *raiI*. Si la expresión de *raiR* (y *raiI*) se reduce en mutantes de quorum-sensing en los genes *cinI* y *cinR*, se podría pensar que la falta de N-acil-homoserina lactona sintetizada por *CinI* es la causa, pero si se añade, no se mejora

la expresión. La baja expresión de *raiR* en mutantes en *cinI* y *cinR* se une a la pérdida de expresión de *cinS*, situado inmediatamente aguas abajo a *cinI*. El gen *cinS* actúa por inducción de *raiR* y *rhiR*, aguas abajo de *expR*. Ejerce su inducción uniéndose al regulador transcripcional PraR, que reprime la expresión de los genes *raiR* y *rhiR*. PraR se une a los promotores de *raiR* y *rhiR* y CinS desplaza a PraR de esos promotores activando la transcripción de los genes (Frederix *et al.*, 2011). ExpR induce la expresión de los genes *raiR* y *rhiR* reprimiendo la transcripción de *praR* (Frederix *et al.*, 2011). Además, CinS y ExpR actúan incrementando los niveles de PhyB (exopolisacárido glicanasa), alterando la superficie bacteriana. *cinS* se conserva en otros rizobios, incluyendo a *R. etli* y es necesario para swarming (Edward *et al.*, 2009).

La transferencia de pRL1JI depende del operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* presente en este plásmido. Aguas abajo de este operón se localiza *bisR*, así como un homólogo a *traR* (Wilkinson *et al.*, 2002). TraI es una acil-homoserina lactona sintetasa que produce 3O-C<sub>8</sub>-HSL, mientras que BisR y TraR son los reguladores del sistema. BisR es un represor de *cinI* y por tanto reduce la producción de 3OH-C<sub>14</sub>-HSL; por otra parte, TraR activa el operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* en presencia de 3OH-C<sub>14</sub>-HSL (producido por TraI), y por tanto la transferencia conjugativa de pRL1JI (Wilkinson *et al.*, 2002). Recientemente se ha puesto de manifiesto el importante papel que desempeña el receptor en este sistema de regulación a través de BisR. De esta forma, los potenciales receptores estarían produciendo altos niveles de 3OH-C<sub>14</sub>-HSL (debido a la ausencia de pRL1JI y por tanto de BisR, el cual inhibiendo a *cinI* disminuye los niveles de 3OH-C<sub>14</sub>-HSL). Esto generaría una activación de la expresión de *traR* cuyo producto activaría el operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* y por tanto la transferencia del plásmido. Sin embargo, en ausencia de potenciales receptores, los niveles de 3OH-C<sub>14</sub>-HSL en el donador son bajos, lo que en última instancia mantiene inhibida la transferencia del pRL1JI. TraM cooperaría con esta inhibición de la transferencia en ausencia de receptores adecuados, cuando existen bajos niveles de TraR, probablemente interactuando directamente con esta proteína e impidiendo la activación del operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* (Danino *et al.*, 2003).

El plásmido **pNGR234a** presenta un sistema de regulación dependiente de quorum-sensing análogo al de *A. tumefaciens*, con la presencia de los genes *traI*, *traR* y *traM* localizados cerca de los genes *trb*. Sin embargo, aunque algunos operones tales como *traCDG* y *traI-trb* son fuertemente activados por TraR en condiciones inductoras, no se ha detectado la

activación del operón *traAFB* por esta proteína. De hecho, aunque aparentemente este plásmido es autoconjugativo (Freiberg *et al.*, 1997), dicha capacidad es difícil de reproducir en condiciones de laboratorio (He *et al.*, 2003).

En *R. etli* CFN42, pRetCFN42a presenta un sistema de regulación de la transferencia de tipo quorum-sensing, con la presencia de los genes *traI*, *traR*, *cinR* y *traM*. La expresión de los genes *tra/trb* depende de la acción de TraR y CinR, así como de la presencia de una acil-homoserina lactona (3O-C<sub>8</sub>-HSL) sintetizada por TraI. Aunque la expresión de *traR* es constitutiva, la expresión de *cinR* depende de la funcionalidad del gen *traI*. No se detecta expresión del gen *traM* en condiciones experimentales, por lo tanto parece que la transferencia conjugativa de p42a está desreprimida, lo que podría explicar su alta tasa de transferencia en condiciones de laboratorio (Tun-Garrido *et al.*, 2003).

En la cepa de *S. meliloti* AK631, el plásmido autoconjugativo pRm41a porta un locus *traR/traM*, que aparentemente participa en la regulación de su propia transferencia mediante quorum-sensing. Aguas arriba de estos genes se localizan homólogos de al menos *trbI* y *trbH*, lo que sugiere la existencia de una organización similar a la encontrada en pTiC58 y pNGR234a (Marketon y González, 2002).

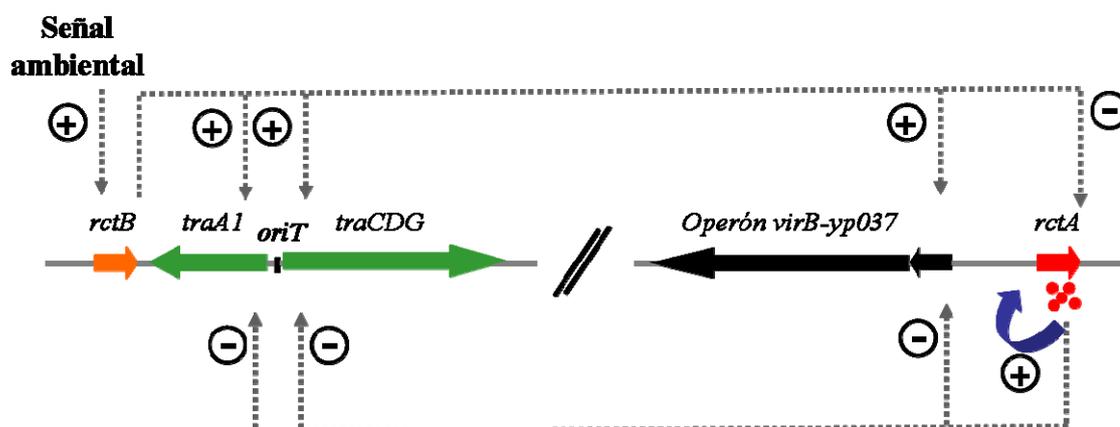
#### 5.3.2.2. Sistemas conjugativos regulados por el sistema RctA

Tal y como se ha expuesto, el control por quorum-sensing de la transferencia conjugativa de plásmidos en rizobios parece ser bastante común. Sin embargo, esto no significa que sea el único sistema de regulación de la transferencia en este grupo bacteriano, ya que algunos plásmidos simbióticos que carecen de un sistema tipo quorum-sensing, tales como los de *S. meliloti* y *R. etli*, presentan un hipotético sistema conjugativo completo. A pesar de ello, la transferencia conjugativa de estos plásmidos simbióticos no se observa en las condiciones habituales de laboratorio. En el caso particular de *R. etli*, la transferencia del plásmido simbiótico p42d fue por mucho tiempo considerada como un fenómeno de cointegración con el plásmido críptico autotransmisible p42a (Tun-Garrido *et al.*, 2003). La demostración de la funcionalidad de la región *mob* y la identificación del gen *yp028* (*rctB*) como un posible activador de la transferencia conjugativa, llevó a la primera evidencia de que este plásmido es autotransmisible (Pérez-Mendoza *et al.*, 2004). Así mismo, se identificó otro gen, *rctA*, como elemento esencial de un sistema regulador que mantendría silenciada la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* en condiciones de laboratorio

(Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). RctA es requerida para mantener niveles bajos de expresión de los genes de la transferencia conjugativa en este plásmido. Al contrario que los genes de transferencia, la expresión de *rctA* en condiciones de laboratorio es alta y parece ser autorregulada positivamente, como se deduce de los bajos niveles de expresión observados en un mutante RctA<sup>-</sup>.

El producto del gen *rctA* pertenece a la subfamilia de proteínas con un dominio de unión a ADN en “hélice alada” (winged-helix), la cual incluye un número de activadores y represores transcripcionales. El hecho de que el plásmido p42d mutado en el gen *rctA* muestra autotransmisibilidad a altas frecuencias, indica que la conjugación del plásmido simbiótico puede ser llevada a cabo sólo en condiciones que conducen a la inactivación del producto del gen *rctA* o a una reducción de la expresión del mismo. Este parece ser un requerimiento para que ocurra la expresión de los genes implicados en transferencia conjugativa, *traA* y *traCDG*, así como de los genes *virB* que codifican el sistema Mpf. El gen *rctA* se transcribe divergentemente al operón *virB*, y su producto se une al promotor del operón *virB*, en el que son claves un motivo de 9 pb de la región espaciadora y la región -10, interfiriendo así con la unión de la ARN polimerasa y disminuyendo la transcripción de los genes *virB*. Otra forma de regulación es la que se produce mediante la interferencia de los transcritos que emanan del promotor de *virB* y que modulan la expresión del gen *rctA* (Sepúlveda *et al.*, 2008).

Por otra parte, el gen *rctB* desempeña una importante función dentro de este proceso regulador, de manera que la acción represora de *rctA* se ve reducida en condiciones donde la expresión de *rctB* se ve aumentada, conduciendo a un incremento de la expresión de los genes de transferencia. Se desconoce si el producto de *rctB* reprime directamente la transcripción del gen *rctA* o si interfiere con la actividad de su producto proteico. No obstante, los datos acumulados han permitido proponer un modelo de trabajo para la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* (Figura INT8) (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Se hipotetizó que bajo condiciones no favorables para la conjugación, como por ejemplo las presentes en medios de laboratorio, la alta expresión de *rctA* permite a la célula mantener bajos niveles de expresión de los genes de transferencia conjugativa, de manera que la conjugación del plásmido no ocurre. Bajo condiciones favorables aunque desconocidas, la expresión de *rctB* se incrementaría, conduciendo así a una reducción de la expresión de *rctA* y/o de la actividad de su producto, lo cual resultaría en la expresión de las funciones de transferencia conjugativa y en la transferencia del pSym.



**Figura INT8. Modelo de regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico p42d de *R. etli* CFN42.** Extraído de Pérez-Mendoza *et al.* (2005).

También se ha demostrado que la transferencia del pSymA de *S. meliloti* está sujeta a una represión dependiente de *rctA* en condiciones de laboratorio, por un mecanismo probablemente similar al encontrado para p42d. De igual modo que para el plásmido simbiótico de *R. etli*, el plásmido simbiótico de *S. meliloti* es autoconjugativo únicamente bajo determinadas condiciones, hasta el momento desconocidas, que conllevarían una inhibición de la actividad de RctA (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005).



## **OBJETIVOS**



El uso de inoculantes microbianos para mejorar la nutrición de los cultivos, el control biológico de enfermedades o la biorremediación de suelos contaminados, constituyen tecnologías de gran interés por su impacto positivo sobre la sustentabilidad agrícola y su carácter respetuoso con el medio ambiente. Sin embargo, la liberación masiva de microorganismos al medio ambiente no está exenta de riesgos. Un posible perjuicio sería el impacto que estos inoculantes producirían en las poblaciones microbianas nativas. Por otro lado, el posible uso de microorganismos modificados genéticamente plantea un debate ético en relación a las posibilidades de transferencia genética horizontal desde ciertos productos biotecnológicos y su impacto sobre la salud y el medio ambiente.

La transferencia genética horizontal entre microorganismos es un fenómeno bien reconocido como generador de biodiversidad en cualquier ecosistema, aunque en el caso de productos biotecnológicos sus efectos no han sido bien estudiados. La posibilidad de transferencia genética entre los inoculantes y las poblaciones microbianas nativas es un fenómeno poco explorado que plantea gran incertidumbre en relación a su potencial impacto sobre la biodiversidad existente, sobre la fertilidad de los suelos e incluso sobre la eficacia a largo plazo de dichos inoculantes. Todo esto, unido al cada vez más amplio abanico de microorganismos, bacterias y hongos, que se emplean como inoculantes en agricultura, genera una gran inquietud sobre el potencial impacto ambiental de su aplicación. En cualquier caso, puesto que no es posible determinar el posible impacto de la liberación de microorganismos en todos los ambientes, parece más razonable diseñar sistemas de contención de este fenómeno, que impidan o al menos minimicen las posibilidades de transferencia genética. Para ello, es necesario primero conocer cómo se regulan los mecanismos de transferencia conjugativa en estos inoculantes.

La presencia de plásmidos de elevado peso molecular es un hecho generalizado en bacterias pertenecientes a la familia de las Rhizobiaceas, bacterias que se emplean como inoculantes para la mejora de cultivos de leguminosas. Los plásmidos son considerados como eficientes vehículos de transferencia de genes desde inoculantes de *Rhizobium* hasta poblaciones nativas del suelo. Se han obtenido datos de cepas no simbióticas de *Rhizobium* aisladas del suelo, que obtuvieron la capacidad simbiótica tras adquirir un plásmido o una isla simbiótica donados por rizobios inoculantes, mediante procesos conjugativos. La adquisición de esta nueva capacidad determina un cambio drástico en los hábitos de vida de las bacterias, al poder colonizar un nuevo nicho ecológico tan exclusivo como son los nódulos de las

leguminosas. Entre otras consecuencias, la dispersión de estos elementos conjugativos puede provocar que los nuevos simbioses pasen a ser competidores del inoculante por establecerse en simbiosis con la planta hospedadora, lo que en determinadas situaciones puede conllevar una reducción de la eficacia tecnológica de la inoculación.

Todas las cepas de la especie *Sinorhizobium meliloti* tienen su genoma distribuido en al menos 3 replicones: un cromosoma y 2 megaplásmidos, pSymA y pSymB, necesarios para el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno con alfalfa (*Medicago sativa*). Hasta muy recientemente se pensaba que dichos megaplásmidos no eran capaces de transferirse conjugativamente, sobre todo debido a su elevado tamaño (superior a 1 Mb) y a que nunca se había podido observar dicha capacidad en el laboratorio. No obstante, Pérez-Mendoza y colaboradores (2005) determinaron que en realidad la capacidad conjugativa del pSymA se encuentra reprimida en las condiciones habituales de cultivo en el laboratorio, e identificaron el gen *rctA* de dicho plásmido como responsable de tal inhibición, en un proceso análogo al que reprime la conjugación del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*. Dichos autores sugirieron además la existencia de una hipotética cascada regulatoria, encargada de la desrepresión del sistema de conjugación del plásmido pSymA en respuesta a hipotéticas señales o condiciones ambientales favorables para la transferencia conjugativa.

Con estos antecedentes, los objetivos en esta tesis doctoral han sido:

- 1) Determinar si el plásmido pSymB de *S. meliloti* 1021 también posee capacidad de transferencia por conjugación.
- 2) Identificar nuevos elementos de la ruta de transducción de señales que regulan la transferencia conjugativa del plásmido pSymA de *S. meliloti* 1201.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

En las Tablas M1 y M2 se señalan las cepas bacterianas de *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, respectivamente, junto con sus características más relevantes.

**Tabla M1.** Cepas Bacterianas

<b>Cepa</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
<b><i>Sinorhizobium meliloti</i></b>		
1021	Cepa silvestre, Sm <sup>R</sup>	(Meade <i>et al.</i> , 1982)
SmA818	Derivada de 2011, curada de pSymA; Sm <sup>R</sup>	(Oresnik <i>et al.</i> , 2000)
A818::Gm	Derivada de A818 (pSymB::Gm); Gm <sup>R</sup>	(Quandt <i>et al.</i> , 2004)
100TSS	Derivada de 1021 ( <i>otsA</i> :: Sm/Spc); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	(Domínguez-Ferreras <i>et al.</i> , 2009)
1021RctA <sup>-</sup>	Derivada de 1021 ( $\Delta$ rctA::Sm/Spc); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2005)
1021RctA $\Delta$ virB	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> ( $\Delta$ virB::Km); Km <sup>R</sup>	Tesis J.J Oliva
100TSSHB	Derivada de 100TSS (pSymB::Gm); Gm <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctAHB	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> , (pSymB::Gm); Gm <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctA $\Delta$ virBHB	Derivada de 1021RctA $\Delta$ virB (pSymB::Gm); Gm <sup>R</sup>	Este trabajo*
100TSS $\Delta$ SMa0967	Derivada de 100TSS ( $\Delta$ SMa0967); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
100TSS $\Delta$ SMb20835	Derivada de 100TSS ( $\Delta$ SMb20835); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
100TSS $\Delta$ vbp	Derivada de 100TSS ( $\Delta$ SMa0967, $\Delta$ SMb20835)	Este trabajo*
100TSS $\Delta$ vbpHB	Derivada de 100TSSHB ( $\Delta$ SMa0967, $\Delta$ SMb20835)	Este trabajo*
1021 $\Delta$ SMa0967RctA	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMa0967); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021 $\Delta$ SMb20835RctA	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMb20835); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021 $\Delta$ vbpRctA	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMa0967, $\Delta$ SMb20835)	Este trabajo*
1021 $\Delta$ vbpRctAHB	Derivada de 1021RctAHB ( $\Delta$ SMa0967, $\Delta$ SMb20835)	Este trabajo*
100TSS $\Delta$ SMa0941	Derivada de 100TSS ( $\Delta$ SMa0941); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctA $\Delta$ SMa0941	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMa0941); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021SMa0907	Derivada de 1021 (SMa0907:: $\Omega$ Km); Km <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctASMa0907	Derivada de 1021RctA <sup>-</sup> (SMa0907:: $\Omega$ Km); Km <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctR <sup>-</sup>	Derivada de 1021 (SMa0955::Sm/Spc); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctRQ1	Derivada de 1021RctR <sup>-</sup> (SMa0974::Gm); Gm <sup>R</sup>	Este trabajo*
1021RctRQ2	Derivada de 1021RctR <sup>-</sup> (SMa0956:: $\Omega$ Km); Km <sup>R</sup>	Este trabajo*
100TSSQ3	Derivada de 100TSS ( $\Delta$ SMa0950/53); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo*

<b>Cepa</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
1021RctRQ3	Derivada de 1021RctR <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMa0950/53); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo *
100TSSQ4	Derivada de 100TSS ( $\Delta$ SMa0961); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo *
1021RctRQ4	Derivada de 1021RctR <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMa0961); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo *
1021RctRQ5	Derivada de 1021RctR <sup>-</sup> ( $\Delta$ SMa0956/50); Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo *
<b><i>Rhizobium etli</i></b>		
CE3	Cepa silvestre, derivado de CFN42; Sm <sup>R</sup>	(Quinto <i>et al.</i> , 1985)
CFNX195	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42a, pRetCFN42d::Km; Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(Brom <i>et al.</i> , 2000)
<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>		
GMI9023	Derivada de C58 curada de sus plásmidos nativos; Sm <sup>R</sup> Rif <sup>R</sup>	(Rosenberg y Huguet, 1984)
AtpRetd::Km	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Km); Km <sup>R</sup>	D. Mendoza EEZ
At Tn5.1	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Tn5.1); Km <sup>R</sup>	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2005)
At pSymATn5.1	Derivada de GMI9023 (pSymA Tn5.1); Sm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo *
At pSymA Tn5.5	Derivada de GMI9023 (pSymA Tn5.5) Sm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo *
At pSymA Tn5.8	Derivada de GMI9023 (pSymA Tn5.8) Sm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo *
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
S17.1	<i>Thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
DH5 $\alpha$	<i>SupE44, DlacU169, f80, LacZDM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	B.R.L.

\* Las estrategias seguidas para la obtención de mutantes se encuentran ampliamente descritas en los Anexos de los Capítulos I y II.

**Tabla M2.** Plásmidos

<b>Plásmido</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
pBSKS(+)	Vector de clonación; Ap <sup>R</sup>	Stratagene
pGEM-T easy	Vector de clonación para productos de PCR; Ap <sup>R</sup>	Promega
TOPO <sup>®</sup> XL PCR	Vector de clonación para productos de PCR; Km <sup>R</sup>	Invitrogen <sup>®</sup>
pHP45 $\Omega$	Plásmido portador de un gen de resistencia a Sm/Spc; Ap <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	(Prentki y Krisch, 1984)

<b>Plásmido</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
pMS255	Plásmido portador del gen <i>aacCI</i> ; Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	(Becker <i>et al.</i> , 1995)
pSUP202	Plásmido suicida; Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
pK18 <i>mobSacB</i>	Vector suicida ; Km <sup>R</sup>	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pRK2013	Plásmido movilizador derivado de RK2; Km <sup>R</sup>	(Figursiki y Helinski, 1998)
pSUP2021	Derivado de pSUP202, portador de Tn5	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
pML122	Plásmido movilizable derivado de RSF1010, IncQ	(Labes <i>et al.</i> , 1990)
pJB3Tc19	Vector de clonación derivado de pRK2, Mob <sup>+</sup> ; Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	(Blatny <i>et al.</i> , 1997)
pTE3	Vector de clonación IncP, con promotor del triptófano <i>trp</i> de <i>Salmonella enterica</i> ;; Tc <sup>R</sup>	(Egelhoff and Long, 1985)
pFUS1	Plásmido derivado de pMP220 que contiene el gen <i>gusA</i> sin promotor; Tc <sup>R</sup>	(Reeve <i>et al.</i> , 1999)
pJBSA	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 300 pb ( <i>oriT</i> ) de pSymA de <i>S. meliloti</i> 1021	(Pérez- Mendoza <i>et al.</i> , 2006)
pJBSB	Derivado de pJB3Tc19 con fragmento de 300 pb ( <i>oriT</i> ) de pSymB de <i>S. meliloti</i> 1021	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2006)
pJB SAR	Derivado de pJB3Tc19 conteniendo un fragmento de 5,1 Kb ( <i>oriT</i> + <i>traA1</i> ) de pSymA; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pJB SBR	Derivado de pJB3Tc19 conteniendo un fragmento de 5,3 Kb ( <i>oriT</i> + <i>traA2</i> ) de pSymB; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pBVIR2	Derivado de pBSKS conteniendo un fragmento amplificado de 0,96 Kb correspondiente a la secuencia adyacente al extremo 5' de la región <i>virB</i> ; Ap <sup>R</sup>	Tesis JJ Oliva
pGVIR4	Derivado de pGEM-T easy conteniendo un fragmento amplificado de 1,13 Kb correspondiente a la secuencia adyacente al extremo 3' de la región <i>virB</i> ; Ap <sup>R</sup>	Tesis JJ Oliva
pBVIR200	Derivado de pBVIR2 conteniendo el inserto de pGVIR4 y portador de la versión mutada de la región <i>virB</i> ; Ap <sup>R</sup>	Tesis JJ Oliva
pBVIR300	Derivada pBVIR200 conteniendo el gen de resistencia a Sm/Spc de pHP45Ω clonado en el único sitio <i>HindIII</i> ; Ap <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Tesis JJ Oliva
pKVIR400	Derivada de pK18 <i>mobSacB</i> conteniendo la versión mutada de la región <i>virB</i> del plásmido pBVIR300; Km <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Tesis JJ Oliva

<b>Plásmido</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
TOPO-0967up	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo un fragmento amplificado de 1 Kb correspondiente a la secuencia adyacente al extremo 3' del gen <i>SMa0967</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-0967down	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo un fragmento amplificado de 0,88 Kb correspondiente a la secuencia adyacente al extremo 3' del gen <i>SMa0967</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pBS-0967up	Derivado de pBSKS conteniendo el fragmento de 1 Kb de TOPO-0967up; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pBS-0967updown	Derivado de pBS-0967up conteniendo el inserto de TOPO-0967down y portador de la delección del gen <i>SMa0967</i> ; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pK18-0967updown	Derivado de pK18 <i>mobSacB</i> portador de la delección del gen <i>SMa0967</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-20835up	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo un fragmento amplificado de 1,38 Kb correspondiente a la secuencia adyacente al extremo 3' del gen <i>SMb20835</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-20835down	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo un fragmento amplificado de 1,19 Kb correspondiente a la secuencia adyacente al extremo 5' del gen <i>SMb20835</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pBS-20835up	Derivado de pBSKS conteniendo el fragmento de 1,38 Kb de TOPO-20835up; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pBS-20835updown	Derivado de pBS-20835up conteniendo el inserto de TOPO-20835down y portador de la delección del gen <i>SMb20835</i> ; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pK18-20835updown	Derivado de pK18 <i>mobSacB</i> portador de la delección del gen <i>SMb20835</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-Δ0941	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR portador de la versión mutada del gen <i>SMa0941</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pK18-Δ0941	Derivado de pK18 <i>mobSacB</i> portador de la delección del gen <i>SMa0941</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEMT-0939-40	Derivado de pGEM-T easy conteniendo un fragmento amplificado de 2,58 Kb correspondiente a los genes <i>SMa0939/SMa0940</i> ; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pTE3-0939-40	Derivado de pTE3 conteniendo los genes <i>SMa0939/SMa0940</i> bajo el promotor del <i>trp</i> ; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo

<b>Plásmido</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
pGEMT-0907	Derivado de pGEMT-easy conteniendo un fragmento amplificado de 1,33 Kb correspondiente al gen <i>SMa0907</i> ; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEMT-0907Km	Derivado de pGEMT-0907 con inserción del gen de resistencia a Km en el gen <i>SMa0907</i> ; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
p202-0907Km	Derivado de pSUP202 portador de la versión mutada de <i>SMa0907</i> (0907Km); Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pTE3-0907	Derivado de pTE3 con fragmento <i>BamHI</i> de 1,33 Kb del plásmido pGEMT-0907 bajo el promotor del <i>trp</i> ; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEMT- <i>rctR</i> mut	Derivado de pGEM- T easy conteniendo el gen <i>rctR</i> en un fragmento amplificado de 3,2 Kb; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEMT- <i>rctR</i> mutSS	Derivado de pGEMT- <i>rctR</i> mut con inserción del gen de resistencia a Sm/Spc en el gen <i>rctR</i> ; Ap <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo
p202- <i>rctR</i> mutSS	Derivado de pSUP202 portador de la mutación en el gen <i>rctR</i> ; Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Este trabajo
pJB3- <i>rctR</i>	Derivado de pJB3Tc19 que contiene el gen <i>rctR</i> bajo el promotor del gen <i>lacZ</i> ; Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO- <i>rctB</i> ::Gm	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR portador de la versión mutada del gen <i>rctB</i> ; Gm <sup>R</sup>	Este trabajo
p202- <i>rctB</i> ::Gm	Derivado de pSUP202 portador de la versión mutada del gen <i>rctB</i> ; Tc <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-Sm <i>rctB</i>	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo el gen <i>SMa0974</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pTE3-Sm <i>rctB</i>	Derivado de pTE3 conteniendo el gen <i>SMa0974</i> bajo el promotor del <i>trp</i> ; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pTE3Yp028	Derivado de pTE3 conteniendo el gen <i>rctB</i> de <i>R. etli</i> bajo el promotor del <i>trp</i> ; Tc <sup>R</sup>	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2004)
pGEMT-0956::Km	Derivado de pGEMT- <i>rctR</i> mut con inserción del gen de resistencia a Km en el gen <i>SMa0956</i> ; Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
p202-0956::Km	Derivado de pSUP202 portador de la versión mutada del operón <i>SMa0956-58-59-61</i>	Este trabajo
TOPO-Δ0956-59	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR portador de la versión mutada de los genes <i>SMa0956-58-59</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pK18-Δ0956-59	Derivado de pK18 <i>mobSacB</i> portador de la versión delecionada de los genes <i>SMa0956-58-59</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo

<b>Plásmido</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente o referencia</b>
TOPO- <i>SMa0956/59</i>	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo los genes <i>SMa0956-58-59</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pJB3- <i>SMa0956/59</i>	Derivado de pJB3Tc19 conteniendo los genes <i>SMa0956-58-59</i> bajo el promotor del gen <i>lacZ</i> ; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-Δ0961	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR portador de la versión delecionada del gen <i>SMa0961</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pK18- Δ0961	Derivado de pK18 <i>mobSacB</i> portador de la versión delecionada del gen <i>SMa0961</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-0961	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR conteniendo el gen <i>SMa0961</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pTE3-0961	Derivado de pTE3 conteniendo el gen <i>SMa0961</i> bajo el promotor del <i>trp</i> ; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
TOPO-Δ0950-53	Derivado de TOPO <sup>®</sup> XL PCR portador de la versión delecionada de los genes <i>SMa0950-51-52-53</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pK18-Δ0950-53	Derivado de pK18 <i>mobSacB</i> portador de la versión delecionada de los genes <i>SMa0950-51-52-53</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pFustraA2:: <i>gusA</i>	Derivado de pFUS conteniendo el fragmento de 300 pb de pJBSB; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo

## 2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

### 2.1. Medios de cultivo para *E. coli* y *A. tumefaciens*

Las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* se cultivaron de forma rutinaria en medio de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972), tanto líquido como sólido, a una temperatura de 37°C para *E. coli* y de 28-30°C para *A. tumefaciens*:

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agar (para medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

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

Cuando fue necesario verificar la ausencia de *E. coli* en un cultivo, se utilizó ENDO AGAR, un medio selectivo para coliformes en el que *Rhizobium* o *Agrobacterium* no crecen. Dicho medio se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante (DIFCO): se resuspendieron 41,5 gramos del preparado comercial en 1 litro de agua desionizada y se hirvió hasta su completa disolución. Se esterilizó a 120°C durante 15 minutos y se utilizó inmediatamente tras su preparación.

## 2.2. Medios de cultivo para rizobios

Las cepas de *Rhizobium* (*R. etli* y *S. meliloti*) se cultivaron rutinariamente a 28-30°C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,5g
Agar (medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

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

Como medio mínimo (MM) para *Rhizobium* se empleó el de Robertsen y colaboradores (1981), modificado según se especifica a continuación:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,15 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,05 g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,006 g
NaCl.....	0,05 g
Glutamato sódico.....	1,1 g
Manitol.....	10 g
Solución de vitaminas*	1 ml
Agar purificado (medio sólido).....	13 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Se ajustó el pH a 6.8-7.2, y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

\*La solución concentrada de vitaminas (1000x) consta de:

Biotina.....	0,2 g
Clorhidrato de tiamina.....	0,1g
Pantotenato sódico.....	0,1g
Agua destilada.....	1000 ml

Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 ml/ litro al MM autoclavado.

### 2.3. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se utilizaron criotubos que contenían alícuotas de cultivos bacterianos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Los criotubos se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80°C.

### 2.4. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas (100x) de los mismos, preparadas generalmente en agua desionizada. La esterilización de las soluciones acuosas se llevó a cabo empleando unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro y 2,5 cm de diámetro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y rifampicina no fue necesaria la esterilización por filtración, ya que se empleó metanol para disolverlos. La concentración final de los distintos antibióticos utilizados en este trabajo se indica en la tabla siguiente:

Tabla M3. Antibióticos

Antibiótico	Concentración (µg/ml)			
	<i>S. meliloti</i>	<i>R. etli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>
Ampicilina (Ap)	-	-	-	200
Espectinomicina (Spc)	150	100	100	25
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	150	100	100	25
Sulfato de kanamicina (Km)	200	50	50	25
Gentamicina (Gm)	30	10	30	10
Tetraciclina* (Tc)	10	2,5	5	10
Rifampicina* (Rif)	-	20	50	-

\* Las soluciones concentradas de Tc y Rif se prepararon en metanol al 100%

### 3. TRANSFERENCIA DE ADN ENTRE CEPAS BACTERIANAS

#### 3.1. Conjugaciones

##### 3.1.1. Conjugaciones biparentales

Esta técnica se realizó cuando fue necesaria la transferencia de un plásmido entre cepas bacterianas. Las conjugaciones se realizaron mezclando un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del donador (D.O<sub>600nm</sub> 0,2-0,3 para *Rhizobium* y entre 0,6–0,7 para *E. coli*), con otro en fase exponencial tardía del receptor (D.O<sub>600nm</sub> superior a 1), en proporción 4:1 en el caso de *Rhizobium* como donador y 1:1 en el caso de *E. coli* como donador. Donador y receptor se precipitaron por centrifugación y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) para eliminar restos de antibióticos. Finalmente, la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (50 µl) y se depositó sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de medio TY sólido. La mezcla se incubó de este modo durante 16-20 horas a 28°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de conjugación se resuspendió en medio líquido estéril, se lavó y se sembraron diluciones sobre placas de medio selectivo.

Se utilizaron cultivos control, preparados de igual forma que las conjugaciones pero conteniendo separadamente células del donador o del receptor, para establecer las frecuencias de aparición de resistentes a los antibióticos selectivos en cada caso.

##### 3.1.2. Conjugaciones triparentales

La transferencia de plásmidos no autotransmisibles desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a *Rhizobium* se realizó según el modelo de cruce tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Finan *et al.*, 1986). La metodología seguida fue idéntica a la de los cruces simples, pero en estos casos se prepararon mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones 1:1:1.

#### 3.2. Transducción

Esta técnica se utilizó para el intercambio alélico entre cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 usando el bacteriófago φM12 y siguiendo el protocolo descrito por Finan y colaboradores (1984).

Se mezclaron 5 ml de medio TY semisólido (0,5% agar) fundido adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) con 100 µl de un cultivo de la cepa donadora a una D.O<sub>600nm</sub> de 0,4-0,5 y 100 µl de una suspensión del bacteriófago φM12 (10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> ufc/ml). La mezcla se extendió sobre una placa de TY sólido y se incubó a 28°C hasta la aparición de calvas. Para la recuperación de los lisados, se utilizaron placas de 800-1000 calvas a las que se añadieron 3 ml de TY líquido adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) y tras mantener las placas de 2 a 4 horas a 4°C, se recuperó el líquido y se eliminaron las bacterias por filtración. Los lisados así obtenidos se titularon y se conservaron a 4°C.

Para la determinación del título de los lisados se emplearon diluciones seriadas del lisado, de las que se utilizaron 100 µl para inocular 5 ml de medio TY semisólido adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>) junto con 100 µl de cultivo bacteriano. La mezcla se tendió en sobrecapa y una vez solidificado el medio, se incubaron a 28°C hasta la aparición de las calvas, determinándose de este modo el número de ufc/ml en el lisado.

El cultivo receptor se creció a una D.O<sub>600nm</sub> de 0,8-0,9 (aproximadamente 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> unidades formadoras calvas o ufc/ml) en TY adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO<sub>4</sub>) y se infectó con el lisado de fagos obtenido a partir de la cepa donadora en una proporción 1:1. La mezcla se mantuvo a 30°C durante 20 minutos y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante que contenía los fagos. Las células se lavaron 2 veces con LB y se sembraron en placas de LB sólido con los antibióticos necesarios.

### **3.3. Transformación de células competentes**

#### **3.3.1. Preparación de células competentes de *E. coli***

##### **3.3.1.1. Preparación de células competentes químicamente**

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974).

A partir de un precultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo/100 ml de medio) y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una D.O<sub>600nm</sub> de 0,5 (aproximadamente 2 horas). Tras dejar enfriar el cultivo en hielo durante 10 minutos, las células se centrifugaron (6.000 xg, 10 minutos, 4°C), se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril preenfriada a 4°C. Se centrifugaron de nuevo (3.000 xg, 5 minutos, 4°C), se eliminó el sobrenadante y, las células

se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M preenfriada a 4°C y, tras mantenerlas en hielo un mínimo de 30 minutos, se centrifugaron (3.000 xg, 5 minutos, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4°C. Las células se repartieron en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  en tubos eppendorf preenfriados en hielo y se conservaron a -80°C hasta su uso. La competencia de las células se mantuvo de esta forma durante varios meses.

#### 3.3.1.2. Preparación de células electrocompetentes

La preparación de células electrocompetentes se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Hattermann y Stacey (1990). A partir de un precultivo de la cepa a transformar, se inoculó un matraz de 100 ml del medio y antibióticos apropiados y se incubó en agitación a 28°C hasta que el cultivo alcanzó una  $\text{D.O}_{600\text{nm}}$  de 0,4-0,6. Tras dejar enfriar en hielo durante 15 minutos, las células se centrifugaron (9.820xg, 10 minutos, 4°C) y se resuspendieron en 1 volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril preenfriada en hielo. Se repitieron rondas de centrifugación y resuspensión en  $\text{H}_2\text{O}$  preenfriada con los siguientes volúmenes: 1 x 1 volumen (100 ml), 2 x 0,5 volúmenes (50 ml), 1 x 0,02 volúmenes (2 ml), terminando por resuspender en 0,003 volúmenes (0,3 ml) de glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células fueron almacenadas en eppendorfs preenfriados a 4°C en alícuotas de 60  $\mu\text{l}$  que se conservaron a -80°C hasta su uso.

### **3.3.2. Transformación de células competentes de *E. coli***

#### 3.3.2.1. Transformación de células competentes

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación.

Se mezclaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de células competentes con ADN (50-100 ng) y se incubaron en hielo un mínimo de 30 minutos. A continuación, se sometieron a un choque térmico a 37°C durante 5 minutos y tras mantenerlas 5 minutos en hielo, se les adicionó 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60-90 minutos, en agitación. Transcurrido este tiempo se sembraron en placas de medio LB con los correspondientes antibióticos, diferentes volúmenes de la transformación y se incubaron a 37°C durante una noche.

### 3.3.2.2. Transformación por electroporación

Se mezcló una alícuota de 60 µl de células electrocompetentes descongeladas en hielo con 1 µl (aproximadamente 20 ng) de ADN resuspendido en H<sub>2</sub>O. Esta mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm Gene Pulser<sup>®</sup> 600 (BioRad Laboratories), manteniendo todo a 4°C y evitando el contacto directo de las cubetas con el hielo. Se utilizó un electroporador ELECTRO CELL MANIPULATOR<sup>®</sup> 600 en las siguientes condiciones:

Modalidad:	T	2,5 KV/Resistencia a alto voltaje (HV).
Capacitancia:	C	No usada en modo HV.
Resistencia:	R	R5 (129 ohm).
Carga:	S	1,3-1,5 KV.
Duración del pulso:	t	5-6 msec.

Tras el pulso, se añadió inmediatamente 1 ml de medio estéril y se incubó a 28°C en agitación durante 4-20 horas. Tras este tiempo se sembraron alícuotas de 10 a 100 µl en medio selectivo.

## **4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS**

### **4.1. Preparación de ADN plasmídico**

#### **4.1.1. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina**

La obtención de ADN plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se incubaron 3 ml de medio suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en el caso de *E. coli*, o a 28-30°C en el caso de *S. meliloti*, durante 12-16 h. Las células de 1,5-3 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (12.000 rpm, 3 minutos) en tubos eppendorf. En el caso de cultivos de *Rhizobium*, las células se lavaron con 500 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0,1% en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), para eliminar restos de polisacáridos. Las células se centrifugaron (12.000 rpm, 3 minutos) y después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8) adicionada de lisozima (4 mg/ml). Las células se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el preparado anterior se mezcló mediante inversión

con 200 µl de solución II (NaOH 0,2 M, SDS 0,1%) y se incubó en hielo 5 minutos. Pasado este tiempo, se incorporaron 150 µl de solución III (60 ml de acetato potásico 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua; pH 4,5). Se mezcló suavemente por inversión del tubo y después de incubar en hielo durante 5 minutos, se centrifugó (12.000 rpm, 5 minutos).

El sobrenadante obtenido (aproximadamente 400 µl) se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadió un volumen igual de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) (El cloroformo es una mezcla de alcohol isoamílico:cloroformo (1:24). El fenol contiene fenol al 100% (1:1), 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1M (pH 8,)). Tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases mediante centrifugación (12.000 rpm, 5 minutos). La fase superior acuosa, que contiene el ADN, se transfirió a un nuevo tubo, se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20°C, se incubó a -80°C durante al menos 30 minutos y se centrifugó (13.000 rpm, 15 minutos). El sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó con 200 µl de etanol 70% preenfriado a -20°C y se centrifugó de nuevo (13.000 rpm, 5 minutos). Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 20-50 µl de tampón TE o de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Para eliminar el ARN, al volumen anterior se le puede añadir 1 µl de ribonucleasa A concentrada (10 mg/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Antes de su utilización, la solución concentrada de RNasa se calentó a 100°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20°C. Alternativamente, el ARN se puede eliminar durante la digestión con enzimas de restricción utilizando una dilución 1/200 de la solución concentrada de RNasa en agua desionizada para completar el volumen de digestión.

#### **4.1.2. GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich™ inc.)**

Se utilizó este protocolo cuando fue necesaria la obtención de ADN con una elevada cantidad y una mayor pureza. A partir de un cultivo líquido de 1-5 ml de *E. coli*, las células se precipitaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 250 µl de solución de resuspensión (previamente adicionada de RNasa A, según las instrucciones del proveedor). Posteriormente, se incorporaron 200 µl de solución de lisis, mezclando suavemente mediante inversión del tubo y dejando a temperatura ambiente durante un tiempo no superior a 5 minutos. A la mezcla anterior se le añadieron 350 µl de solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó (12.000 rpm, 10 minutos). Se recogió el sobrenadante y se aplicó

a una columna (previamente tratada con 500 µl de la solución de preparación) que se centrifugó durante 1 minuto, de modo que el ADN plasmídico quedó retenido en la columna y se eliminó el eluido. La columna se lavó con 750 µl de solución de lavado (previamente adicionado de etanol 100% según las indicaciones del proveedor) y se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm, repitiéndose de nuevo la centrifugación para eliminar el exceso de solución. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de 1,5 ml, se añadieron 50 µl de solución de elución o de agua desionizada estéril, y pasado 1 minuto se centrifugó (13.000 rpm, 1 minuto) para recuperar el ADN.

## **4.2. Preparación de ADN genómico**

### **4.2.1. Preparación de ADN genómico mediante protocolo diseñado para rizobios**

El aislamiento de ADN total se llevó a cabo mediante un método especialmente diseñado para *Rhizobium* en el departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania). De un cultivo bacteriano en fase logarítmica de la cepa elegida, se recogieron 1,5 ml por centrifugación. Las células se lavaron con 500 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0,1% en TE (ver apartado 3.1.1). El precipitado se resuspendió en 1 ml de NaCl 1 M y se dejó durante 1-2 horas a 4°C, agitando de vez en cuando. A continuación, se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 250 µl de una solución de sacarosa al 20% en TE pH 8. Después se le añadieron otros 250 µl de una solución en TE que contiene lisozima (5 mg/ml) y RNasa (1 mg/ml). Se mezcló por vórtex y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación, se añadieron 100 µl de una solución en TE que contiene sarcosil al 5% y pronasa (10 mg/ml) y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 70 µl de acetato sódico 3 M pH 5.2, 200 µl de fenol:cloroformo (1:1) (preparado como se indicó en el apartado 3.1.1.) y 200 µl de fenol (preparado como se indicó en el apartado 3.1.1). Se agitó por vórtex durante 2-3 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm. La fase superior se recogió en un nuevo tubo y, para eliminar impurezas, se lavó varias veces con la mezcla de fenol:cloroformo (1:1). A continuación se lavó una última vez con 300 µl de cloroformo, se agitó bien y se centrifugó durante 3 minutos a 12.000 rpm.

La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 700 µl de isopropanol (2-propanol), se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a -20°C. Después se centrifugó

durante 15 minutos a 13.000 rpm; el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70%, se secó al vacío y se resuspendió mediante en 100 µl de TE pH 8 diluido 1/10. Por último, se incubó durante 30 minutos a 65°C, mezclando de vez en cuando para asegurar una resuspensión completa.

#### **4.2.2. AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad)**

Se utilizó este protocolo cuando fue necesaria la obtención de ADN de elevada pureza. Se tomaron de 1-3 ml de un cultivo líquido de *Rhizobium* en fase logarítmica y se precipitaron las células. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 300 µl de Solución de Lisis y se incubaron durante 5 minutos a 80°C.

Posteriormente, se incorporaron 1,5 µl de solución de RNasa A, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 hora. A la mezcla anterior se le añadieron 100 µl de Solución de Precipitación de Proteínas. Se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugó (12.000 rpm, 3 minutos). Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo al que se le añadieron 300 µl de isopropanol (2-propanol) al 100%. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 300 µl de etanol al 70%. Se secó al aire durante 10-15 minutos y se resuspendió mediante un corto vórtex en 50 µl de Solución de Hidratación. Finalmente, se mantuvo 30 minutos a 65°C mezclando de vez en cuando para asegurar su completa resuspensión.

#### **4.2.3. Obtención de ADN a partir de colonias bacterianas**

Para la obtención de ADN de suspensiones celulares se resuspendió una colonia en 100 µl de agua bidestilada y se centrifugó durante dos minutos a 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 100 µl de sarkosil al 0.1% en tampón TE y se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender en 100 µl de agua bidestilada. La mezcla se hirvió a 100°C durante 5 minutos, se centrifugó (13.000 rpm, 2 minutos) y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

#### **4.3. Aislamiento de ARN total de *S. meliloti***

Para la obtención de ARN total de *S. meliloti* se utilizaron el RNeasy Mini Kit y el RNase-free DNase Set de Qiagen. Se tomaron 12 alícuotas de 1,5 ml de cultivo cada una, se precipitaron las células y, tras eliminar todo el sobrenadante, se congelaron en nitrógeno

líquido (la extracción de ARN para microarrays se hizo a partir de 8 alícuotas y para RT-qPCR a partir de 4 alícuotas).

El sedimento obtenido a partir de cada alícuota se resuspendió en 100  $\mu$ l de una solución de lisozima (400  $\mu$ g/ml) preparada en TE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 350  $\mu$ l de buffer RLT (tras añadir en el momento de uso 10  $\mu$ l/ml de  $\beta$ -mercaptoetanol), se mezcló por vórtex y se eliminaron los restos celulares centrifugando a 13.000 rpm durante 2 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se realizó otra centrifugación para eliminar posibles residuos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se mezcló por pipeteo con la micropipeta con 250  $\mu$ l de etanol al 100%. Se aplicaron dos muestras por la misma columna RNeasy, centrifugando (13000 rpm, 30 segundos a temperatura ambiente) de modo que el ARN quedara retenido en la columna. A continuación se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se lavó una vez con 700  $\mu$ l de solución RW1 y dos veces con 500  $\mu$ l de solución RPE. Finalmente, se centrifugó la columna durante 2 minutos a 13.000 rpm para eliminar los restos de solución y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 30  $\mu$ l de agua para ARN (suministrada por el fabricante) y se dejó 1 minuto a temperatura ambiente antes de centrifugarlo a 13.000 rpm durante 1 minuto para recuperar el ARN. Este paso se repitió y se mezcló el ARN procedente de dos extracciones realizadas para cada muestra hasta obtener un volumen final de 120  $\mu$ l.

A la muestra de ARN obtenida (120  $\mu$ l) se añadieron 14  $\mu$ l de solución RDD (RNase free DNase Set, Qiagen) y 6  $\mu$ l de DNasa. La mezcla se dejó durante 1 hora a 28°C y posteriormente se añadieron 490  $\mu$ l de solución RLT (RNeasy Mini Kit, Qiagen) y 350  $\mu$ l de etanol al 100%, se mezcló por inversión y se aplicó a una nueva columna RNeasy para retener el ARN. La columna se lavó una vez con 350  $\mu$ l de solución RW1 y dos veces con 500  $\mu$ l de solución RPE. Se secó bien por centrifugación (13.000 rpm, 2 minutos) y se transfirió a un nuevo tubo. Se aplicaron 25  $\mu$ l de agua para ARN (suministrada con el kit) a la columna, se mantuvo durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para obtener la muestra final, repitiéndose este paso otra vez para obtener un volumen final de 50  $\mu$ l.

#### **4.4. Concentración de muestras de ARN total de *S. meliloti***

Las muestras de ARN se concentraron utilizando columnas Microcon-30 (Amicon, Millipore). Se mezcló la muestra con 500  $\mu$ l de agua para ARN y se aplicó a la columna. Se

centrifugó a 14.000 xg hasta que sobre la membrana quedaron unos 35 µl (8-10 minutos). La muestra concentrada se recuperó invirtiendo la columna sobre un nuevo microtubo y centrifugando a 1.000 xg durante 2 minutos.

## 5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN Y ARN

### 5.1. Método de Sambrook

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores (1989). La absorbancia ( $D.O_{260nm}$  y  $D.O_{280nm}$ ) de las soluciones de ADN o ARN en agua o en TE se determinó utilizando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calculó respecto a los valores estándar de  $D.O_{260nm} = 1$  para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble y para soluciones con 40 µg/ml de ARN total. La relación  $D.O_{260nm}/D.O_{280nm}$  se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1.8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook y colaboradores (1989).

### 5.2. Medida de la concentración de ARN y ADN mediante Nanodrop®

El modelo de NanoDrop utilizado fue el NanoDrop® ND-1000 de BioRad. Se trata de un espectrofotómetro de luz UV-visible (desde 220 hasta 750 nm) que consigue buenos análisis utilizando muestras de pequeña volumen (2 µl). La retención de la muestra por el aparato evita la necesidad de utilizar cubetas o capilares y la medida se hace mas rápidamente. No es necesario realizar diluciones, pues detecta un amplio rango de concentraciones (2-3700 ng/µl). El blanco se hace con agua desionizada. El aparato calcula los ng/µl de cada muestra y además las ratios 260/230, indicativo de la contaminación por solventes y químicos orgánicos y debe ser mayor que 1.6, y 260/280, indicativo de contaminación por proteínas y debe de ser mayor que 1.8.

## 6. MANIPULACIÓN DEL ADN

### 6.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche<sup>®</sup>, Alemania), respecto a temperatura y tampón.

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo primero la digestión con una de las enzimas, se fenolizó y se precipitó el ADN con etanol y, posteriormente, se resuspendió en agua desionizada, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

### 6.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa

#### 6.2.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% sumergidos en tampón de electroforesis TBE (Tris 50 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> 2,5 mM; BO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 50 mM; pH 8.2). El voltaje usual de trabajo fue 90 V en cubetas de electroforesis de tamaño mediano (Wide mini-sub<sup>®</sup> cell GT) y de 60 V en cubetas de electroforesis de tamaño pequeño (Mini-sub<sup>®</sup> cell GT; Biorad<sup>®</sup>). Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua destilada, en una relación de 1 µl de tampón de carga por 5 µl de solución de ADN.

#### 6.2.2. Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los mismos en agua destilada que contenía una solución de GelRed<sup>TM</sup> (biotium) (100 µl/l), durante 30-40 minutos. Posteriormente se observaron bajo luz UV (260 nm) en un transiluminador. Para la visualización e impresión se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter Vm509) y el analizador de imágenes Quantity One de BioRad<sup>®</sup>.

### **6.2.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción**

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del tamaño molecular relativo de moléculas patrón de ADN frente a la movilidad relativa (Rf) de dichas moléculas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con *HindIII* (Marcador II) o *EcoRI/HindIII* (Marcador III), ambos de Roche. También se ha utilizado el marcador de 100 pb GeneRuler (Fermentas).

## **6.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

### **6.3.1. Purificación mediante electroelución**

Para aislar fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el método de electroelución descrito por Sambrook y Fritsch (1989), en el que se hace uso de membranas de diálisis. La membrana de diálisis utilizada fue de Spectra/Por (SPECTRUM Medical Industries) con tamaño de poro de 12.000 a 14.000 Da. Las membranas se prepararon sumergiéndolas en un volumen abundante de tampón conteniendo bicarbonato sódico 2% (p/v) y EDTA 1 mM, y llevándolas a ebullición durante 10 minutos. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua desionizada y se añadió un poco de etanol 100% para su conservación a 4°C. Previo a su uso, las membranas se enjuagaron con agua desionizada. El proceso de electroelución se llevó a cabo de la siguiente manera: Tras separar los fragmentos de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito en el apartado 6.2.1, se tiñó con GelRed™ y se extrajo la agarosa alrededor de la banda de interés y se introdujo en el tubo de diálisis sellado previamente en uno de sus extremos con una pinza. Se añadieron 500 µl de tampón de electroforesis TBE y se cerró la membrana por el otro extremo con una segunda pinza, intentando no dejar grandes burbujas de aire. Este montaje se sometió a una electroforesis a 120 V durante 20 minutos, de modo que el ADN saliera del gel y quedase disuelto en el tampón de electroforesis.

Para evitar que el ADN quedase adherido a la membrana, se sometió el montaje a 1 minuto de electroforesis a 80 V con la polaridad invertida. Tras comprobar con luz ultravioleta que no quedasen restos de ADN en el gel, se procedió a recuperar todo el tampón posible y transferirlo a un tubo eppendorf para la precipitación del ADN, añadiendo 50 µl de

acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol 100% (1 ml). La mezcla se agitó por inversión y se mantuvo un mínimo de 30 minutos a -80°C. A continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con 200 µl de etanol 70% preenfriado, se secó al vacío y se resuspendió en 20 µl de agua Milli-Q o TE (ver apartado 3.1.1).

### **6.3.2. Purificación mediante Kit: Qiaex-II<sup>®</sup> (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA)**

Cuando se necesitó mayor cantidad de ADN se empleó este método comercial cuyo protocolo fue facilitado por el proveedor. Tras separar los fragmentos de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito en el apartado 6.2.1, se extrajo la agarosa con la banda de interés y se colocó en un microtubo. Se pesó la muestra para determinar el volumen de agarosa y se adicionaron 3 volúmenes de tampón QX1<sup>®</sup> y 5 µl de la resina Qiaex II<sup>®</sup> por cada µg de ADN y se incubó a 50°C hasta conseguir la disolución de la agarosa (aprox. 10 minutos), agitando el tubo por inversión manual cada 2 minutos. Se centrifugó (12.000 rpm, 30 segundos) y se eliminó el sobrenadante.

El precipitado obtenido, que contiene el ADN adherido a la matriz, se resuspendió en 500 µl de tampón QX1<sup>®</sup>. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó dos veces con 500 µl de tampón PE<sup>®</sup> que contiene etanol y se secó a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada o tampón TE precalentado a 50°C, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó la resina mediante centrifugación (12.000 rpm, 30 segundos). Se recogió el sobrenadante con cuidado y se pasó a un nuevo microtubo. Esta última operación se puede repetir una segunda vez para recuperar el ADN restante que pudiera quedar retenido en la resina.

## **6.4. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación**

### **6.4.1. Reacción de ligación**

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se efectuó usando relaciones molares vector: inserto de 1:3 y una cantidad total de ADN de unos 200 ng. El volumen final de mezcla de reacción fue de 10-20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima DNA ligasa del fago T4 y en el tampón indicado por el proveedor

(Roche®, Alemania), incubando durante una noche a 15°C en el caso de ligaciones de extremos cohesivos y a temperatura ambiente en el caso de ligaciones de extremos romos.

#### **6.4.2. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5'**

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 5' protuberantes, se procedió a rellenar el extremo 3' de la cadena complementaria de la siguiente manera: se mezclaron en un microtubo 20 µl de la solución de ADN (0.2-5µg de ADN digerido con la enzima de restricción apropiada), 1 µl de una solución 1mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y una unidad de enzima Klenow (fragmento Klenow de la ADN polimerasa) por µg de ADN. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa para purificar la muestra, aislando la banda del gel tal y como se ha descrito en los apartados 6.3.1 y 6.3.2.

#### **6.4.3. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 3'**

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 3' protuberantes, se procedió a la eliminación de la región desapareada de la siguiente forma: en un microtubo se mezclaron 20 µl de la solución de ADN (0.2-5µg de ADN digerido con la enzima de restricción apropiada), 1 µl de una solución 2mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y una unidad de ADN polimerasa del bacteriófago T4 por µg de ADN. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a 12°C y a continuación se procedió como en el apartado anterior, llevando a cabo una electroforesis en gel de agarosa y aislando la banda de ADN tal como se ha descrito en los apartados 6.3.1 y 6.3.2.

### **6.5. Secuenciación y análisis informático**

#### **6.5.1. Secuenciación automática de ADN de doble cadena**

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS, por el Servicio de Secuenciación del instituto de Parasitología López-Neyra y el de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (0,4-1 µg) se le adicionó el cebador específico (6,4 picomoles) y agua Milli-Q hasta un volumen final de 12 µl. Los cebadores empleados para la secuenciación han sido:

Universal: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

Reverso: 5'GAAACAGCTATGACCATG 3'

Estas secuencias están presentes en los vectores de tipo pUC18, pBSKS(+), pGEM<sup>®</sup>-T easy y TOPO-XL-PCR que se utilizaron en este trabajo.

Tn5: 5' AAAGTTCCGTTTCAGGACGC 3'

### 6.5.2. Análisis informático de secuencias de ADN

Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, diseño y análisis de oligonucleótidos, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con el programa informático Vector NTI<sup>®</sup>. La búsqueda de homologías a nivel de ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en los bancos de datos se realizó con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1998) disponible en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los datos sobre el genoma de *S. meliloti* 1021 se consultaron en <http://sequence.toulouse.inra.fr/>.

## 7. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN ADN-ADN

### 7.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975). Para ello, los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, se procedió a su tratamiento que consistió, siempre con agitación, en un paso de 20 minutos de depurinación ácida del ADN mediante inmersión en una solución de HCl 0,25 M. Tras lavar tres veces con agua destilada, se procedió a desnaturalizar el ADN mediante inmersión repetida en una solución de NaOH 0,5 M, y NaCl 1,5 M, durante 15 minutos la primera vez y 25 minutos la segunda. Se lavó de nuevo 3 veces con agua destilada y por último se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M (pH 7.4) durante 20 minutos.

Finalmente, el gel se lavó con agua destilada, se saturó con SSC 10x y se colocó sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, cubierta con papel Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel (el filtro y las piezas Whatman se lavaron primero con agua destilada y se saturaron en tampón SSC 10x durante 5 minutos antes de su utilización). Sobre

el dispositivo así preparado se colocaron varias piezas de papel de celulosa y, sobre éstas, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener ligeramente comprimido el sistema.

El proceso de transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó durante una noche. Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lavó con una solución SSC 2x para eliminar restos de agarosa, se secó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se incubó durante 30 minutos a 120°C en vacío, para fijar el ADN a la membrana.

#### SOLUCIONES:

##### SSC 20x:

175,3 gr de NaCl  
8.2 g de citrato sódico  
800 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

Ajustar el pH a 7 y completar hasta 1 litro.

### **7.2. Marcaje de sondas de ADN no radioactivas**

El marcaje de sondas de ADN se ha realizado empleando el sistema no radiactivo de marcaje con digoxigenina comercializado por Roche<sup>®</sup> (Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (100°C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante 2 minutos, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica. La cantidad de ADN molde que se empleó fue de entre 100-500 ng, en un volumen final de 20 µl, preferiblemente linealizado mediante la digestión con alguna enzima de restricción. El tiempo de incubación fue de unas 20 horas, y la temperatura de 37°C. Posteriormente se precipitó el ADN con 2,5 µl de LiCl 4 M, 2 µl EDTA 0,2 M pH 8 y 75 µl de etanol 100% preenfriado a -20° C. Se mezcló bien y se dejó al menos 30 minutos a -80°C antes de centrifugar durante 15 minutos a 12.000 rpm. Se lavó el sedimento con 50 µl de etanol al 70% preenfriado a -20° C, se secó al vacío y se resuspendió en 20 µl de TE, dejándolo durante 30 minutos a 37°C.

### **7.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radioactiva**

El filtro de nylon al que se había transferido el ADN se colocó en un tubo de hibridación al que se añadieron 20-40 ml de solución de prehibridación (SSC 5x, N-lauryl sarcosina 0,1%, SDS 0,02%, formamida 50% y Reactivo de bloqueo 1% (Roche)) y se incubó a 42 °C en un horno de hibridación Amersham al menos durante 2 horas. Después de eliminar la primera solución, se añadieron otros 10 ml de solución de hibridación, que consistió en solución de prehibridación suplementada con el ADN sonda, previamente desnaturalizado por calor (100°C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante otros 2 minutos. La membrana se incubó con la solución de hibridación a la misma temperatura toda la noche. Tras la hibridación, el filtro se lavó 2 veces con una solución SSC 2x y SDS al 0,1% (p/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y después otras 2 veces con una solución SSC 0,1x y SDS al 0,1% (p/v) a 68°C durante 15 minutos. Una vez lavado el filtro, se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos frente a la digoxigenina según las indicaciones de los proveedores (Roche®). Finalmente, el ADN marcado se detectó por su capacidad de emisión de luz a una longitud de onda de 477 nm. Dicha emisión de luz se estableció poniendo en contacto el filtro con una película autorradiográfica (Kodak X-Omat®). El tiempo de exposición (30 minutos a 6 horas) varía en función de la concentración de ADN, el % de homología entre los ADNS sonda y problema y la del marcaje.

Para el revelado de la película se empleó el revelador y fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

## **8. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **8.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR se llevó a cabo preparando una mezcla de reacción con tampón de PCR (10x), Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM, dNTPs 0,3 mM, 50 pmol de cada cebador, 10-50 ng de ADN molde, 2 unidades de Taq Polimerasa (Biotherm) en un volumen final de 50 µl. Para el proceso se utilizó un termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo®) con un programa básico consistente en un ciclo de

desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94°C, 1 minuto), apareamiento del cebador (55-60°C dependiendo de la secuencia del cebador, 1 minuto) y extensión (72°C, 1-4 minutos según la longitud del fragmento a amplificar) y finalmente un último ciclo de extensión (72°C, 10 minutos). Los cebadores empleados en este trabajo se describen en la Tabla M4.

**Tabla M4.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Usado para</b>
<b>pvir1</b>	TTAGAATTCAGTGCAGACGAAATCATTGC ( <i>EcoRI</i> )	Delección región <i>virB</i>
<b>pvir2</b>	TTAAAGCTTGTGCGAGATGCAACTAGCCTC ( <i>HindIII</i> )	Delección región <i>virB</i>
<b>pvir3</b>	TTAAAGCTTCTACGAAGTGATCGTAAACC ( <i>HindIII</i> )	Delección región <i>virB</i>
<b>pvir4</b>	TTAGGATCCGCCTTGAGTCTGCGATCTTA ( <i>BamHI</i> )	Delección región <i>virB</i>
<b>m0967.up.f</b>	TTTAAGCTTGAGGCGTATGGTCTTTGC ( <i>HindIII</i> )	Delección <i>SMa0967</i>
<b>m0967.up.r</b>	TTTCCCGGGAACAGGCAGAGGATGACG ( <i>SmaI</i> )	Delección <i>SMa0967</i>
<b>m0967.do.f</b>	TTTCCCGGGAATTCCTCGTGCAACACC ( <i>SmaI</i> )	Delección <i>SMa0967</i>
<b>m0967.do.r</b>	TTTTCTAGAGCTTCCAGCAGGCATCGC ( <i>XbaI</i> )	Delección <i>SMa0967</i>
<b>m20835.up.f</b>	TTTAAGCTTACAGGCTGCGGAAGAAGC ( <i>HindIII</i> )	Delección <i>SMB20835</i>
<b>m20835.up.r</b>	TTTCCCGGGACTCGGAGAGCTTGAACG ( <i>SmaI</i> )	Delección <i>SMB20835</i>
<b>m20835.do.f</b>	TTTCCCGGGCAGATGTTGAGACTCG ( <i>SmaI</i> )	Delección <i>SMB20835</i>
<b>m20835.do.r</b>	TTTTCTAGATTCCAATGATCAACTTCC ( <i>XbaI</i> )	Delección <i>SMB20835</i>
<b>ΔSMa0941.1</b>	AAAAAGCTTATCGAGTCCTACTCATCTGG ( <i>HindIII</i> )	Delección <i>SMa0941</i>
<b>ΔSMa0941.2</b>	GCAGCAATCAACGACCTCAAACCACAGG	Delección <i>SMa0941</i>
<b>ΔSMa0941.3</b>	CCTGTGTTTTGAGGTCGTTGATTGCTGC	Delección <i>SMa0941</i>
<b>ΔSMa0941.4</b>	AAAAAGCTTTGAGGTGATAGAGATTGCCG ( <i>HindIII</i> )	Delección <i>SMa0941</i>
<b><i>rctB</i>mut.f</b>	AATTCTAGAAGTTCGGCGACAAACG ( <i>XbaI</i> )	Mutación <i>SmrctB</i>
<b><i>rctB</i>mut.r</b>	AATTCTAGATTGATCACCATGTGCG ( <i>XbaI</i> )	Mutación <i>SmrctB</i>
<b><i>rctR</i>mut.f</b>	TTTAAGCTTTGTCGAACCGATGAACACCG ( <i>HindIII</i> )	Mutación <i>rctR</i>
<b><i>rctR</i>mut.r</b>	TTTAAGCTTATAGGGTAGAAGAATGCCCG ( <i>HindIII</i> )	Mutación <i>rctR</i>
<b>ΔSMa0961.1</b>	AAAGGATCCCCATCAATGTTGAAAGCG ( <i>BamHI</i> )	Delección <i>SMa0961</i>
<b>ΔSMa0961.2</b>	CGAGTACATTCTCGCCTGATGTTATCCG	Delección <i>SMa0961</i>
<b>ΔSMa0961.3</b>	CGGATAACATCAGGCGAGAATGTACTCG	Delección <i>SMa0961</i>
<b>ΔSMa0961.4</b>	AAAGGATCCGCATCAATATGTAGCGTGG ( <i>BamHI</i> )	Delección <i>SMa0961</i>
<b>attAop1</b>	AAAAGATCTTCGCATCAACGACTACTAGC ( <i>BglII</i> )	Delección <i>SMa0950/53</i>

Oligo	Secuencia 5'-3'	Usado para
<b>attAop2</b>	CGTGTCCCACATATAACCGTTTGCTCAGC	Delección <i>SMa0950/53</i>
<b>attAop3</b>	GCTGAGCAAACGGTATATGTGGGACACG	Delección <i>SMa0950/53</i>
<b>attAop4</b>	AAA <u>AGATCT</u> CAACCTTATCGACGACAAGG ( <i>Bg</i> III)	Delección <i>SMa0950/53</i>
<b>atrBC59.1</b>	TTTGTGCGTGGACTTGACG	Delección <i>SMa0956/59</i>
<b>atrBC59.2</b>	CCGAAAGAAGGACGTGAAGCGAAGCAGG	Delección <i>SMa0956/59</i>
<b>atrBC59.3</b>	CCTGCTTCGCTTCACGTCCTTCTTTTCGG	Delección <i>SMa0956/59</i>
<b>atrBC59.3</b>	CAGTTCGCTCACATCGGAGC	Delección <i>SMa0956/59</i>
<b>SMa0907.r</b>	TTT <u>GGATCC</u> GTGTTCTTATCGTCTCGCCC ( <i>Bam</i> HI)	Mutación <i>SMa0907/SMa0907</i> <sup>++</sup>
<b>SMa0907.f</b>	TTT <u>GGATCC</u> AAGGATAGATGCCAAGAGCC ( <i>Bam</i> HI)	Mutación <i>SMa0907/SMa0907</i> <sup>++</sup>
<b>SmrctB.f</b>	AT <u>AGGATCC</u> ACAGGACTCTCAGCC ( <i>Bam</i> HI)	<i>SmrctB</i> <sup>++</sup>
<b>SmrctB.r</b>	AAAGGATCCCACGCTTAAACGGC ( <i>Bam</i> HI)	<i>SmrctB</i> <sup>++</sup>
<b>SMa0941f</b>	AT <u>GGATCC</u> TATGCGGGTAGACC ( <i>Bam</i> HI)	<i>SMa0941</i> <sup>++</sup>
<b>SMa0941r</b>	AT <u>GGATCC</u> GTGGAAGACAATCC ( <i>Bam</i> HI)	<i>SMa0941</i> <sup>++</sup>
<b>SMa0939-40f</b>	AT <u>GGATCC</u> ACGAATGTGAAGGC ( <i>Bam</i> HI)	<i>SMa0939-40</i> <sup>++</sup>
<b>SMa0939-40r</b>	AT <u>GGATCC</u> CAGAAGCGTTCCTCG ( <i>Bam</i> HI)	<i>SMa0939-40</i> <sup>++</sup>
<b>0961exp.F</b>	AAAGGATCCGGTGAACCTGAAGAAGTAGC ( <i>Bam</i> HI)	<i>SMa0961</i> <sup>++</sup>
<b>0961exp.R</b>	AAAGGATCC TGGTTTGAGGTATTCCTACG ( <i>Bam</i> HI)	<i>SMa0961</i> <sup>++</sup>
<b>rctR.f</b>	AA <u>CCCGGG</u> GCTGCTGGACGCTCTTCG ( <i>Sma</i> I)	<i>rctR</i> <sup>+</sup>
<b>rctR.r</b>	AA <u>CCCGGG</u> TAGATGCTTGGACCTACTG ( <i>Sma</i> I)	<i>rctR</i> <sup>+</sup>
<b>atrBopr.f2</b>	AAA <u>AGATCT</u> TTACGGTCTATCGTCTCG ( <i>Bg</i> III)	<i>SMa0956/59</i> <sup>+</sup>
<b>atrBopr.r2</b>	AAA <u>AGATCT</u> CAACCAGGACAGCGAGCG ( <i>Bg</i> III)	<i>SMa0956/59</i> <sup>+</sup>
<b>TA10-F</b>	AAAGGATCCCCTTCTTTTCCCCTTTGC ( <i>Bam</i> HI)	( <i>oriT</i> + <i>traA1</i> ) <sup>+</sup>
<b>TA10-R</b>	AAAGGATCCGGTTGACGATCTCGATGG ( <i>Bam</i> HI)	( <i>oriT</i> + <i>traA1</i> ) <sup>+</sup>
<b>TA20-F</b>	AAAGGATCCCAGCTCAGTACATCCGTG ( <i>Bam</i> HI)	( <i>oriT</i> + <i>traA2</i> ) <sup>+</sup>
<b>TA20-R</b>	AAAGGATCCCAACACAAACGCGTCACT ( <i>Bam</i> HI)	( <i>oriT</i> + <i>traA2</i> ) <sup>+</sup>

Los sitios de restricción usados en clonación están subrayados y las enzimas se indican entre paréntesis.

<sup>+</sup> Complementación de genes; <sup>++</sup> Sobreexpresión de genes.

## 8.2. Amplificación de fragmentos de ADN de gran tamaño

Cuando el tamaño de amplificado superó las 4 Kb, se empleó un protocolo similar al anterior pero cambiando la Taq polimerasa de SIGMA por una mezcla de dos enzimas: una

mezcla madre 16:1 de Taq polimerasa (Biotherm) y una enzima correctora de errores Pfu (Accutherm), tomando de esa mezcla el volumen necesario para que en la reacción final se tuvieran 2 unidades de Taq polimerasa de Biotherm y 0,2 unidades de Pfu de Accutherm.

Para amplificaciones de alta fidelidad, necesarias por ejemplo para la posterior clonación y expresión de genes, se usaron dos protocolos diferentes:

1.- Se empleó la enzima iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Biotherm®), una enzima correctora de errores que no deja colas poliA. La reacción de PCR con esta enzima consta de un Buffer 5x suministrado en el kit, 1 µl de una solución de 10mM de dNTPs, 50 pmoles de cada cebador, 1 unidad de la enzima y cantidades variables de DNA y DMSO (también suministrado en el Kit). Se completa hasta 50 µl con agua Milli-Q estéril. Las peculiaridades del termociclado usando esta enzima son que los ciclos de desnaturalización del ADN se hacen a una temperatura de 98°C, las temperaturas de apareamiento del cebador rondan los 65°C y unos 15 a 30 segundos de extensión por cada kilobase (nunca exceder de 1 minuto la etapa de extensión por Kb). Al dejar extremos romos se procede después a hacer un “Tailing” (incorporación de colas poliA para el clonaje); para ello se toman 7 µl de la reacción de PCR y se añade 1 µl de Buffer 10x, 1 µl de dATP (2mM) y 1µl de Taq polimerasa de SIGMA. Se introducen en el termociclador y se dejan 30 minutos a 70°C para que se realice el proceso.

2.- Se usó la enzima Accuprime Taq DNA Polymerase High-Fidelity (Invitrogen), una enzima correctora de errores que además deja colas poliA necesarias para la clonación posterior. La reacción de PCR solo necesita 1 unidad de la enzima, 5 µl del buffer suministrado en el kit, 50 pmoles de cada cebador y se completa con agua Milli-Q estéril hasta un volumen de 50 µl. La única peculiaridad de su proceso de termociclado es que no necesita periodo de extensión y al dejar colas poliA no es necesario realizar un “tailing” posterior a la PCR.

### **8.3. Mutagénesis *in vitro* por delección mediante PCR solapante**

Las versiones delecionadas de los distintos genes se han obtenido fusionando, mediante reacción de PCR, dos amplicones solapantes, correspondientes al ADN que flanquea a izquierda y derecha la delección, metodología basada en Ho y colaboradores (1989) y Griffiths y Long (2008).

Para la amplificación de las regiones de ADN que flanquean a derecha o izquierda la delección deseada, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 10 ng de ADN genómico de 1021 como ADN molde, tampón II PCR Accuprime (10x), 0,2 unidades de Accuprime Taq

Polimerasa para evitar generar mutaciones no deseadas aguas arriba o abajo del gen por errores de la polimerasa, 10  $\mu$ M de los cebadores correspondientes al fragmento a amplificar (Tabla M4) y completando con agua desionizada hasta un volumen de 50  $\mu$ l. Para obtener el producto de fusión, se realizó una segunda reacción de PCR utilizando 2 ng de cada uno de los flancos obtenidos previamente. El producto de fusión tiene un tamaño que oscila entre 1,4-2 Kb con aproximadamente 700-900 pb correspondientes a cada flanco.

## 9. EXPERIMENTOS DE TRANSCRIPTÓMICA CON MICROARRAYS

### 9.1. Reversotranscripción del ARN

Se tomaron 15  $\mu$ g de ARN total de *Rhizobium* purificado y se llevaron a un volumen final de 13  $\mu$ l con agua para ARN. Se añadieron 5  $\mu$ l de una mezcla de hexanucleótidos (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se incubó a 70°C durante 10 minutos. A continuación se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos y se añadieron 6  $\mu$ l de solución 5xRT (Stratagene), 3  $\mu$ l de solución 0,1 M de DTT (Stratagene), 0,5  $\mu$ l de inhibidor de RNasa (40 U/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l de reverso transcriptasa (SuperscriptII; Stratagene) y 0,6  $\mu$ l de una solución madre de dNTPs que incluía dUTP amino modificado (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 5 mM dTTP y 20 mM aa-dUTP). Los componentes de la reacción se mezclaron y se mantuvieron durante una hora a 42°C. Transcurrido este tiempo se añadió 1  $\mu$ l más de reverso transcriptasa (SuperscriptII; Stratagene) y se dejó transcurrir la reacción durante otra hora hasta la obtención de la muestra final de ADNc.

### 9.2. Hidrólisis del ARN

Se incorporaron a la muestra 15  $\mu$ l de NaOH 0,2 M, se mezcló bien y se incubó a 70°C durante 10 minutos. A continuación se neutralizó el pH añadiendo 15  $\mu$ l de HCl 0,2 M y se procedió a limpiar el ADNc utilizando columnas CyScribe GFX (Amersham Biosciences). Para ello se mezcló la muestra con 450  $\mu$ l de tampón de captura y se aplicó a una columna CyScribe GFX que se centrifugó a 13.000 rpm, durante 30 segundos. Se lavó la columna 3 veces con 600  $\mu$ l de etanol al 80% y se centrifugó luego una vez más a 13.000 rpm durante 10 segundos para eliminar restos de líquido. Se colocó la columna en un nuevo tubo y se añadieron 60  $\mu$ l de bicarbonato sódico 0,1 M a pH 9. Se incubó a temperatura ambiente 5

minutos y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para recuperar el ADNc. Según las recomendaciones del fabricante, se procedió inmediatamente al marcaje de la muestra.

### **9.3. Marcaje del ADNc**

El ADNc se marcó utilizando como fluoróforo Cy3 para las condiciones control y Cy5 para las condiciones de estudio. Tanto los fluoróforos como las muestras marcadas se mantuvieron protegidos de la luz en la medida de lo posible a lo largo de todo el proceso.

Los fluoróforos (Amersham) se disolvieron en 10  $\mu$ l de DMSO (es importante que el DMSO no contenga agua) y se prepararon 10 alícuotas de 1  $\mu$ l del fluoróforo que se desecaron en “Speed-Vacuum” y se conservaron a -20°C en bolsas selladas con un paquete de silica gel para evitar su hidratación.

Para llevar a cabo la reacción de marcaje se transfirió la muestra a un microtubo con una alícuota del fluoróforo correspondiente y se resuspendió pipeteando. Alternativamente se añadió 1  $\mu$ l del fluoróforo recién resuspendido en DMSO y se pipeteó hasta obtener una suspensión homogénea. Se dejaron transcurrir entre 1 y 2 horas manteniendo la suspensión a temperatura ambiente en oscuridad y a continuación se procedió a neutralizar los fluoróforos que pudieran haber quedado libres, añadiendo 4,5  $\mu$ l de hidroxilamina 4 M, mezclando suavemente y dejando la mezcla 15 minutos más a temperatura ambiente en oscuridad.

Las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 que constituían una sonda, se mezclaron en este momento y se purificaron juntas utilizando el CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante. La muestra marcada con Cy5 se mezcló con 600  $\mu$ l de Solución de Captura y luego se añadió la muestra marcada con Cy3. Tras pipetear repetidas veces para obtener una mezcla homogénea, ésta se aplicó a una columna CyScribe GFX. Se centrifugó la columna a 13.000 rpm durante 30 segundos y se eliminó el eluido. Se lavó la columna 2 veces con 600  $\mu$ l de solución de lavado y se centrifugó luego a 13.000 rpm durante 10 segundos para eliminar restos de líquido. Se colocó la columna en un nuevo microtubo y se añadieron 60  $\mu$ l de solución de elución. Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para recuperar el ADNc marcado. El ADNc marcado de esta forma puede mantenerse a -20°C hasta el momento de su utilización.

#### **9.4. Procesamiento del microarray previo a la hibridación**

Los Sm6koligo microarrays que se utilizaron son cristales QMT con grupos epoxi a los que se unen los oligonucleótidos. Cada Sm6koligo microarray contiene 6212 oligonucleótidos de 70 monómeros de bases que representan todos los ORFs contemplados en la anotación de *S. meliloti* Rm1021 (Rüberg *et al.*, 2003). De este modo se imprimen sobre el cristal 20.160 gotas que representan todos los ORFs contemplados en la anotación de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) por triplicado (en algunos casos hasta 16 réplicas).

Estos cristales deben ser procesados antes de la hibridación para bloquear los grupos epoxi libres. Para ello se lavaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en Solución I (se disuelven 25 µl de Triton X100 en 25 ml de agua Milli-Q, calentando 5 minutos a 80°C y se deja enfriar a temperatura ambiente antes de usar), luego se lavaron dos veces durante 2 minutos a temperatura ambiente en Solución II (5 µl de HCl 37% en 50 ml de agua Milli-Q), se mantuvieron durante 10 minutos a temperatura ambiente en Solución III (2,5 ml KCl 1M en 22,5 ml de agua Milli-Q), se aclararon 1 minuto en agua Milli-Q a temperatura ambiente y se transfirieron a la Solución de Bloqueo (15 ml de agua Milli-Q, 4 µl de HCl 37% y 5 ml de 4xQMT Blocking Solution) que se preparó en el momento y se precalentó a 50°C antes de su uso. Los cristales se mantuvieron en la Solución de Bloqueo a 50°C durante 15 minutos en un contenedor de cristal, se aclararon 1 minuto en agua Milli-Q a temperatura ambiente y finalmente se secaron por centrifugación a 1.200 rpm durante 3 minutos.

#### **9.5. Hibridación de los Sma6kOligo microarrays usando un cubreobjetos y una cámara de hibridación**

Las muestras de ADNc marcado se desecaron utilizando un “Speed-Vacuum” y se resuspendieron en 50 µl de DIG Easy Hyb pipeteando varias veces y se incubaron a 65°C durante 5-10 minutos. Los cristales pretratados según las instrucciones del apartado anterior se colocaron a 42°C en una cámara de hibridación “Thermomixer comfort” para evitar posibles precipitaciones debidas a gradientes térmicos. La sonda se aplicó como una gota sobre el cristal y a continuación se colocó el cubreobjetos de modo que no quedasen burbujas. La hibridación se incubó a 42°C durante 14-18 horas.

### 9.6. Procesamiento del microarray tras la hibridación

Transcurrido el tiempo necesario para la hibridación, los cristales se lavaron primero con una solución SSC 2x y SDS al 0,2% (p/v) durante 5 minutos a 42°C, luego dos veces con una solución SSC 2x y SDS al 0,1% (p/v) durante 1 minuto a temperatura ambiente, otras dos veces con una solución SSC 0,2x durante 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente una vez con una solución SSC 0,1x preenfriada a 18°C durante 1 minuto. Por último, los cristales se secaron por centrifugación a 1.200 rpm durante 3-5 minutos y se dejaron a temperatura ambiente un mínimo de 20 minutos antes de escanearlos. Durante todo el proceso se mantuvieron los cristales en oscuridad en la medida de lo posible.

### 9.7. Adquisición de la imagen y tratamiento de datos

Se utilizó un escáner confocal (ScanArray4000) para la obtención de las imágenes correspondientes a la utilización de los láseres de 555 nm y 647 nm para detección de la fluorescencia de Cy3 y Cy5, respectivamente. Para la obtención de los datos se utilizó el programa ImaGene5.5 (Biodiscovery Inc., Los Angeles Calif., USA) que determinó la intensidad de los distintos puntos impresos en el cristal así como la intensidad del fondo asociado a cada punto y la calidad del punto (según su forma, tamaño e intensidad respecto al fondo). Se obtuvo el valor del  $\log_2$  de la relación entre las intensidades detectadas de cada fluoróforo para cada punto (M) mediante la fórmula  $M_i = \log_2 (R_i/G_i)$ , siendo  $R_i = I_{ch1i} - B_{gch1i}$  y  $G_i = I_{ch2i} - B_{gch2i}$ , donde  $I_{ch1i}$  o  $I_{ch2i}$  son la intensidad de un punto en el canal 1 ó 2 y  $B_{gch1i}$  o  $B_{gch2i}$  son la intensidad del fondo asociado al punto en el canal 1 ó 2, respectivamente. También se calculó la intensidad media para cada punto (A) según la fórmula  $A_i = \log_2(R_i G_i)^{0,5}$ . Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Para la normalización de los datos y el análisis estadístico de las réplicas se utilizó el programa EMMA 2.8 (Dondrup *et al.*, 2003), un programa específicamente diseñado para el análisis de datos de microarrays en la Universidad de Bielefeld (Bioinformatics Resource Facility, Center of Biotechnology) (<http://www.genetik.uni-bielefeld.de/EMMA/>). Con este programa se obtuvieron los correspondientes valores de M y A normalizados y promediados en las réplicas con una calidad aceptable (n) junto con el valor de fiabilidad de estos datos (p) según una t de Student. Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos genes para los que  $n=6$ ,  $p \leq 0,05$ ,  $A \geq 7$  y  $M \geq 0,9$  o  $M \leq -0,9$  (es decir, si su expresión variaba dos veces como mínimo entre ambas condiciones experimentales) en todos los experimentos que se llevaron a cabo.

## 10. RT-qPCR (REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE REAL-TIME PCR)

La RT-PCR (“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”) permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. De esta forma, se puede medir la expresión génica mediante una técnica alternativa al Northern Blot o Dot Blot, ensayos de protección de RNasa, hibridación *in situ*, y ensayos de nucleasa S1. La RT-PCR es más sensible que estas técnicas y requiere menos RNA. Sin embargo, la presencia de RNA o DNA contaminante, tanto en las muestras como en el laboratorio y reactivos, debe evitarse con el fin de impedir la aparición de productos inespecíficos. Hay dos partes diferenciadas en cualquier RT-PCR: la síntesis de cDNA y la reacción de amplificación.

### 10.1. Síntesis de cDNA para RT-qPCR

Se tomó 1 µg de ARN total de *Rhizobium* purificado y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua. Se añadió 1 µl de una mezcla de hexanucleótidos (100 ng/ µl) y 1 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM) y se incubó a 65°C durante 10 minutos. A continuación se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos y se añadieron 4 µl de solución 5xRT (Stratagene), 2 µl de solución 0,1 M de DTT (Stratagene®) y 1 µl de inhibidor de RNasa (40 U/ µl ). Se incubó a 25°C durante 2 minutos y se adicionó 1 µl de reverso transcriptasa (SuperScript II; Stratagene®). Los componentes de la reacción se mezclaron y se incubaron primero a 25°C durante 10 minutos y luego una hora a 42°C. Para inactivar la reacción, se incubó a 65°C durante 15 minutos y posteriormente se conservó a -20°C hasta su uso.

### 10.2. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa

La amplificación de los fragmentos de cDNA para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se realizó utilizando Platinum® Taq ADN polymerase (Invitrogen®). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador IQ de BIORAD. La mezcla para la reacción contenía: 1 µg de ARN reverso transcrito (cDNA), 0,2 µM de los oligonucleótidos específicos del gen a estudiar, 0,2 mM de mezcla de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solución de SYBR Green I 0,1x y Platinum Taq ADN polimerasa (1-2,5 U). Las

condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron 35 ciclos a 94°C, 45"; 55°C, 45"; 72°C, 30", y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos. La temperatura de hibridación se cambió en función de los cebadores utilizados. A continuación se llevaron a cabo 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, otro ciclo de 1 minuto a 70°C y 90 ciclos de 10 segundos a 55°C. Terminada la reacción se realizó un análisis de la curva de Melting o curva de fusión para la determinación de la formación de productos inespecíficos.

La expresión relativa se ha cuantificado según el método de Pfaffl (2001). En este modelo las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia (16S) se toman en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{problema}})^{\Delta CP_{\text{problema}}(\text{control-experimento})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control-experimento})}}$$

En esta ecuación el ratio del gen en estudio (problema) se expresa en una condición experimento frente a una condición control, en comparación con un gen de referencia (16S).  $E_{\text{problema}}$  representa la eficiencia de la PCR a tiempo real del gen en estudio;  $E_{\text{ref}}$  representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gene de referencia (16S);  $\Delta CP_{\text{problema}}$  es la desviación en Ct de las condiciones control menos de las condiciones experimento del gen problema; y  $\Delta CP_{\text{ref}}$  es la desviación en Ct de las condiciones control menos de las condiciones experimento del gen de referencia. En este modelo también es necesario conocer la eficiencia de PCR de cada gen estudiado. Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar (a) obtenidas después de realizar diluciones seriadas de ADN genómico de *S. meliloti* 1021 con las reacciones de la PCR a tiempo real (Pfaffl, 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula ( $E=10[-1/a]-1$ ). En la tabla M5 se describen los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de RT-qPCR en este trabajo.

Tabla M5. Oligonucleótidos usados en los experimentos de RT-qPCR

Gen	Oligo Forward (5' - 3')	Oligo Reverso (5' - 3')
<i>SMa0967</i>	GACGAGCCACACACGAAA	CTTGAATGAACGATGAGG
<i>SMb20835</i>	GCACAGCCTCAAGTTCCT	CGCCTCGTCGGTTATCTC
<i>SMa1077 (nex18)</i>	GTCAATTCAAGACGCTGG	GGTTTCAGCAGGTTTTTCG
<i>SMa2402 (rhhB)</i>	TGAACATCAACGTCGCTG	GGAGTAGAGACTGCTTGC
<i>SMb20094</i>	ACAGTACGTTTCGATCAGG	TGCGGATCTTCAGTTTTCG
<i>SMb20946 (exoY)</i>	CGCAGTTTCGACGTTCTTGC	TCAGGCACTTGAAGGATTGG
<i>SMb21314 (wgeA)</i>	TGACGACTTGCTGTTCGG	TCGCCATAGATCAGGTCG
<i>SMa1323 (rctA)</i>	TCCTCTACATGATGCACC	GTCTCTGTAAGTATCCCG
<i>SMa1321 (virB1)</i>	GAGGCTGAAGCTCTCAAT	CGTAGTAGGATTGCAGCA
<i>SMa0933 (traC)</i>	CCAGATCGAAAAGCTGCG	TCAAGCTCCTCCTCAGTG
<i>SMa0974 (SmrctB)</i>	TCCTCTACATGATGCACC	CGCATCAGAATACCTACG
<i>SMa0941</i>	TGAAGCCTTTCTCAGCCA	GCATCATCATCGATAGCC
<i>SMa0956</i>	TTTACAGATGGAACCACC	TGGATGAGCGTCGTGAAG
<i>SMa0953</i>	AGCCTTGACGATGATTGC	AAGAGTGCGTACTTCTGG
<i>SMa0961</i>	GCCGAGCTTTTTCTTCTG	ACAATCAACCAGGACAGC
<i>SMc03224 (16S)</i>	TCTACGGAATAACGCAGG	GTGTCTCAGTCCCAATGT

## 11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCURONIDASA

### 11.1. Actividad $\beta$ -glucuronidasa

Algunos ensayos de expresión génica se llevaron a cabo con las cepas de *Rhizobium* portadoras fusiones génicas con el gen *uidA* (*gusA*). Las cepas objeto de estudio se incubaron a 28°C durante 24 horas con los antibióticos correspondientes. Se diluyeron los cultivos, utilizando 0,2-1 ml del cultivo, según la  $D.O_{600nm}$ . Las células se precipitaron y tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 740  $\mu$ l de tampón de ensayo (tampón fosfato sódico 50 mM, DTT 5 mM y EDTA 1 mM), 50  $\mu$ l de SDS 0,1% y 100  $\mu$ l de cloroformo. Se agitaron dos veces durante 15 segundos y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10  $\mu$ l de PNPG 100 mM (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónico) precalentado a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C hasta que se detectó el cambio de color y entonces se paró

la reacción con 200 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M y se anotó el tiempo transcurrido. Se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 405 nm. Las unidades Miller se calcularon según la ecuación: (T: tiempo (minutos); V: volumen del cultivo utilizado (ml))

$$U_{\text{Miller}} = \frac{D.O_{405\text{nm}} \times 1000}{T \times V \times D.O_{600\text{nm}}}$$

### 11.2. Determinación de proteína (reactivo de Biorad®)

Se empleó el método de Bradford (1976) para determinar la concentración de proteína en células enteras. Para ello fue necesario realizar el tratamiento previo de lisis que se describe a continuación: se tomaron tres alícuotas de 200 µl de cada muestra y se les adicionó 1 volumen de NaOH 2M; se agitaron en vórtex y se hirvieron durante 20 minutos, se centrifugaron durante 3 minutos a 12.000 rpm para eliminar los restos celulares, se tomaron 100 µl de sobrenadante de cada muestra y se añadieron 700 µl de agua y 200 µl de reactivo de Bradford; se agitó y se incubó entre 2 y 60 minutos. La concentración de la proteína se calculó después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contenía 800 µl de agua y 200 µl del reactivo de Bradford. La concentración de proteína se calculó mediante interpolación a una curva patrón que se preparó con albúmina bovina (Sigma®).



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



# **CAPÍTULO I**



## MOVILIZACIÓN DEPENDIENTE DE pSymA DEL MEGAPLÁSMIDO pSymB DE *Sinorhizobium meliloti*

### Resumen

*Sinorhizobium meliloti* 1021 posee dos megaplásmidos, pSymA de 1,354 Kb y pSymB de 1,683 Kb, que son esenciales para el establecimiento de la simbiosis con alfalfa y para la supervivencia de la bacteria en la rizosfera. Pérez-Mendoza y colaboradores (2005) mostraron que el pSymA es autotransmisible y que sus funciones conjugativas están reguladas por el represor transcripcional RctA. En este trabajo se muestra por primera vez la transferencia conjugativa de pSymB como un evento de movilización en *trans* que requiere el sistema de secreción tipo IV codificado por pSymA. pSymB posee un *oriT* funcional así como un gen *traA2*, que codifica para una probable relaxasa, el cual es también transcripcionalmente reprimido por *rctA*. Ambos megaplásmidos simbióticos parecen requerir la presencia de los genes codificantes para las correspondientes relaxasas en *cis* con sus respectivos *oriTs* para alcanzar máximas frecuencias de transferencia conjugativa.

### 1.1. Genes conjugativos de pSymA y pSymB de *S. meliloti* 1021

Las especies bacterianas pertenecientes a la familia Rhizobiaceae usualmente poseen grandes plásmidos que codifican diversas funciones, determinantes de sus estilos de vida en el suelo y la rizosfera. En muchos rizobios, los genes necesarios para el establecimiento de asociaciones simbióticas con plantas leguminosas están localizados en los denominados plásmidos simbióticos (pSyms). La transferencia conjutativa de estos plásmidos ha sido probablemente de gran importancia para la evolución de los rizobios. Aunque la transferencia conjugativa de plásmidos entre rizobios se ha detectado en numerosas ocasiones, la transferencia de estos plásmidos ocurre a muy baja frecuencia bajo condiciones de laboratorio, lo que sugiere la existencia de estrictos sistemas de regulación. Se han detectado dos tipos de plásmidos según el mecanismo de regulación de la transferencia conjugativa que presentan: plásmidos QS (Quorum Sensing) y plásmidos regulados por *rctA* (revisado en Ding & Hynes, 2009). La primera clase incluye diversos plásmidos de varias especies, cuya transferencia ocurre en respuesta a la densidad de población, de forma similar al plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Por el contrario, la transferencia de plásmidos regulados por *rctA*, como pRetCFN42 de *Rizobium etli* y pSymA de *Sinorhizobium meliloti*, es reprimida por el regulador transcripcional RctA (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2008).

El genoma de *S. meliloti* 1021 está compuesto por tres replicones: un cromosoma circular de 3,65 Mb, y dos replicones plasmídicos, pSymA y pSymB, de 1,35 Mb y 1,68 Mb, respectivamente (Galibert *et al.*, 2001). El tamaño inusual de los megaplásmidos plantea la cuestión de si son realmente plásmidos o cromosomas. Del total del genoma de la bacteria, un 2.2% corresponde a secuencias de inserción (IS) y secuencias de fagos, pero la distribución de las mismas no es homogénea (Galibert *et al.*, 2001). La abundancia de estas secuencias es mayor en pSymA, especialmente cerca de los genes simbióticos, una característica similar a otras regiones simbióticas de rizobios (Kaneko *et al.*, 2000; Freiberg *et al.*, 1997; Gottfert *et al.*, 2001; Viprey *et al.*, 2000). Este hecho aporta una evidencia adicional a la hipótesis de que las regiones simbióticas son propensas a reordenaciones del ADN (Kaneko *et al.*, 2000). Otra característica común a los plásmidos simbióticos es el menor contenido de G+C en comparación con el resto del genoma (Galibert *et al.*, 2001).

pSymA es considerado como el “verdadero” plásmido simbiótico de la cepa, puesto que porta la mayoría de los genes necesarios para la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno (Galibert *et al.*, 2001). Los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno

también se encuentran localizados particularmente en pSymA: la mayoría de genes *nif* (*nifA*, *nifB*, *nifHDKE*, *nifX*, *nifN* y *nifS*) y *fix* (*fixABCX*, *fixLJ*, *fixMNOQP*, *fixGH*, etc), una glutamato deshidrogenasa (*gdhA*), un conjunto completo de genes necesarios para la desnitrificación (*nos*, *nor* y *nap*) y genes para el transporte de nitrato. Por su parte, pSymB codifica una nitrato reductasa (*narB*), dos transportadores de nitrato y una glutamina sintasa (*glnII*). *S. meliloti* es una bacteria aeróbica que debe de generar altos niveles de energía para mantener la fijación de nitrógeno en un medio con baja concentración de oxígeno. La citocromo C oxidasa, que pertenece al tipo de  $cbb_3$  con una alta afinidad por el oxígeno, está codificada por dos conjuntos de genes duplicados *fixNOQP* incluidos ambos en pSymA. Tanto pSymA como el cromosoma portan un gran conjunto de genes NADH ubiquinona deshidrogenasa, que puede ayudar a incrementar el metabolismo energético durante la simbiosis, posiblemente junto con la  $cbb_3$  oxidasa. pSymA también codifica dos formato deshidrogenasas (Barnett *et al.*, 2001).

pSymB también se considera plásmido simbiótico, ya que contiene los genes necesarios para producir los polisacáridos de superficie y algunos de los genes necesarios para el metabolismo del nitrógeno (Finan *et al.*, 2001). Los polisacáridos de superficie de *S. meliloti*, incluyendo los exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs), polisacáridos capsulares (CPSs), y  $\beta$ -glucanos cíclicos, codificados principalmente por el cromosoma y pSymB, son cruciales para realizar con éxito la infección a la planta, posiblemente por supresión de las respuestas de defensa de la planta (Viprey *et al.*, 2000). Existe una gran abundancia en pSymB de sistemas de transporte, sobre todo de tipo ABC, relacionados con la utilización de diversos sustratos como fuentes de nitrógeno o carbono, los cuales podrían ser importantes para la bacteria en la rizosfera (Nogales *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado recientemente por estudios genéticos y transcriptómicos que pSymB parece portar un gran número de genes que se activan después de un choque osmótico y que deben tener una función activa en el proceso de osmoadaptación de *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). En conjunto, los datos apoyan la idea de que pSymB desempeña una función importante en la competencia saprofítica de *S. meliloti* en el suelo (Finan *et al.*, 2001).

No existen genes esenciales en pSymA, por lo que este plásmido puede ser curado de la cepa silvestre, como se comprobó en la cepa de *S. meliloti* A818, derivada de Rm2011 (Oresnik *et al.*, 2000). Por el contrario, en pSymB existen genes esenciales, que hacen que sea imprescindible para la supervivencia de la bacteria, tales como el ARNt<sup>Arg</sup>tRNA<sub>CCG</sub>, los

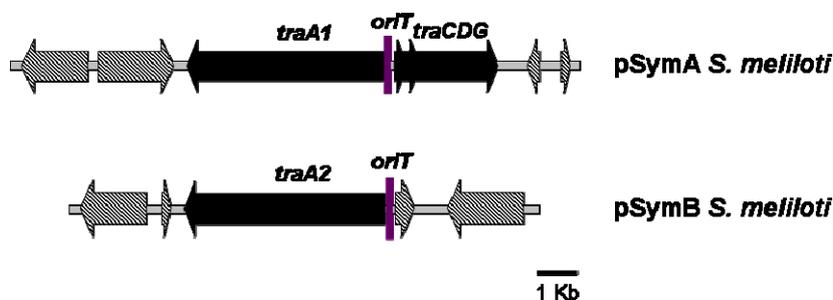
genes de división *minCDE* y dos genes candidatos para la síntesis de asparagina (*asn*), uno de ellos requerido para el crecimiento en medio mínimo. Por esto, se considera a pSymB como un segundo cromosoma debido a que transporta funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria (Finan *et al.*, 2001), aunque posea las funciones de replicación y el *oriV* típico de plásmidos (Wong *et al.*, 2002). La existencia de replicones plasmídicos que codifican funciones esenciales para la bacteria, que habitualmente se localizan en el cromosoma, ha llevado a algunos autores a acuñar el término “crómido” para los mismos (Harrison *et al.*, 2010).

Con respecto a la transferencia conjugativa, pSymA incluye una región con claros homólogos a *traA* (*traA1*) y *traCDG*, así como una secuencia *oriT* de tipo RSF1010 (Figura 1.1), pero carece de los genes *traIRMBF* y *trbDJKLFH* que se encuentran en otros plásmidos rizobiales (Galibert *et al.*, 2001). La función Mpf se llevaría a cabo por un sistema tipo *virB* codificado por el operón *SMa1322-virB1-virB11*, separado unas 200 Kb de *traA1* y del operón *traCDG* (Figura 1.1). El sistema *virB* es similar al T4SS codificado por los genes *virB* y *avrB* de *A. tumefaciens*. También existe un sistema llamativamente similar al pilus de *Caulobacter crescentus* (Skerker *et al.*, 2000), codificado por dos conjuntos de genes homólogos (*pilA/cpa*) localizados en el cromosoma y pSymA. *S. meliloti* carece de sistema de secreción tipo III a diferencia de *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997), *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.*, 2000) o *Bradyrhizobium japonicum* (Gottfert *et al.*, 2001), por lo que el uso del T3SS no debe ser una estrategia universal para infectar a las células de las plantas entre los rizobios, si bien desempeña una función en cuanto a la especificidad del hospedador (Perret *et al.*, 2000). Por su parte, pSymB tan sólo presenta un gen homólogo a *traA* (*traA2*) adyacente a un hipotético *oriT*, sin que se hayan identificado otros genes *tra* o algún operón tipo *virB* en su secuencia.

Aunque el plásmido pSymA posee todas las funciones necesarias para ser auto-transmisible, la transferencia de este plásmido es indetectable en condiciones de laboratorio debido a la represión que RctA, un represor transcripcional codificado por el gen *rctA*, ejerce sobre los genes de conjugación. Así, la transferencia de pSymA sólo se observa en condiciones en donde no existe esta represión, como ocurre en mutantes RctA<sup>-</sup> (Pérez-Mendoza *et al.*, 2004, 2005). En cambio, la transferencia de pSymB nunca ha sido demostrada.

## 1.2. Caracterización de los genes *traA1* y *traA2*

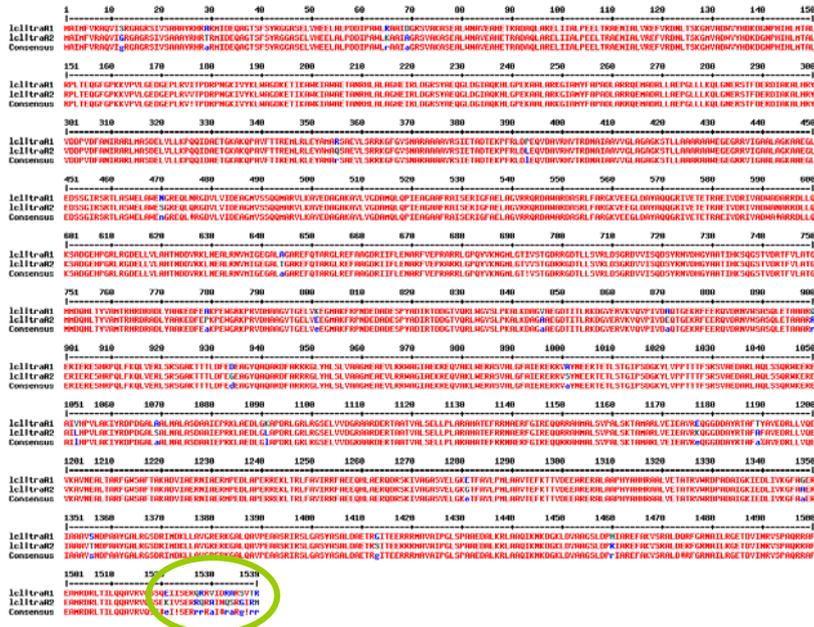
El análisis de la secuencia de pSymA y pSymB también permitió conocer las funciones de transferencia que tenían ambos plásmidos. A diferencia de pSymA, pSymB presenta una organización típica presente en plásmidos movilizables, las únicas funciones relacionadas con conjugación identificadas en pSymB son el gen *traA2*, que codifica para una probable relaxasa, y un *oriT* adyacente (Figura 1.1). Además, Pérez-Mendoza y colaboradores (2006), encontraron evidencias de que dicho *oriT* podría ser funcional. Por tanto, pSymA podría ser considerado como un plásmido autotransferible y pSymB podría ser un plásmido movilizable.



**Figura 1.1. Entorno genético de *traA1* y *traA2*.** En negro, genes implicados en la transferencia conjugativa. En morado, orígenes de transferencia. En gris, otros genes.

TraA2 muestra un 97% de identidad de secuencia con TraA1, mientras que las respectivas regiones *oriTs* (secuencias de 300 pares de bases alrededor de los hipotéticos sitios *nic*) de los plásmidos simbióticos pSymA y pSymB muestran un 95% de identidad de secuencia entre ellas (Figura 1.2). Además, el fragmento de 300 pares de bases perteneciente al *oriT* del pSymB pudo ser movilizado desde un mutante *rctA* de *R. etli* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006). La alta conservación de secuencias entre TraA1 y TraA2 era indicativa de que *traA2* podría ser funcional, a pesar de no estar asociada a otros genes *tra*. Para evaluar la posibilidad de que la expresión de *traA2* también pudiese estar regulada por RctA, se construyó una fusión transcripcional del gen *traA2* al gen reportero *gus* del plásmido pFUS1, obteniéndose la construcción pFustraA2::*gus* (véase Anexo 1.1), que se introdujo en las cepas 1021 y 1021RctA<sup>-</sup> usando la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1. Tras la cuantificación de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa, los resultados obtenidos mostraron que la expresión del gen *traA2* fue 2,6 veces más alta en un mutante *rctA* que en la cepa silvestre (35,7 y 13,5 unidades  $\beta$ -

glucuronidasa, respectivamente), lo que sugería que al igual que los genes *traA1*, *traC* y *virB* de pSymA, la expresión de *traA2* (pSymB) también está sujeta a represión por RctA.



**Figura 1.2. Comparación de las secuencias protéicas de TraA1 y TraA2.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TraA1 y TraA2. En color azul se muestran las diferencias en la secuencia, en rojo las similitudes. Las diferencias entre ambas secuencias se concentran principalmente en el extremo C-terminal de las proteínas.

### 1.3. Transferencia conjugativa del pSymB de *S. meliloti* 1021

Tal y como se ha comentado en la introducción de esta memoria de tesis, el sistema de regulación de la transferencia conjugativa más común dentro de los rizobios es la regulación por QS. En el caso de *S. meliloti* no se conoce ningún sistema de QS asociado a la conjugación de pSymA y pSymB. Tras la identificación de los genes reguladores *rctB* (activador de la transferencia conjugativa) y *rctA* (inhibidor de la transferencia conjugativa) del plásmido simbiótico de *R. etli* pRetCFN42d, mediante un análisis *in silico* del genoma de *S. meliloti* se identificó un gen que mostró un 70% de homología con el gen *rctA* de *R. etli*, *SMa1323*. Se demostró la funcionalidad del homólogo de *rctA* de *S. meliloti* mediante complementación *in trans* de mutantes defectivos en *rctA* de *R. etli* con construcciones que portaban el gen *SMa1323* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Además, se demostró que el gen *SMa1323* reprime la actividad de los genes responsables de la transferencia, como *traC* y *traA1* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Por tanto, se consideró que el plásmido simbiótico de *S.*

*meliloti* podría seguir el mismo sistema de regulación de transferencia que el plásmido simbiótico de *R. etli* apuntado por Pérez-Mendoza y colaboradores en 2005.

Pérez-Mendoza y colaboradores (2005) demostraron que la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti* 1021 está reprimida por el regulador transcripcional RctA en condiciones de laboratorio. En cambio, hasta el momento no se había estudiado la transferencia de pSymB. Previo al ensayo de la movilización de pSymB, se construyeron cepas marcadas simultáneamente en pSymA y pSymB. Mediante la técnica de transducción especializada utilizando el fago  $\phi$ M12, se transfirió el gen de resistencia a gentamicina presente en el pSymB de la cepa A818::Gm<sup>R</sup> (Quandt *et al.*, 2004, cedida por Michael Hynes) a las cepas 100TSS (cepa control marcada con un gen de resistencia a Sm/Spc en el gen *otsA* de pSymA) y 1021RctA<sup>-</sup>. Como resultado del proceso de transducción, se obtuvieron las cepas 100TSSHB (pSymA *otsA*::Sm/Spc y pSymB marcado con Tn5::Gm) y 1021RctA<sup>H</sup>B (pSymA *rctA*::Sm/Spc; pSymB marcado con Tn5::Gm). La transferencia del pSymA y del pSymB se ensayó en cruces con la cepa de *A. tumefaciens* GMI9023 (*AtGMI9023*) como receptora. Como era de esperar, no hubo transferencia de plásmidos desde la cepa 100TSSHB. Sin embargo, sí se observó la transferencia conjugativa de ambos plásmidos desde la cepa 1021RctA<sup>H</sup>B hacia *AtGMI9023*. Dicha transferencia se seleccionó por la resistencia a los antibióticos que presentaron los transconjugantes de *AtGMI9023*. Los resultados mostraron que la frecuencia de transferencia de pSymB fue un orden de magnitud inferior a la de pSymA, mientras que la transferencia simultánea de ambos plásmidos descendía tres órdenes de magnitud con respecto a la frecuencia de transferencia de pSymA y, más de un orden, con respecto a la frecuencia de transferencia individual de pSymB (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Frecuencias de transferencia de pSymA y pSymB desde *S. meliloti* hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>		
	pSymA	pSymB	pSymA + pSymB
100TSSHB	N.D.	N.D.	N.D.
1021RctA <sup>H</sup> B	$8,6 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-6}$	$8,04 \times 10^{-8}$

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora. Los valores muestran la media de al menos tres experimentos independientes.

En otros sistemas que implican un plásmido autoconjugativo y otro movilizable, la frecuencia de cotransferencia suele venir determinada por el plásmido que se transfiere con menor eficiencia, y suele ser similar a ésta (Reinmann y Haas, 1993).

Para determinar si pSymA también podría movilizar a plásmidos heterólogos, se estudió la transferencia del plásmido movilizable (IncQ) pML122 desde *S. meliloti* 1021. Este plásmido se introdujo en las cepas 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup> por conjugación biparental y se hicieron estudios de transferencia utilizando *AtGMI9023* como cepa receptora. Se observó que el vector pML122 pudo ser movilizado desde una cepa *rctA* de *S. meliloti* 1021 a frecuencias relativamente bajas, lo que indicaba que dicho plásmido estaba utilizando las funciones conjugativas de pSymA (Tabla 1.2). Además, se pudo observar que la cotransferencia de pSymA y del plásmido heterólogo pML122 fue un evento raro que ocurría a frecuencias muy bajas, de forma similar a la cotransferencia de los pSyms de *S. meliloti*.

**Tabla 1.2.** Frecuencias de transferencia de pSymA y pML122 desde *S. meliloti* hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>		
	pSymA	pML122	pSymA + pML122
100TSS (pML122)	N.D.	N.D.	N.D.
1021RctA <sup>-</sup> (pML122)	6,6 x 10 <sup>-5</sup>	8,9 x 10 <sup>-6</sup>	2,9 x 10 <sup>-8</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora. Los valores muestran la media de al menos tres experimentos independientes.

Para comprobar si existen diferencias en la frecuencia de transferencia del plásmido heterólogo IncQ pML122 por distintos sistemas de transferencia, se decidió ver tanto la movilización de dicho plásmido, como la cotransferencia junto con el plásmido simbiótico, pRetCFNX42d, de la cepa de *R. etli* CFN42. En la Tabla 1.3 se observa la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* pRetCFNX42d, la transferencia correspondiente al plásmido heterólogo pML122 y la cotransferencia de los mismos. Como donadores, se emplearon las cepas de *AtGMI9023*: *At* pRetd::Km (pML122) (que porta el plásmido pRetCFNX42d marcado con un gen de resistencia a kanamicina junto con el plásmido heterólogo pML122), y la cepa *At* Tn5.1 (pML122) (que porta el plásmido pRetCFNX42d mutado en el gen *rctA*

junto con el plásmido heterólogo pML122). Como cepa receptora se usó *R. etli* CFNX218Spc.

**Tabla 1.3.** Frecuencias de transferencia de pRetd y pML122 desde *AtGMI9023* hacia *R. etli* CFNX218Spc

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>		
	pRetd	pML122	pRetd + pML122
<i>At</i> pRetd::Km (pML122)	N.D.	N.D.	N.D.
<i>At</i> Tn5.1 (pML122)	5,3 x 10 <sup>-4</sup>	8,9 x 10 <sup>-5</sup>	6,3 x 10 <sup>-5</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora. Los valores muestran la media de al menos tres experimentos independientes.

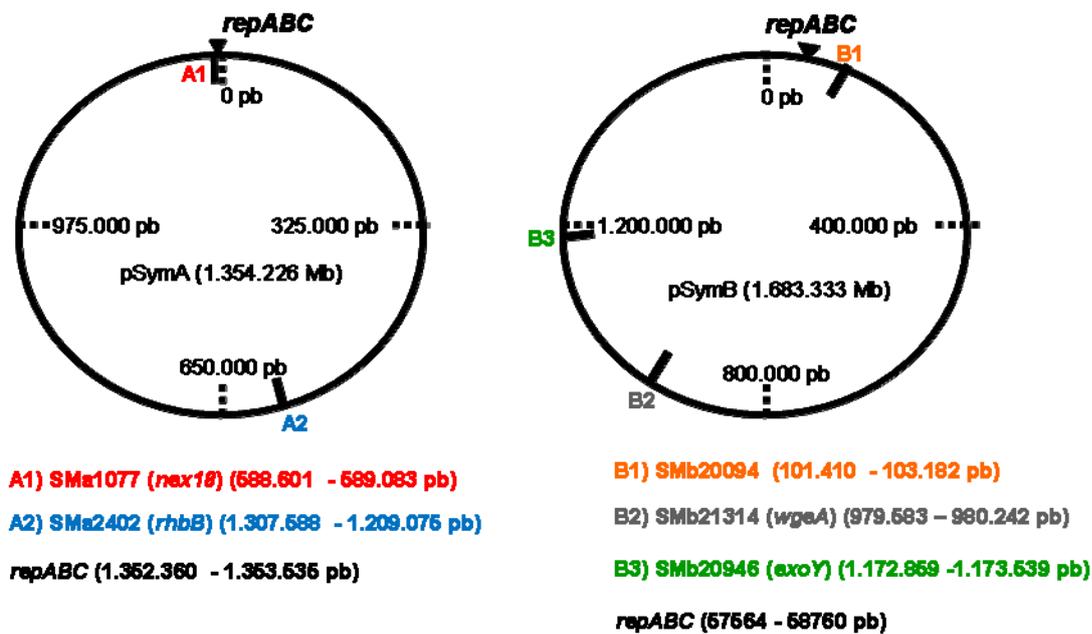
### 1.3.1. Verificación de la transferencia conjugativa de los pSyms de *S. meliloti*

#### 1021

Puesto que los datos de transferencia conjugativa obtenidos estaban basados en el recuento de transconjugantes resistentes a antibióticos, de acuerdo al marcaje realizado en cada plásmido, se decidió verificar la presencia de pSymA y pSymB en varios de estos transconjugantes. Para ello se llevó a cabo la amplificación de genes exclusivos, tanto de pSymA como de pSymB, a partir de ADN genómico de varios de los transconjugantes obtenidos. Los genes empleados en la detección de los plásmidos fueron: *SMa1077* (*next18*) y *SMa2408* (*rhbB*), y *SMb20094*, *SMb21314* (*wgeA*) y *SMb20946* (*exoY*), exclusivos de pSymB (Figura 1.3).

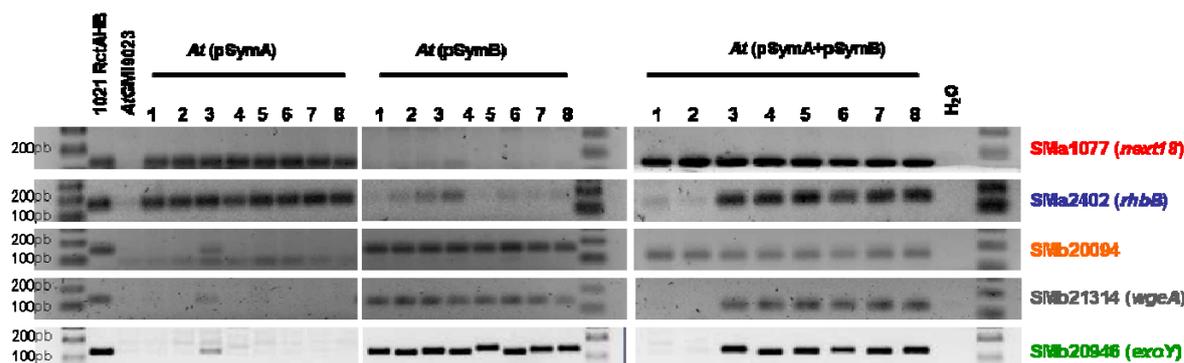
Se obtuvo ADN genómico de 24 transconjugantes (8 resistentes a Sm/Spc, 8 resistentes a Gm y 8 resistentes a Gm y Sm/Spc) obtenidos en un cruce entre la cepa donadora 1021RctAHB y la cepa receptora *AtGMI9023*, amplificándose mediante PCR los genes descritos en el párrafo anterior, usando cebadores específicos. Los resultados de estas amplificaciones se muestran en la Figura 1.4. Todos los transconjugantes resistentes a Sm/Spc exhibieron el amplificado correspondiente a los genes *SMa1077* (*next18*) y *SMa2408* (*rhbB*), confirmando que todos ellos eran portadores del pSymA, mientras que resultaron negativos para los genes *SMb20094*, *SMb21314* (*wgeA*) y *SMb20946* (*exoY*) de pSymB (Figura 1.4). Del

mismo modo, se pudo obtener el amplificado específico correspondiente a los genes *SMB20094*, *SMB21314* (*wgeA*) y *SMB20946* (*exoY*) a partir de todos los transconjugantes resistentes a Gm analizados, mientras que no amplificaron los genes *SMA1077* (*next18*) y *SMA2402* (*rhbB*), lo que confirmaba que tales transconjugantes Gm<sup>R</sup> eran portadores de pSymB.



**Figura 1.3. Localización de los genes estudiados en los plásmidos pSymA y pSymB.** Los diferentes genes se han señalado en rojo, azul, naranja, gris y verde y se ha señalado su localización con el mismo color en el plásmido correspondiente.

Entre los transconjugantes Gm<sup>R</sup> y Sm<sup>R</sup>/Sp<sup>c</sup><sup>R</sup>, todos ellos fueron positivos para la presencia de los genes *SMA1077* (*next18*) y *SMB20094*, lo que indicaba la presencia de pSymA y pSymB en dichos transconjugantes. Sin embargo, mientras solo 6 de ellos (75%) fueron positivos para el resto de genes de pSymA y pSymB, dos transconjugantes fueron negativos para *SMA2402* (*rhbB*), *SMB21314* (*wgeA*) y *SMB20946* (*exoY*) (Figura 1.4). Estos datos sugerían que todos los transconjugantes Gm<sup>R</sup> y Sm<sup>R</sup>/Sp<sup>c</sup><sup>R</sup> analizados habían recibido los dos pSyms, pero que en algunos casos podrían haber ocurrido reorganizaciones que conllevarían la pérdida de fragmentos de dichos plásmidos.



**Figura 1.4.** Amplificación por PCR de genes del pSymA y pSymB de transconjugantes de *AtGMI9023* han recibido el pSymA, pSymB o ambos plásmidos simultáneamente. La cepa receptora *AtGMI9023* no amplificó ninguno de los genes marcadores. La cepa donadora 1021RctA::Hb fue utilizada como control positivo. M100bp, Marcador de peso molecular de ADN.

### 1.3.2. Transferencia de los pSyms de *S. meliloti* por la maquinaria VirB presente en pSymA

Debido a que pSymB no contiene genes codificantes para funciones Mpf, era razonable pensar que su transferencia podía ser dependiente de las funciones de conjugación presentes en el pSymA, como el sistema de secreción tipo IV codificado por los genes *virB*. Para verificar esta hipótesis, se construyó un doble mutante para los genes *rctA* y el operón *virB*, 1021RctA $\Delta$ *virB*. Posteriormente, mediante transducción generalizada, se marcó el pSymB de este doble mutante con un Tn5::Gm, obteniéndose la cepa 1021RctA $\Delta$ *virB*Hb. Esta cepa se utilizó como donadora en cruces con *AtGMI9023*. Según lo esperado, no se detectó transferencia conjugativa ni del pSymA ni del pSymB desde el doble mutante *rctA virB* hasta *Agrobacterium* (Tabla 1.4). Estos resultados indican que efectivamente pSymA y pSymB emplean el mismo sistema de secreción tipo IV para transferirse, que no es otro que el codificado por el operón *virB*.

**Tabla 1.4.** Frecuencias de transferencia de pSymA y pSymB desde *S. meliloti* 1021RctAΔ*vir*BHB hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>		
	pSymA	pSymB	pSymA + pSymB
100TSSHB	N.D.	N.D.	N.D.
1021RctAHB	$8,6 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-6}$	$8,04 \times 10^{-8}$
1021RctAΔ <i>vir</i> BHB	N.D.	N.D.	N.D.

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora. Los valores muestran la media de al menos tres experimentos independientes.

#### 1.4. Evaluación de la preferencia en *cis* de las relaxasas TraA1 y TraA2 por sus respectivos *oriTs*

La importancia que tiene la relaxasa (TraA) como proteína central de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* pRetCFN42d, ya ha sido puesta de manifiesto por Pérez-Mendoza y colaboradores (2006). Además, se ha demostrado que la posición que ocupa el gen *traA* con respecto al *oriT* es importante para la eficiencia de conjugación, de manera que si ambos elementos no se encuentran en *cis*, baja drásticamente la eficiencia de la transferencia conjugativa. Este descenso tan acusado de más de dos órdenes de magnitud no se ha observado en otros sistemas, por lo que podría ser una característica particular de algunos plásmidos de rizobios. No obstante, una preferencia de movilización en *cis* también ha sido descrita para la relaxasa del transposón conjugativo Tn1549 en *Clostridium symbiosum* (Tsvetkova *et al.*, 2010), y evidenciada en el caso del plásmido pIP501 de *Streptococcus agalactiae* (Arends *et al.*, 2012).

El hecho de que la transferencia de pSymB fuese mucho más eficiente que la transferencia simultánea de ambos pSymA y pSymB (Tabla 1.1) sugería una movilización en *trans* de pSymB. Sin embargo, la transferencia de pSymB fue un orden de magnitud menor que la de pSymA, lo cual podría sugerir un tipo de movilización por cointegración (falsa movilización), donde la transferencia del plásmido movilizador es más alta que la transferencia del plásmido movilizado (Reinmann y Haas, 1993). Para comprobar cual de los dos posibles mecanismos de movilización está operando en la transferencia de los

megaplásmidos de *S. meliloti*, se ensayó la frecuencia de movilización de los *oriTs* de pSymA y pSymB, clonados separadamente. Para esto, dos plásmidos que contenían los correspondientes *oriTs* de pSymA y pSymB (pJBSA y pJBSB, respectivamente; Pérez-Mendoza *et al.*, 2006) fueron introducidos en un mutante *rctA*. Como se muestra en la Tabla 1.5, ambos *oriTs* fueron transferidos al receptor *AtGMI9023* a frecuencias similares, lo que indicaba que ambos *oriTs* son funcionales. Sin embargo, las frecuencias de movilización de ambos *oriTs* fueron menores de  $10^{-6}$ , lo que es lo mismo, unas 100 veces más bajas que la frecuencia de transferencia de pSymA y varias veces inferiores a la del pSymB (Tabla 1.5). Este resultado sugería a su vez una posible preferencia de la relaxasa por su *oriT* en *cis*, como había sido demostrado para la relaxasa del pSym de *R. etli* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006).

Para demostrar si este mismo efecto se produce en el sistema de transferencia de *S. meliloti* 1021, se amplificaron y clonaron en el vector pJB3Tc19 fragmentos de ADN correspondientes a *oriT+traA* tanto de pSymA como de pSymB, obteniéndose las construcciones pJBSAR y pJBSBR, respectivamente (véase Anexos 1.3 y 1.4), y se comparó su eficiencia de movilización respecto a las construcciones portadoras del *oriT* en solitario. Las construcciones fueron introducidas en las cepas 100TSSHB, 1021RctAHB y 1021RctA $\Delta$ *virBHB*, y las cepas resultantes se usaron como donadoras en cruces con la cepa receptora *AtGMI9023*. Para detectar cada uno de los eventos de transferencia conjugativa, se seleccionaron transconjugantes que expresaran las correspondientes resistencias a antibióticos portadas por cada construcción o plásmido. Como era de esperar, no se observó transferencia de ninguna de las construcciones anteriores ni de ninguno de los plásmidos simbióticos desde las cepas 100TSSHB (RctA<sup>+</sup>) y 1021RctA $\Delta$ *virBHB* (RctA<sup>-</sup> VirB<sup>-</sup>).

En la Tabla 1.5 se muestran las frecuencias de transferencia de los diferentes plásmidos desde la cepa donadora 1021RctAHB para cada una de las construcciones, los plásmidos simbióticos y la cotransferencia de los mismos. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la frecuencia de transferencia de las construcciones que portan los *oriTs*, tanto de pSymA como de pSymB (pJBSA y pJBSB), no presentan diferencias significativas entre ellas debido posiblemente a la similitud de la secuencia de los mismos.

En cambio, como puede observarse en la Tabla 1.5, las construcciones que contienen el gen de la relaxasa junto a la secuencia *oriT* (pJBSAR y pJBSBR) se movilizan a frecuencias similares al plásmido pSymA completo e incluso algo superiores ( $7-8 \times 10^{-5}$ ). De manera similar a lo que ocurre con pJBSA y pJBSB, no existen diferencias significativas entre las

construcciones anteriores, debido posiblemente a la similitud de las secuencias ya mencionadas. Este hecho demostraría la baja eficiencia de reconocimiento que las relaxasas muestran por sus respectivos *oriT* en *trans*, de forma similar a lo observado en el caso de *R. etli* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006). Por otra parte, la cotransferencia de los distintos plásmidos fue muy inferior a la transferencia de cada plásmido por separado. Así, la cotransferencia de pSymA y las construcciones que portan los *oriT* en solitario fue indetectable. Sin embargo, sí pudo detectarse la transferencia simultánea de pSymA o pSymB y las construcciones pJBSAR y pJBSBR, aunque a frecuencias sensiblemente inferiores a la de los plásmidos individualmente. Este hecho hace que este sistema sea diferente al observado para la *R. etli*, en donde la frecuencia de cotransferencia se correspondía con la del plásmido transferido individualmente a más baja frecuencia.

**Tabla 1.5.** Frecuencias de transferencia de pSyms y construcciones Dtr desde *S. meliloti* 1021RctAHB hacia ArGMI9023

1021 RctAHB	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>					
	pSymA	pSymB	<i>oriT</i>	pSymA + <i>oriT</i>	pSymB + <i>oriT</i>	pSymA + pSymB
<b>pJBSA</b>	2,2 x 10 <sup>-5</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	7,1 x 10 <sup>-7</sup>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>pJBSB</b>	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	1,1 x 10 <sup>-6</sup>	4,7 x 10 <sup>-6</sup>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>pJBSAR</b>	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	6,5 x 10 <sup>-7</sup>	7,7 x 10 <sup>-5</sup>	1,6 x 10 <sup>-7</sup>	2,5 x 10 <sup>-8</sup>	1,9 x 10 <sup>-8</sup>
<b>pJBSBR</b>	2 x 10 <sup>-5</sup>	2,1 x 10 <sup>-6</sup>	8,3 x 10 <sup>-5</sup>	2,4 x 10 <sup>-7</sup>	2,8 x 10 <sup>-8</sup>	2,6 x 10 <sup>-8</sup>

N.D., transferencia no detectada, <sup>a</sup> transferencia no detectada; las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

### 1.5. Importancia de homólogos a genes VBP de *A. tumefaciens* para la transferencia conjugativa de pSyms de *S. meliloti* 1021

Como ya se ha explicado anteriormente, el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) de *A. tumefaciens* comparte un ancestro común con los sistemas de conjugación bacteriana (Christie *et al.*, 2005; Backert, *et al.*, 2006), entre los que podría incluirse el T4SS codificado en el pSymA de *S. meliloti*. Las proteínas implicadas en la transferencia conjugativa de ADN se denominan proteínas Vir (Christie *et al.*, 2005; Backert *et al.*, 2006), que se dividen según su función en tres clases: por un parte la relaxasa VirD2 y las proteínas VirD1, VirC, VirE2, VirE1 y VirF, que se encargan del procesamiento y empaquetamiento del intermediario de

ADN; las proteínas VirB que forman el verdadero aparato de transporte de diversos sustratos macromoleculares, incluyendo el complejo formado por la relaxasa VirD2 y ADN-T y proteínas como VirE2 y VirF a las células de la planta; y, las proteínas encargadas de producir una interacción específica entre el sustrato y el aparato de transporte (proteínas acopladoras; VirD4).

Recientemente, Guo y colaboradores (2007b) demostraron la existencia de unas proteínas, a las que denominaron “proteínas reclutadoras”, cuya función es la de mejorar el reclutamiento del complejo nucleoproteico hacia los componentes energizantes del aparato de transporte. Previamente, demostraron que la proteína VBP1 (VirD2 Binding Protein) es capaz de unirse directamente a la relaxasa VirD2 y además está implicada en el proceso de tumorigénesis en *Agrobacterium* (Guo *et al.*, 2007a). En el genoma de *A. tumefaciens* se han encontrado otros dos genes adicionales que codifican proteínas altamente homólogas a VBP1, designadas VBP2 y VBP3. Todas estas proteínas tienen la capacidad de unirse a la relaxasa VirD2. *A. tumefaciens* es capaz de movilizar el plásmido tipo IncQ RSF1010 (pero no RK2) durante la conjugación bajo condiciones no inductoras (Cook y Farrand, 1992; Chen *et al.*, 2002), mejorando la eficiencia de transferencia del plásmido, lo que indica que RSF1010 puede ser movilizado por un sistema de transferencia independiente al sistema VirB/D4. Guo y colaboradores (2007) analizaron el efecto de las proteínas VBP en la movilización del plásmido pML122, un derivado del RSF1010 (Labes *et al.*, 1990) desde *Agrobacterium* hasta *E. coli* bajo condiciones no inductoras, encontrando que aparte de la función que tienen estas proteínas en la transferencia de ADN-T mediada por el sistema VirB/D4 T4SS, también tienen una función en la movilización de plásmidos RSF1010 por un sistema independiente a VirB/D4 bajo condiciones no inductoras (Guo *et al.*, 2007b).

Se han encontrado homólogos a las proteínas VPB en varias bacterias de la familia Rhizobiaceae. Se han identificado proteínas con identidades muy significativas en *S. meliloti* pSymA (58%) y pSymB (58%), así como en *R. etli* (65%) (Tabla 1.6).

**Tabla 1.6.** Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína VPB1 de *A. tumefaciens* y proteínas de *R. etli* y *S. meliloti*

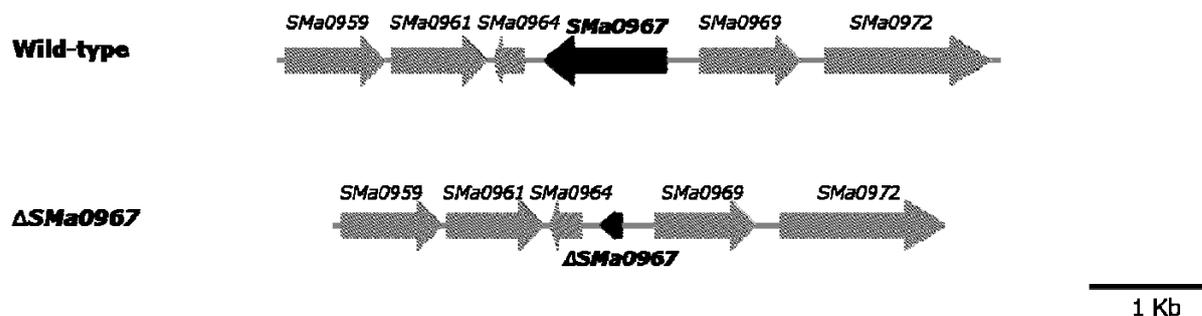
ORGANISMO	PROTEÍNAS	% IDENTIDAD
<i>A. tumefaciens</i> C58	VP1 (AAL45807) (hipotética proteína)	100
<i>A. tumefaciens</i> C58	VP2 (hipotética proteína)	72
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00725 (Nucleotidiltransferasa)	65
<i>S. meliloti</i> pSymA	<i>SMa0967</i> (hipotética proteína)	58
<i>S. meliloti</i> pSymB	<i>SMb20835</i> (hipotética proteína)	58
<i>A. tumefaciens</i> C58	VP3 (nucleotidiltransferasa)	56

La proteína de pSymA se encuentra codificada por el gen *SMa0967*, mientras que la de pSymB está codificada por el gen *SMb20835*. Ambas proteínas se encuentran anotadas en el genoma de *S. meliloti* como proteínas hipotéticas. Mientras que el gen *SMa0967* de pSymA se localiza en las proximidades de otros genes relacionados con la transferencia conjugativa de este plásmido, el gen *SMb20835* tiene una localización alejada del origen de transferencia de pSymB y el gen de la relaxasa *traA2*. Un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas muestra que son muy similares entre ellas, compartiendo un 68% de identidad.

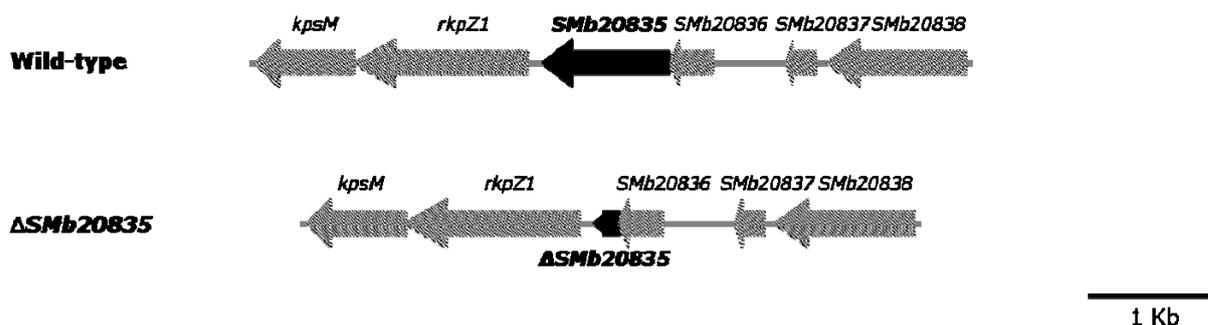
Debido a la similitud mecánica que existe entre el sistema de transporte del ADN-T con otros sistemas de transferencia conjugativa, se hipotetizó que estas proteínas podrían estar implicadas en la diferente eficiencia de transferencia de pSymA y pSymB. En primer lugar se determinó la posible regulación de la expresión de estos genes por *rctA* comparando los niveles de transcritos en la cepa silvestre 1021 y el mutante 1021RctA<sup>-</sup>. Los resultados mostraron que la expresión del gen *SMa0967* es mayor en el fondo 1021RctA<sup>-</sup> con respecto a la cepa silvestre (expresión relativa 2,33 ± 0,2), mientras que no se observaron diferencias en la expresión de *SMb20835*.

Para comprobar si cualquiera de estos dos genes pudiera tener alguna función en la eficiencia de transferencia de los pSyms, se generó una mutación por delección de los genes completos, amplificando fragmentos correspondientes a los extremos 5' y 3' de los genes *SMa0967* y *SMb20835*, para evitar una mutación polar que pudiera enmascarar la posible función de estos genes (véase Anexos 1.5 y 1.6). La delección del gen *SMa0967* (Figura 1.5) se

llevó a cabo en las cepas 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup> obteniéndose las cepas 100TSS $\Delta$ *SMa0967* y 1021 $\Delta$ *SMa0967*RctA, respectivamente. La delección del gen *SMb20835* (Figura 1.6) se llevó a cabo en las cepas 100TSS $\Delta$ *SMa0967* y 1021 $\Delta$ *SMa0967*RctA, obteniéndose las cepas 100TSS $\Delta$ *vbpb* y 1021 $\Delta$ *vbpb*RctA.



**Figura 1.5. Representación gráfica de la delección del gen *SMa0967*.** La delección se hizo mediante amplificación de los extremos 5' y 3' del gen *SMa0967*. (Detallado en Anexo 1.5).



**Figura 1.6. Representación gráfica de la delección del gen *SMb20835*.** La delección se hizo mediante amplificación de los extremos 5' y 3' del gen *SMb20835* (Detallado en Anexo 1.6).

Para poder determinar la transferencia del plásmido simbiótico pSymB, se procedió al marcaje de dicho plásmido con un Tn5::Gm mediante transducción desde la cepa de *S. meliloti* A818::Gm<sup>R</sup>. Tras este proceso se obtuvieron las cepas 100TSS $\Delta$ *vbpb*HB y 1021 $\Delta$ *vbpb*RctAHB. También se comprobó si la transferencia del plásmido heterólogo (pML122) por el sistema de transferencia de *S. meliloti*, podría verse afectada por la mutación de las proteínas VBP. Para ello se introdujo el plásmido pML122, un derivado de RSF1010 a las cepas 100TSSHB, 100TSS $\Delta$ *vbpb*HB, 1021RctAHB y 1021 $\Delta$ *vbpb*RctAHB. Una vez obtenidas todas las construcciones anteriores, se realizaron experimentos de transferencia conjugativa, usando como cepa receptora a la cepa *AtGMI9023*. En ninguno de los casos ensayados se obtuvieron

evidencias de que la eficiencia de transferencia de los pSyms o del plásmido pML122 tuviese alguna dependencia de los genes *SMa0967* y *SMB20835* (Tabla 1.7).

**Tabla 1.7.** Frecuencias de transferencia de pSyms y pML122 desde distintos fondos genéticos de *S. meliloti* 1021 hacia *AtGMI9023*

Cepas donadoras	Frecuencia de transferencia <sup>a</sup>				
	pSymA	pSymB	pSymA + pSymB	pML122	pSymA + pML122
100TSS (pML122)	N.D.	-	-	N.D.	N.D.
1021RctA <sup>-</sup> (pML122)	6,6 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	8,9 x 10 <sup>-6</sup>	2,9 x 10 <sup>-8</sup>
100TSSΔ <i>vb</i> p (pML122)	N.D.	-	-	N.D.	N.D.
1021Δ <i>vb</i> RctA (pML122)	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	1 x 10 <sup>-5</sup>	1,6 x 10 <sup>-8</sup>
100TSSHBΔ <i>vb</i> p (pML122)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1021Δ <i>vb</i> pRctA <sup>+</sup> HB (pML122)	8,6 x 10 <sup>-5</sup>	6 x 10 <sup>-6</sup>	1,4 x 10 <sup>-8</sup>	-	-

N.D., transferencia no detectada, <sup>a</sup> transferencia no detectada; las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

## 1.6. Discusión

Como ya ha sido mencionado, los eventos de transferencia genética horizontal ocurren en condiciones naturales, de manera que se ha puesto de manifiesto la transferencia de pSyms en poblaciones naturales del suelo (Rao *et al.*, 1994; Schofield *et al.*, 1987). Sullivan y colaboradores (1998) pusieron de manifiesto la transferencia de la isla simbiótica R7A de la cepa de *M. loti* ICMP3153 a diferentes cepas nativas de un suelo cultivado con *Lotus corniculatus* en lo que es un experimento clásico. Del mismo modo, se ha analizado la diversidad de los rizobios en un cultivo de *Biserrula pelecinus* L., seis años después de haberlo inoculado con *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* cepa WSM1271, en Australia Occidental. El estudio muestra la rápida evolución de las cepas competitivas para la fijación de nitrógeno en *B. pelecinus* tras la transferencia lateral de la isla simbiótica de los inoculantes a otras bacterias del suelo (Nandasena *et al.*, 2007). Por el contrario, es difícil constatar la transferencia conjugativa de muchos megaplásmidos simbióticos e islas simbióticas en condiciones de laboratorio (Danino *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003), lo que sugiere la existencia de estrictos sistemas de regulación para que dicha transferencia conjugativa solamente ocurra cuando se den las condiciones óptimas en la naturaleza, condiciones que por otro lado son desconocidas para la mayoría de sistemas conjugativos, tanto de rizobios como de no rizobios. En los casos de los pSyms de *R. etli* y *S. meliloti*, la presencia del regulador transcripcional RctA permite entender que la transferencia conjugativa de estos plásmidos sea indetectable en condiciones de laboratorio. La actividad de RctA mantiene inhibida la transcripción de los genes que constituyen los sistemas Dtr y Mpf de estos plásmidos, de forma que la expresión de los mismos, y por tanto la transferencia plasmídica, solo ocurre bajo condiciones que reducen o anulan la actividad represora de RctA, como ocurre en mutantes RctA<sup>-</sup> (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005).

En el caso de *S. meliloti* 1021, los estudios previos habían podido determinar que el plásmido pSymA es en realidad un plásmido con capacidad autoconjugativa, mientras que nunca se han aportado datos sobre la posible capacidad móvil de pSymB. Además, este megaplásmido no contiene los genes necesarios para un posible sistema conjugativo. No obstante, diversas evidencias sugerían que pSymB podría ser un plásmido movilizable: posee un posible sistema Dtr que contiene un gen *traA* (*traA2*, relaxasa) y un posible *oriT* adyacente, ambos con elevada conservación de secuencias respecto al complejo *traA1-oriT* presente en pSymA. La presencia de un gen relaxasa junto a un posible *oriT* es típica de plásmidos

movilizables (Reinmann y Haas, 1993). Además, Pérez-Mendoza y colaboradores (2006) demostraron que *oriT* de pSymB clonado en un vector no conjugativo podía ser movilizado por el pSym de *R. etli* CFN42, lo que sugería la funcionalidad de dicho *oriT*.

Con estos antecedentes, en este trabajo se estableció la hipótesis de que pSymB es un plásmido movilizable, probablemente dependiente de funciones conjugativas presentes en el otro plásmido de la cepa 1021, pSymA. Se pudo determinar que la transcripción de *traA2* está reprimida por el regulador RctA, de forma similar a los genes *tra* y *virB* de pSymA. Esta correulación de los genes conjugativos de pSymA y el único gen conjugativo de pSymB, *traA2*, sugería que este gen era funcional, lo que unido a la probable funcionalidad del *oriT* de dicho plásmido (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006), apoyaba fuertemente nuestra hipótesis de partida.

La construcción de cepas derivadas de *S. meliloti* 1021, marcadas con genes de resistencia a antibióticos en ambos pSyms simultáneamente, ha permitido demostrar por primera vez que pSymB es un plásmido transferible por conjugación desde *S. meliloti* hasta *A. tumefaciens*. No obstante, esta transferencia solo parecía ocurrir en aquellas condiciones que además permitían la transferencia de pSymA, esto es, desde fondos genéticos RctA<sup>-</sup>. Además, el hecho de que la transferencia de pSymB solo ocurriese en condiciones que permiten la autoconjugación de pSymA (mutantes *rctA*), concordaba con el hecho de que también *traA2*, el gen de pSymB que codifica para la probable relaxasa, estuviese regulado de forma similar a los genes conjugativos de pSymA, es decir, reprimidos por *rctA*. Por tanto, todos los datos apuntaban a que la transferencia de pSymB es dependiente de funciones conjugativas presentes en pSymA. Puesto que pSymB carece de genes que puedan codificar para un sistema Mpf (transporte del ADN conjugativo), parecía probable que pudiera estar utilizando el sistema Mpf codificado en pSymA (genes *virB*). Ya se había demostrado previamente que este operón *virB* es esencial para la transferencia conjugativa de pSymA (Soto *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007). Para demostrar que la transferencia de pSymB también requiere de estos genes de pSymA, se construyeron dobles mutantes *rctA virB*. El uso de dichos mutantes VirB<sup>-</sup> demostró que la transferencia de ambos megaplásmidos pSymA y pSymB es totalmente anulada en ausencia del Mpf codificado por pSymA. Este dato demostraba de forma inequívoca que la transferencia conjugativa de pSymB es un evento dependiente de la presencia de un pSymA conjugativamente activo en la misma célula, lo que junto con los datos acumulados previamente, permite catalogar a pSymB de *S. meliloti* 1021 como un plásmido movilizable

por conjugación: posee un *oriT* funcional junto a un gen relaxasa, es transferible por conjugación en las mismas condiciones en que pSymA se autotransfiere, y además utiliza muchas de las funciones conjugativas portadas por este último plásmido, al menos el sistema VirB y probablemente otras como TraCDG.

Aunque se han reportado diversos casos de plásmidos movilizables en rizobios, esta es la primera vez que se demuestra la movilización de un pSym por otro pSym de la misma cepa. Previamente, se ha demostrado la movilización del plásmido críptico pRmeGR4b por el también plásmido críptico autoconjugativo pRmeGR4a, ambos pertenecientes a la cepa de *S. meliloti* GR4 (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). También se ha relacionado la movilización del plásmido simbiótico de la cepa *R. etli* CFN42 con un proceso de cointegración con el plásmido autoconjugativo p42a de dicha cepa (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Puesto que los dos pSyms de *S. meliloti* 1021 representan el 45% del genoma total de esta bacteria, es posible afirmar que el 45% (3,037 Kb) del genoma de esta bacteria es susceptible de transferencia por conjugación a otras bacterias, lo que da idea del impacto que sobre un teórico receptor puede tener la adquisición de tal cantidad de ADN.

No obstante estos resultados, había todavía dos cuestiones que no estaban totalmente resueltas: ¿La movilización de pSymB ocurre físicamente separada de la transferencia de pSymA o podría tratarse de un evento de cotransferencia mediada por cointegración de ambos plásmidos? Y la segunda ¿Por qué es la eficiencia conjugativa de pSymA casi 10 veces superior a la de pSymB?

Varios datos indicaban que la transferencia conjugativa de pSymB es un típico caso de verdadera movilización en *trans*, principalmente porque pSymB porta su propio *oriT* y relaxasa (situación típica en plásmidos movilizables), pero sobre todo por el hecho de que la transferencia simultánea de ambos plásmidos pSymA y pSymB ocurría a frecuencias muy inferiores a la movilización de pSymB (ver Tabla 1.1). En otros casos reportados de movilización, la frecuencia de transferencia simultánea de los plásmidos implicados suele ser igual o levemente inferior a la de aquel que es transferido de forma menos eficiente, habitualmente el plásmido movilizable (Reinmann & Haas, 1993). Además, como la eficiencia de transferencia de pSymA era muy superior a pSymB, y puesto que ambos plásmidos utilizaban el mismo sistema Mpf, se hacía necesario determinar si sus diferentes frecuencias de transferencia podían ser debidas a posibles diferencias funcionales en sus sistemas Dtr. Pudimos demostrar que la movilización de los *oriTs* clonados de ambos plásmidos ocurría con

similar eficiencia, lo que por otro lado era de esperar dada la elevada conservación de secuencias entre ambos *oriTs*. Sin embargo, la eficiencia de movilización de dichos *oriTs* fue muy inferior a la de cualquiera de los dos plásmidos simbióticos (Tabla 1.5), hecho que recordaba a lo previamente observado para el *oriT* del pSym de *R. etli*, cuya movilización óptima requiere la presencia del gen de la relaxasa en *cis* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006). Cuando se determinó la eficiencia de transferencia de los *oriTs* de los dos pSyms de *S. meliloti* clonados junto a sus respectivos genes relaxasa, se observó que la misma se incrementó 20-100 veces respecto a la de los *oriTs* aislados, lo que sugería que al igual que para la relaxasa del pSym de *R. etli*, las relaxasas de los dos plásmidos simbióticos de *S. meliloti* podrían tener una preferencia de actuación sobre el *oriT* cuando este se encuentra situado en *cis* respecto al gen de la propia relaxasa. Estos resultados evidenciaron también que ambos *oriTs* podían ser movilizados con igual eficiencia, lo que descartaba diferencias funcionales a nivel del Dtr que pudieran explicar la diferente eficiencia de conjugación de los plásmidos pSymA y pSymB. Al mismo tiempo, estos resultados apoyaban que tanto la relaxasa como el *oriT* de pSymB son completamente funcionales, lo que dejaba más claro aún que la transferencia de pSymB por pSymA corresponde a un verdadero evento de movilización en *trans*.

La preferencia de las relaxasas de los pSyms de *R. etli* y *S. meliloti* por la presencia en *cis* de sus respectivos *oriTs* es un fenómeno poco habitual que no había sido reportado anteriormente para este tipo de proteínas conjugativas (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha reportado un fenómeno parecido en relación a la transferencia conjugativa del transposón Tn1549, un transposón conjugativo que confiere resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp. La unidad mínima de *oriT* contiene una región altamente conservada y una repetición invertida. Entre los distintos ORFs identificados, ORF29 es un componente de movilización accesorio similar a MobC, mientras que ORF28 parece ser una relaxasa perteneciente a un nuevo grupo filogenético de la superfamilia MOBp. Se ha visto que es posible una movilización de un fragmento de 250 pb que contenga el *oriT* siempre que se añadan en *trans* los ORF28 y 29 (Tsvetkova *et al.*, 2009), observándose un efecto *cis* de estos elementos en la transferencia conjugativa parecido al observado para los pSyms de *S. meliloti* y *R. etli*.

Los resultados obtenidos seguían sin explicar la mayor eficiencia de transferencia de pSymA respecto a pSymB. Puesto que ambos plásmidos utilizan el mismo sistema Mpf, y dado que sus sistemas Dtr parecían ser igualmente eficaces, la mayor frecuencia de

transferencia de pSymA respecto a pSymB debía deberse a algún otro factor desconocido. Guo y colaboradores (2007) habían reportado la importancia de las proteínas VBP en *A. tumefaciens* para el óptimo reclutamiento de los complejos T hasta el T4SS y por tanto para la eficiencia de la transferencia del ADN-T a las células vegetales. Guo y colaboradores (2007) también demostraron que estas proteínas podían incrementar la eficiencia de transferencia de plásmidos derivados de RSF1010, pero no de derivados de RK2, determinando así una cierta especificidad o preferencia por determinados complejos nucleoproteicos conjugativos. La presencia en el genoma de *S. meliloti* de 2 genes plasmídicos (*SMa0967* y *SMb20835*) codificantes para proteínas homólogas a VBP sugirió la posibilidad de que alguna de estas proteínas fuese responsable de la mayor eficiencia de conjugación de pSymA. A pesar de que la expresión de *SMa0967* parece estar regulada por RctA (al igual que los genes conjugativos), la ausencia por mutación de los dos genes simultáneamente no influyó en la eficiencia de conjugación de ninguno de los dos pSyms ni tampoco del plásmido heterólogo pML122. Así pues, se desconoce si estos genes tienen alguna implicación en el proceso conjugativo de los pSyms de *S. meliloti*. Así mismo, se desconoce por qué la transferencia conjugativa de pSymA es más eficiente que la de pSymB bajo las condiciones experimentales ensayadas, si bien no se debe descartar la posibilidad de que algún otro elemento importante, como por ejemplo TraG (la proteína acopladora, codificada en pSymA) pudiera tener también algún tipo de preferencia en *cis* por complejos *traA-oriT*.

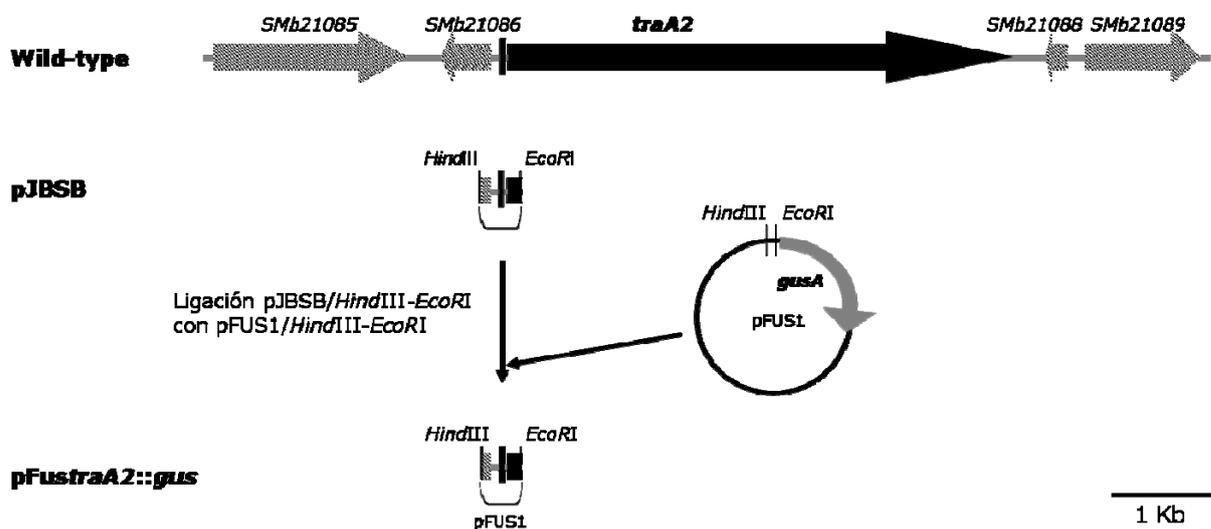


## **ANEXO CAPÍTULO I**



### Anexo 1.1. Construcción de una fusión transcripcional al gen *traA2* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de esta fusión se partió del plásmido pJBSB (Pérez-Mendoza *et al.*, 2006), y se clonó el fragmento *EcoRI/HindIII* que contenía el promotor del gen *traA2* en el vector pFUS1 (Reeve *et al.*, 1999) dando lugar al plásmido pFustraA2::*gus*. Este plásmido se transfirió mediante conjugación a las cepas 1021 y 1021RctA<sup>-</sup> de *S. meliloti*, donde su presencia se seleccionó por conferir resistencia a Tc y se comprobó mediante extracción de ADN plasmídico y determinación del perfil de restricción (Los plásmidos de las figuras no están a escala)



### Anexo 1.2. Construcción del mutante 1021RctA $\Delta$ *virB*

Para obtener una versión delecionada de la región *virB* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa *S. meliloti* 1021 dos productos: utilizando los cebadores pvir1 (5'-TTAGAATTCAGTGCAGACGAAATCATTGC-3', *EcoRI*) y pvir2 (5'-TTAAAGCTTGTCGAGATGCAACTAGCCTC-3', *HindIII*) se obtuvo el producto P1 de 960 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 5' de la región *virB*, incluyendo al gen *SMa1322*; con los cebadores pvir3 (5'-TTAAAGCTTCTACGAAGTGATCGTAAACC-3', *HindIII*) y pvir4 (5'-TTAGGATCCGCCTTGAGTCTGCGATCTTA-3', *BamHI*) se obtuvo el producto P2 de 1,130 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' de la región

*virB*, que incluye una gran parte del gen *virB11*. A continuación, el producto P1 se clonó de forma dirigida mediante digestión con las enzimas *EcoRI/HindIII* en el vector de clonación pBSKS, generando el plásmido pBVIR2. El producto P2 se clonó en el vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T Easy, dando lugar al plásmido pGVIR4. El amplificado clonado en pGVIR4 se aisló tras someter al plásmido a una digestión con las enzimas *HindIII/SalI* y se clonó en pBVIR2 previamente digerido con *HindIII* y *XhoI*, generándose así la construcción pBVIR200. Se purifica el fragmento *HindIII* que contiene el gen de resistencia a Km del plásmido pHP45Ω y se introduce en el plásmido pBVIR200 abriendo el plásmido con *HindIII*, obteniéndose el plásmido pBVIR500.

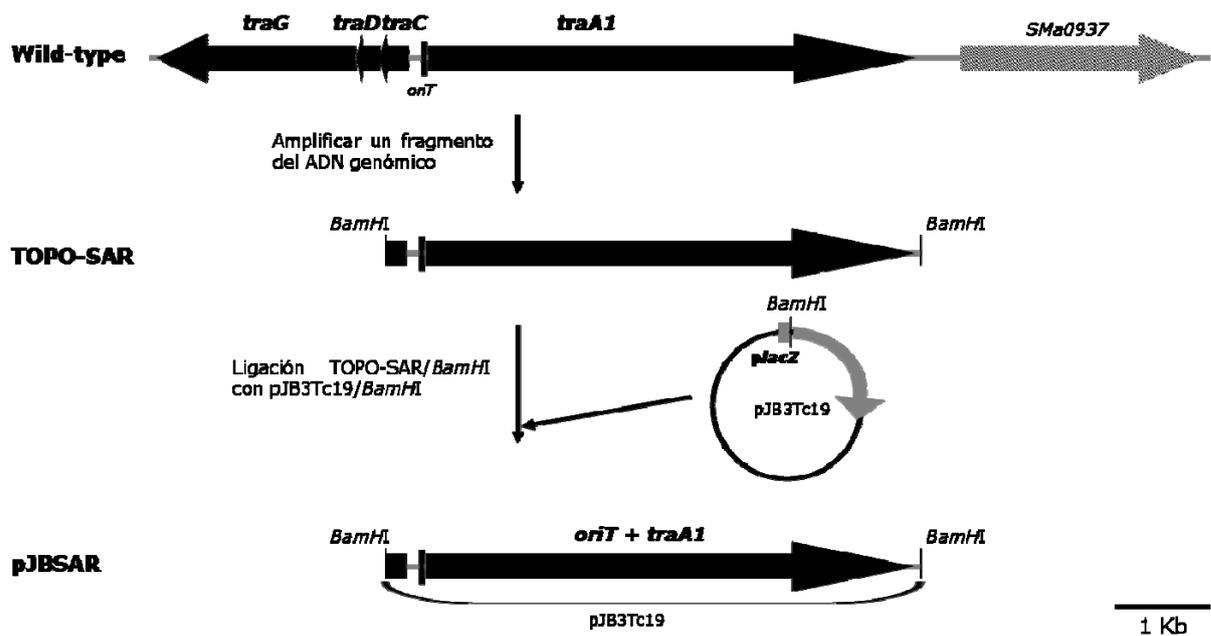
Finalmente, para facilitar el intercambio de la región *virB* silvestre por la versión mutada, el inserto de 4,09 Kb de pBVIR500 se aisló mediante digestión *EcoRI-BamHI* y se clonó en el vector suicida pK18*mobsacB* previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, dando lugar a la construcción pKVIR600. La construcción pKVIR400 se movilizó a la cepa 1021RctA<sup>-</sup> de *S. meliloti*, obteniéndose tras la selección el mutante 1021RctAΔ*virB*, resistente a Sm, Spc, Km y Sacarosa 10%.

La mutación de los transconjugantes se verificó mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *XhoI*, y utilizando como sonda el fragmento *EcoRI* de 1,130 pb de la construcción pGVIR4, previamente aislado y marcado con digoxigenina. Con esta estrategia, en las cepas que contienen una región *virB* intacta se detecta un fragmento de 13,95 Kb, mientras que en aquéllas que contienen la versión mutada de la región *virB*, el fragmento *XhoI* detectado por la sonda tiene un tamaño de 8,69 Kb.

### **Anexo 1.3. Obtención de pJBSAR (*oriT* + *traA1*)**

Para obtener las construcciones pJBSAR, un fragmento conteniendo el *oriT* y el gen *traA1* se amplificó partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores TA10-F (5'-AAAGGATCCCCTTCTTTCCCCTTGC-3', *BamHI*) y TA10-R (5'-AAAGGATCCGGTTGACGATCTCGATGG-3', *BamHI*) en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *BamHI* (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 5,1 Kb se clonó en el vector TOPO<sup>®</sup> XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-SAR. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de TOPO-SAR se aisló tras someter el plásmido a

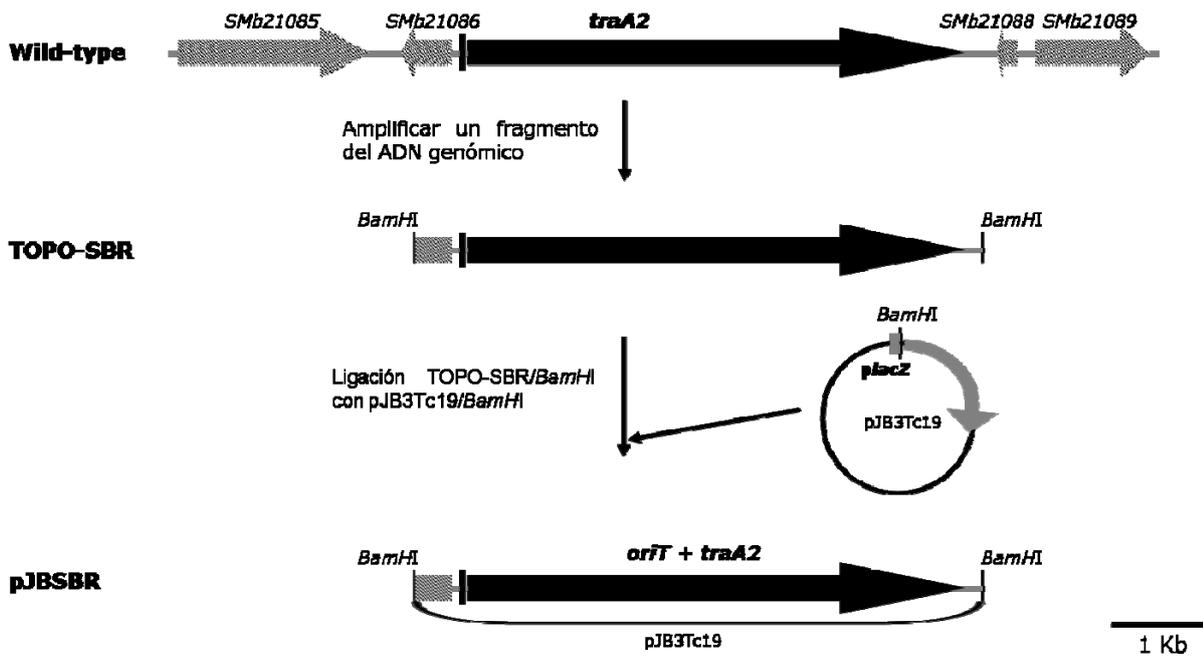
digestión *Bam*HI y se subclonó en el vector pJB3Tc19 previamente digerido con *Bam*HI. El plásmido resultante, pJBSAR, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021RctAHB. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm, Spc y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.



#### Anexo 1.4. Obtención de pJBSBR (*oriT* + *traA2*)

Para obtener las construcciones pJBSBR, un fragmento conteniendo el *oriT* y el gen *traA2* se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores TA20-F (5'-AAAGGATCCCAGCTCAGTACATCCGTG-3', *Bam*HI) y TA20-R (5'-AAAGGATCCCAACACAAACGCGTCACT-3', *Bam*HI) en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *Bam*HI (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 5,3 Kb se clonó en el vector TOPO<sup>®</sup>-XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-SBR. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de TOPO-SBR se aisló tras someter el plásmido a digestión *Bam*HI y se subclonó en el vector pJB3Tc19 previamente digerido con *Bam*HI. El

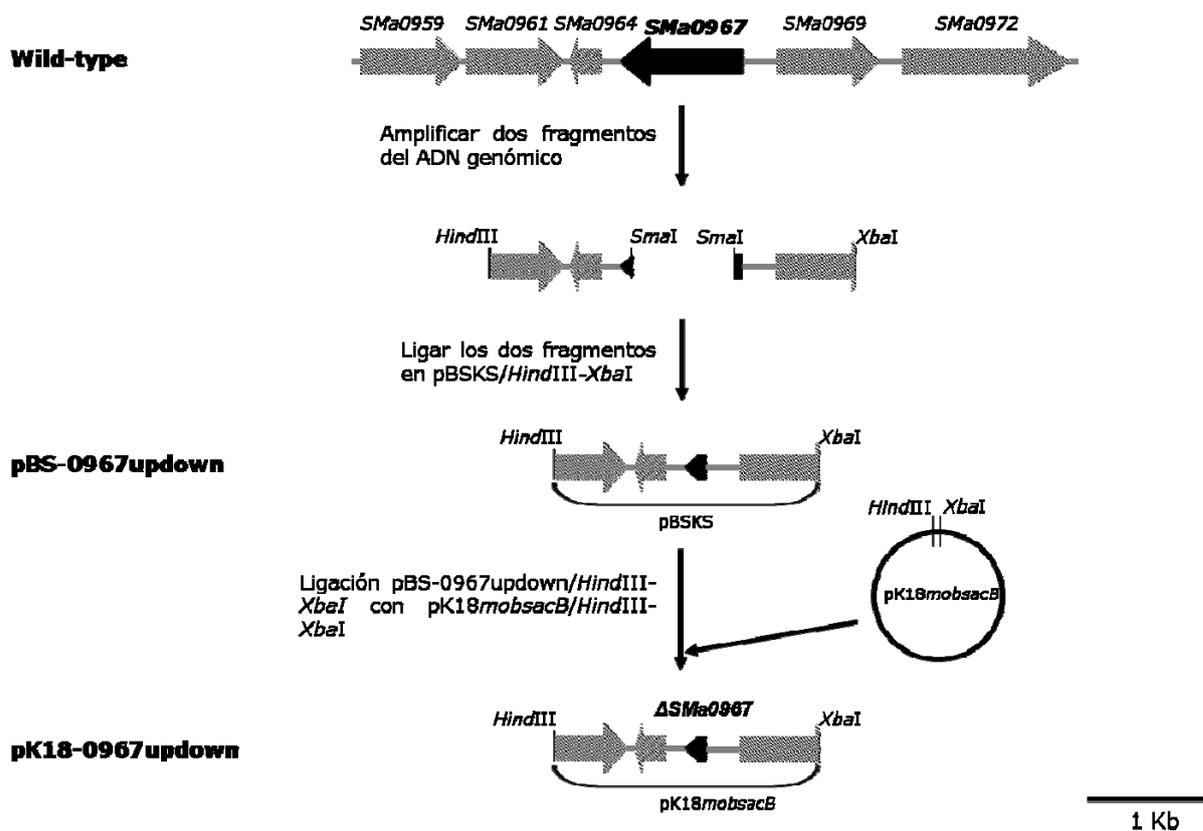
plásmido resultante, pJBSBR, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a las cepas 100TSSHB, 1021RctAHB y 1021RctAΔ*vir*BHB. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm, Spc, Gm y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.



### Anexo 1.5. Construcción de un mutante en el gen *SMa0967* de *S. meliloti* 1021.

Para obtener una versión delecionada del gen *SMa0967* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* dos productos: utilizando los cebadores m0967.up.f (5'-TTTAAGCTTGAGGCGTATGGTCTTTGC-3', *Hind*III) y m0967.up.r (5'-TTTCCCGGGAACAGGCAGAGGATGACG - 3', *Sma*I) se obtuvo un producto de 1 Kb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' del gen *SMa0967*; con los cebadores m0967.do.f (5'- TTTCCCGGGAATTCCTCGTGCAACACC-3', *Sma*I) y m0967.do.r (5'- TTTTCTAGAGCTTCCAGCAGGCATCGC -3', *Xba*I) se obtuvo un producto de 0,88 Kb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' del gen *SMa0967*. Los productos de PCR generados de 1 Kb y 0,88 Kb, se clonaron en el vector de clonación TOPO<sup>®</sup> XL PCR, obteniéndose los plásmidos TOPO-0967up y TOPO-0967down. La construcción TOPO-0967up se utilizó para recuperar el inserto *Hind*III/*Sma*I de 1 Kb, y

subclonarlo en el vector de clonación pBSKS digerido con *Hind*III/*Sma*I, obteniéndose el plásmido pBS-0967Up. Por otro lado, el plásmido TOPO-0967down se utilizó para recuperar el inserto *Sma*I/*Xba*I de 0,88 Kb, y subclonarlo en el plásmido pBS-0967up digerido con *Sma*I/*Xba*I, obteniéndose el plásmido pBS-0967updown. La construcción pBS-0967updown se utilizó para recuperar el inserto *Hind*III/*Xba*I de 1,88 Kb. El inserto de ADN aislado se clonó en el vector pK18*mobsacB* y la nueva construcción se denominó pK18-0967updown, que se utilizó para la obtención de un mutante deleciónado en el gen *SMa0967* mediante intercambio alélico. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes Km sensibles en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. El vector pK18*mobsacB* permite una selección adicional basada en la sensibilidad a sacarosa que confiere la presencia de gen *sacB*.



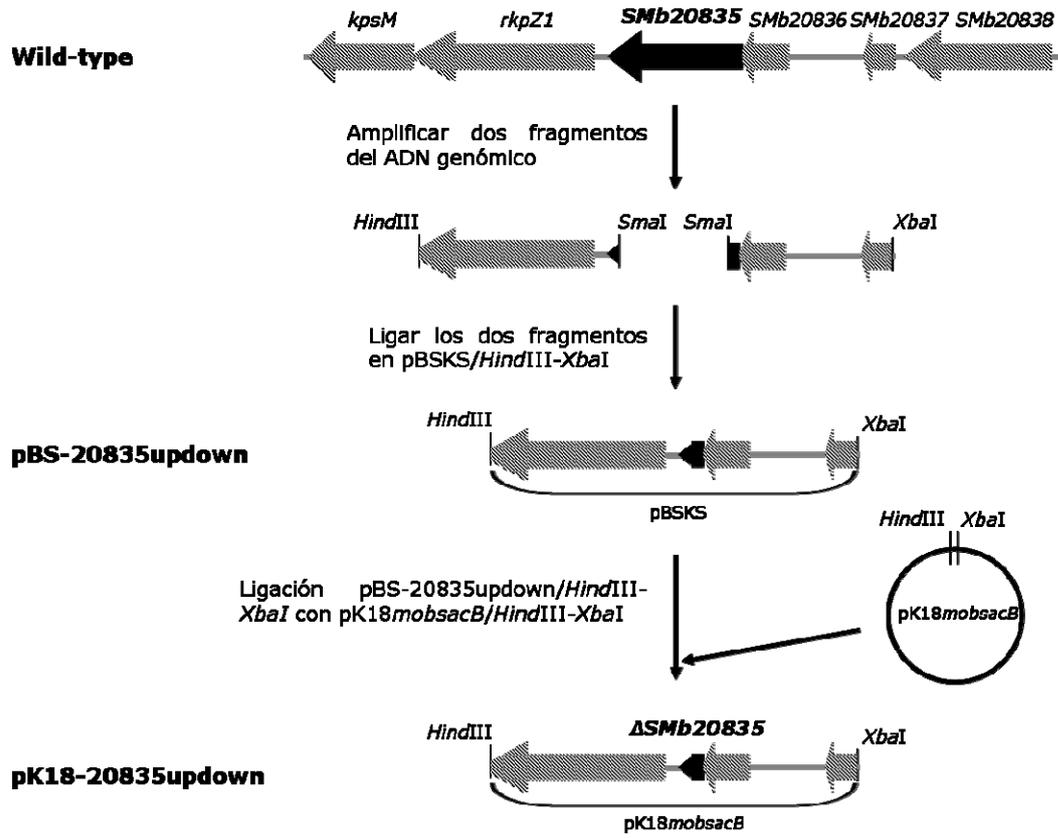
La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Hind*III utilizando como sonda el plásmido pK18-

0967updown *HindIII/XbaI*. La sonda hibrida con dos fragmentos *HindIII* de 2,9 Kb y 1,1 Kb, mientras que en los mutantes hibrida en un fragmento *HindIII* de 3,2 Kb.

#### **Anexo 1.6. Construcción de un mutante en el gen *Smb20835* de *S. meliloti* 1021.**

Para obtener una versión delecionada del gen *Smb20835* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* dos productos: utilizando los cebadores m20835.up.f (5'-TTTAAGCTTACAGGCTGCGGAAGAAGC-3', *HindIII*) y m20835.up.r (5'-TTTCCCGGGACTCGGAGAGCTTGAACG-3', *SmaI*) se obtuvo un producto de 1,38 Kb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' del gen *Smb20835*; con los cebadores m20835.do.f (5'-TTTCCCGGGCAGATGTTTCGAGACTCG-3', *SmaI*) y m20835.do.r (5'-TTTTCTAGATTCCAATGATCAACTTCC-3', *XbaI*) se obtuvo un producto de 1,19 Kb que contiene la secuencia adyacente al extremo 5' del gen *Smb20835*. Los productos de PCR generados de 1,38 Kb y 1,19 Kb, se clonaron en el vector de clonación TOPO<sup>®</sup> XL PCR, obteniéndose los plásmidos TOPO-20835up y TOPO-20835down, respectivamente. La construcción TOPO-20835Up se utilizó para recuperar el inserto *HindIII/SmaI* de 1,38 Kb, y subclonarlo en el vector de clonación pBSKS digerido con *HindIII/SmaI*, obteniéndose el plásmido pBS-20835up. Por otro lado, el plásmido TOPO-20835down se utilizó para recuperar el inserto *SmaI/XbaI* de 1,19 Kb, y subclonarlo en el plásmido pBS-20835Up digerido con *SmaI/XbaI*, obteniéndose el plásmido pBS-20835updown. La construcción pBS-20835updown se utilizó para recuperar el inserto *HindIII/XbaI* de 2,57 Kb. El inserto de ADN aislado se clonó en el vector pK18*mobsacB* y la nueva construcción se denominó pK18-20835updown, que se utilizó para la obtención de un mutante delecionado en el gen *Smb20835* mediante intercambio alélico. Dicho plásmido se introduce en la cepa movilizadora de *E. coli* S.17.1 y se conjuga con las cepas 100TSSΔ*Sma0967* y 1021Δ*Sma0967RctA*.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* utilizando como sonda el plásmido pK18-20835updown *HindIII/XbaI*. La sonda hibrida en las cepas parentales con tres fragmentos *EcoRI* de 1,1 Kb, 1,5 Kb y 3,6 Kb, mientras que en los mutantes pasa a hibridar con dos fragmentos de 1,6 Kb y 3,6 Kb.





## **CAPÍTULO II**



## IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ELEMENTOS REGULADORES DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS DE *S. meliloti*.

### Resumen

La transferencia conjugativa de los plásmidos simbióticos de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium etli*, se encuentra reprimida por el regulador transcripcional RctA en condiciones de laboratorio. En este trabajo se muestra la identificación de nuevos elementos reguladores en la cascada de transducción de señales implicados en la regulación de la conjugación de pSymA de *S. meliloti*. Se ha identificado el gen *SMa0974* (*SmrctB*) como un ortólogo del gen *rctB* de *R. etli*, el cual antagoniza la represión ejercida por RctA. Además, se ha encontrado que en *S. meliloti* existen dos genes adicionales, *rctR* y *rctC*, que participan en el control de la expresión de *SmrctB*, y que no se encuentran en el genoma de *R. etli*. *rctR* (*SMa0955*) codifica para una proteína con homología a reguladores transcripcionales de la familia GntR, la cual está implicada en la represión de *SmrctB*. Un mutante *rctR* promueve la transferencia conjugativa de pSymA y muestra un incremento en la expresión de los genes *tra*, *virB* y *SmrctB*, incluso en presencia de un gen *rctA* intacto. Entre los genes reprimidos por *rctR*, *rctC* (*SMa0961*) codifica para una proteína con homología a reguladores de respuesta, requerida para activar la transcripción de *SmrctB* y, por consiguiente, la desrepresión de las funciones conjugativas. En este trabajo se concluye que la transferencia conjugativa de los pSyms tanto en *S. meliloti* como en *R. etli*, se desreprime vía *rctB*; sin embargo, la cascada regulatoria que conduce a la activación de *rctB* probablemente es diferente.

## 2.1. Identificación del ortólogo del gen *rctB* de *R. etli* en el genoma de *S. meliloti*

### 1021

En el capítulo I se ha corroborado que tanto la transferencia del pSymA como la del pSymB de *S. meliloti* 1021 está sujeta a una represión dependiente del gen *rctA* en condiciones de laboratorio, por un mecanismo probablemente similar al descrito para el plásmido simbiótico pRetCFN42d (p42d) de *R. etli*. Al igual que el plásmido simbiótico de *R. etli*, el pSymA de *S. meliloti* sería autoconjugativo únicamente bajo determinadas condiciones, hasta el momento desconocidas, que implicarían la inactivación de la función de *rctA*. En ambos casos, las teóricas cascadas de transducción de señales que llevarían desde la percepción de las condiciones óptimas para la transferencia de los plásmidos hasta la inactivación del represor RctA son desconocidas. En el caso del pSym de *R. etli* sólo se conoce otro elemento participante en dicha ruta regulatoria. Pérez-Mendoza *et al.*, (2005) demostraron que la sobreexpresión del gen *rctB*, localizado adyacente al gen de la relaxasa *traA*, provoca la conjugación del plásmido simbiótico p42d de *R. etli*, junto con un aumento de la transcripción de los genes *tra* y *virB* necesarios para la transferencia conjugativa, aún en presencia de un gen *rctA* intacto.

### 2.1.1. La sobreexpresión de *SMa0974* de *S. meliloti* 1021 promueve la transferencia conjugativa del pSymA

Pérez-Mendoza y colaboradores (2005) no pudieron identificar en el genoma de *S. meliloti* 1021 un homólogo claro al gen *rctB* de *R. etli*. Aun así, y con objeto de determinar si *rctB* de *R. etli* podría ser funcional en la desrepresión del pSymA de *S. meliloti*, se introdujo el plásmido que contiene el gen *rctB* de *R. etli* bajo el control del promotor del triptófano, pTE3Yp028, en la cepa de *S. meliloti* 100TSS cuyo pSymA está marcado. Dicha cepa se usó después como donadora en un experimento de conjugación con la cepa desprovista de plásmidos *AtGMI9023*, que se usó como cepa receptora. Como se muestra en la Tabla 2.1, la sobreexpresión del gen *rctB* en el fondo de *S. meliloti* 100TSS promovió la transferencia conjugativa del pSymA a relativamente altas frecuencias. Este resultado sugería que la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti* podría ser desreprimida por un mecanismo similar al observado en *R. etli*, a través de *rctB*.

El producto del gen *rctB* de *R. etli* CFN42 muestra una alta homología (entre 95 y 99% de identidad) con proteínas de función desconocida descritas en los genomas de *R. etli* Kim 5 (RetlK5\_15865), *R. etli* CIAT 894 (RetlC8\_25130) y con una proteína localizada en el plásmido B de *R. etli* CIAT 652 (RHECIAT\_PB0000187), todas ellas localizadas en similares contextos genómicos, en las cercanías de operones *tra*. RctB también presenta entre un 25 y un 39% de identidad con al menos cuatro ORFs de función desconocida presentes en los genomas secuenciados de otras especies bacterianas dentro del orden *Rhizobiales*, como *S. meliloti* 1021 (*SMa0974*), *Rhizobium* sp. NGR234 (NGR\_b10680), *A. tumefaciens* C58 (*Atu5116*), *Mesorhizobium* sp. BNC1 (Meso\_4337) y con un ORF localizado en el plásmido C de *R. etli* CIAT 652 (RHECIAT\_PC0000881), todos ellos localizados en plásmidos y en contextos genéticos similares al del gen *rctB* de *R. etli* CFN42. A pesar de la moderada conservación de secuencias, la presencia de *rctB* y de todos estos otros ORFs en contextos genéticos similares sugerían que dichos ORF podrían representar ortólogos del gen *rctB* de *R. etli* CFN42.

En el caso de *S. meliloti* 1021, se realizaron varios estudios para determinar si el gen *SMa0974* podría reemplazar funcionalmente al gen *rctB* de *R. etli*. *SMa0974* codifica una hipotética proteína de 119 aminoácidos que no posee similitud de secuencia con proteínas de función conocida descritas en las bases de datos. A lo largo de una extensión de 91 aminoácidos (posiciones de 4 a 94 en *SMa0974* y de 41 a 131 en *RctB*), *SMa0974* de *S. meliloti* 1021 y *RctB* de *R. etli* CFN42 muestran un 48% de similitud de secuencia (25% de identidad).

Para averiguar si *SMa0974* podría reemplazar funcionalmente a *rctB*, se clonó bajo el promotor del *trp* en el vector de expresión pTE3, obteniéndose la construcción pTE3-SmrctB (Véase detalles en Anexo 2.1). Dicha construcción se introdujo en la cepa de *R. etli* CFNX195 (pRetCFN42d::Km), una cepa derivada de CE3 curada del plásmido p42a. La sobreexpresión de *SMa0974* en *R. etli* CFNX195 causó que la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d::Km se elevase desde una tasa indetectable hasta un valor de  $2 \times 10^{-4}$  (Tabla 2.1). Del mismo modo, se introdujo la misma construcción en la cepa de *S. meliloti* 100TSS y se hicieron cruces con *AtGMI9023* como cepa receptora. La sobreexpresión de *SMa0974* en *S. meliloti* provocó la transferencia del pSymA a frecuencias de aproximadamente  $3.4 \times 10^{-4}$  (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Influencia de los genes *rctB* y *SmrctB* en la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti* y pRetCFN42d de *R. etli* hasta AtGMI9023

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
1021RctA <sup>-</sup>	3,2 x 10 <sup>-5</sup>
100TSS (pTE3)	N.D.
100TSS (pTE3- <i>SmrctB</i> )	3,4 x 10 <sup>-4</sup>
1021RctA <sup>-</sup> (pTE3- <i>SmrctB</i> )	2,4 x 10 <sup>-5</sup>
CFNX195 (pTE3- <i>SmrctB</i> )	2 x 10 <sup>-4</sup>
100TSS (pTE3Yp028)	4 x 10 <sup>-4</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

También se introdujo la construcción pTE3-*SmrctB* en un fondo genético carente de RctA (cepa 1021RctA<sup>-</sup>). En dicha cepa se comprobó que la frecuencia de transferencia de pSymA hacia AtGMI9023 no varió con la sobreexpresión de *SMa0974* (Tabla 2.1).

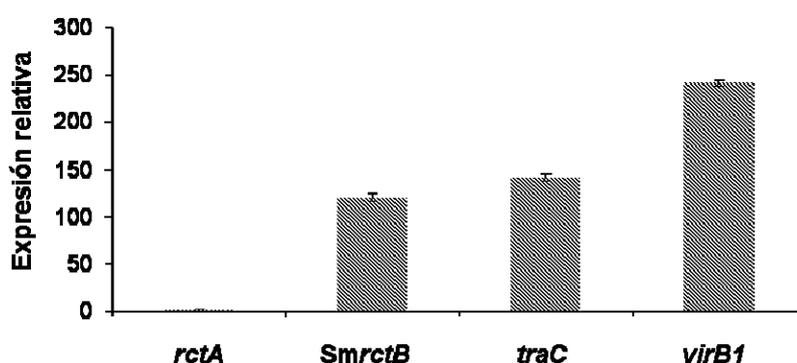
### 2.1.2. La sobreexpresión de *SMa0974* provoca un aumento de la transcripción de los genes implicados en la transferencia del pSymA de *S. meliloti* 1021

Para verificar si el efecto de la sobreexpresión del gen *SmrctB* sobre la transferencia del pSymA estaba mediado por cambios en la expresión de los genes de transferencia del pSymA, se llevó a cabo un estudio de la transcripción de los genes *traC* (gen que hipotéticamente se co-transcribe con *traD* y *traG*), *virB1* y *rctA*, mediante PCR a tiempo real. Estos estudios de expresión se realizaron comparando un fondo genético silvestre 1021 que contenía el vector pTE3 con aquel donde se sobreexpresaba el gen *SMa0974* (pTE3-*SmrctB*).

Los resultados demostraron que existía una clara inducción de los genes *traC* y *virB1* en presencia del gen *SMa0974* sobreexpresado, lo que apunta a la intervención de las funciones *tra* y *virB* en la transferencia conjugativa del pSymA de *S. meliloti* mediada por la sobreexpresión del gen *SMa0974*. Por el contrario, como se puede observar en la Figura 2.1, la transcripción del gen *rctA* no se vió afectada por la sobreexpresión del gen *SmrctB*. Estos resultados apuntaban a que *rctB* no estaría afectando la transcripción del represor *rctA*.

Por tanto, a pesar de que existe una baja conservación de secuencias, los genes *rctB* de *R. etli* y *SMa0974* de *S. meliloti* son funcionalmente intercambiables para promover la

transferencia conjugativa de los plásmidos simbióticos de *R. etli* y *S. meliloti*, y ambos genes parecen estar involucrados en la desrepresión de la transcripción de los genes necesarios para la transferencia conjugativa. Por ello, se ha renombrado al gen *SMA0974* como *SmrctB*. Sin embargo, en *S. meliloti* *rctB* no parece influenciar la transcripción del gen represor *rctA* (Figura 2.1), al contrario que en *R. etli* donde Pérez-Mendoza y colaboradores (2005) habían observado que la sobreexpresión de *rctB* reducía la transcripción de *rctA* hasta un 50% de los niveles de la cepa silvestre.



**Figura 2.1. Efecto de la sobreexpresión de *SmrctB* (*SMA0974*) sobre la transcripción de genes conjugativos.** La expresión relativa de los genes *rctA*, *traC* y *virB1* se calculó como la diferencia de los niveles de transcritos de estos genes entre la cepa 1021 (pTE3-*SmrctB*) comparada con la cepa 1021 (pTE3). Los resultados son la media de al menos dos experimentos biológicos independientes con tres réplicas técnicas cada uno. Las barras de error indican el error estándar con un 95% de confianza.

### 2.1.3. Análisis del transcriptoma de un mutante *RctA*<sup>-</sup> de *Sinorhizobium meliloti* 1021

Como se ha visto anteriormente, el gen *rctA* ejerce una función central en el proceso de transferencia conjugativa de los plásmidos simbióticos de *R. etli* y *S. meliloti* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005), siendo inhibidor de los genes *tra* y *virB* implicados en el proceso de transferencia conjugativa. Debido a la importancia que presenta este gen en la regulación del sistema de transferencia de *S. meliloti*, se decidió hacer un estudio del conjunto de genes, además de los *tra* y *virB*, que podrían estar regulados por *rctA*, mediante un análisis transcriptómico de un mutante defectivo en el gen *rctA*.

Se utilizaron los microarrays Sm6kOligo, basados en el genoma de *S. meliloti* 1021 (Krol y Becker, 2004). Para llevar a cabo este estudio transcriptómico las bacterias se cultivaron en medio TY líquido hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,7-0,8, se

recogieron por centrifugación y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Cuando fue necesario, se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se llevó a cabo la extracción de los ARNs y obtención de los correspondientes cDNAs necesarios para los experimentos de hibridación.

En la Tabla 2.2 se muestran algunos de los genes diferencialmente expresados obtenidos en la comparación entre un fondo *rctA* y un fondo silvestre de *S. meliloti* 1021 (la tabla completa de genes diferencialmente expresados en una cepa 1021RctA<sup>-</sup> comparada con la cepa silvestre 1021 puede consultarse en el Anexo 2.16). Posiblemente debido a que *rctA* parece ser el último gen dentro de la cascada regulatoria de la transferencia conjugativa de pSymA, el número de genes diferencialmente expresados en este experimento fue muy reducido. Como puede observarse en la Tabla 2.2, los genes que codifican proteínas implicadas en transferencia genética horizontal, como los genes *traC* y *traD*, así como varios de los genes del operón *virB* aumentaron su expresión en un mutante 1021RctA<sup>-</sup>. También apareció incrementada la expresión del gen *SMa1322*, que se encuentra adyacente al extremo 5' del gen *virB1* y que probablemente se co-transcribe con el operón *virB1-11*.

**Tabla 2.2.** Lista de genes diferencialmente expresados en un mutante 1021RctA<sup>-</sup> vs. 1021

Genes	Descripción	Valor de M*
<i>SMa0095</i>	Putativa D aminotransferasa	-0.94
<i>SMa0930</i>	Proteína de transferencia conjugativa TraD	1.23
<i>SMa0933</i>	Proteína de transferencia conjugativa TraC	2.06
<i>SMa0941</i>	Hipotética proteína	1.41
<i>SMa1311</i>	Proteína del Sistema de secreción tipo IV VirB	1.27
<i>SMa1313</i>	Proteína del Sistema de secreción tipo IV VirB5	1.50
<i>SMa1315</i>	Proteína del Sistema de secreción tipo IV VirB4	1.75
<i>SMa1318</i>	Proteína del Sistema de secreción tipo IV VirB3	2.46
<i>SMa1319</i>	Proteína del Sistema de secreción tipo IV VirB2	1.01
<i>SMa1321</i>	Proteína del Sistema de secreción tipo IV VirB1	2.84
<i>SMa1322</i>	Hipotética proteína	1.73
<i>SMa1323</i>	RctA Proteína reguladora de la transferencia conjugativa	-0.96
<i>SMc02507</i>	SitC Proteína membrana transportador ABC	-1.35
<i>SMc02506</i>	SitB Proteína de unión a ATP. Transportador ABC Fe	-1.49
<i>SMc02509</i>	SitA Proteína periplásmica. Transportador ABC Fe	-1.04

\*Los valores de M se consideran significativos cuando son superiores a 0.9 e inferiores a -0.9, con un  $p \leq 0.05$

Por otro lado, la expresión del gen *rctA* (*SMa1323*) pareció disminuida en el mutante RctA<sup>-</sup>, pero el valor de expresión diferencial (-0.96) no fue considerado significativo. También aparecieron como reprimidos los genes cromosómicos *SMc02507*, *SMc02508* y *SMc02509*, que hipotéticamente codificarían para un transportador de tipo ABC de hierro.

Llamativo fue el caso del gen *SMa0941*, cuya expresión apareció incrementada en el mutante *rctA*. Este gen fue objeto de un estudio posterior más profundo.

#### 2.1.4. Efecto de la sobreexpresión del gen *SmrctB* sobre el transcriptoma de *S. meliloti* 1021

Debido al importante papel del gen *SmrctB* en la transferencia conjugativa del plásmido pSymA, se decidió hacer un estudio del conjunto de genes que podrían estar regulados por *SmrctB*, mediante un análisis transcriptómico de una cepa que sobreexpresa el gen *SmrctB*, 1021(pTE3-*SmrctB*). Para llevar a cabo este estudio transcriptómico se utilizaron las mismas condiciones de cultivo utilizadas en el transcriptoma de 1021RctA<sup>-</sup> versus 1021.

**Tabla 2.3. Lista de genes diferencialmente expresados en una cepa que sobreexpresa el gen *SmrctB***

Genes	Descripción	Valor de M*
<i>SMa0093</i>	Putativa D alanina aminotransferasa	-1.69
<i>SMa0095</i>	Putativa D aminopeptidasa	-1.54
<i>SMa0907</i>	Hipotética proteína conservada	2.36
<i>SMa0929</i>	Proteína de transferencia conjugativa TraG	2.08
<i>SMa0930</i>	Probable proteína de transferencia conjugativa TraD	2.22
<i>SMa0933</i>	Probable proteína de transferencia conjugativa TraC	2.59
<i>SMa0041</i>	Hipotética proteína	2.42
<i>SMa0974</i>	Hipotética proteína	6.23
<i>SMa1302</i>	VirB11 Proteína del sistema secreción tipo IV	2.46
<i>SMa1303</i>	VirB10 Proteína transmembrana del sistema de secreción tipo IV	2.24
<i>SMa1306</i>	VirB9 Proteína del sistema de secreción tipo IV	1.00
<i>SMa1308</i>	VirB8 Proteína del sistema de secreción tipo IV	2.59
<i>SMa1311</i>	VirB6 Proteína del sistema de secreción tipo IV	2.60
<i>SMa1313</i>	VirB5 Proteína del sistema de secreción tipo IV	3.79
<i>SMa1315</i>	VirB4 Proteína del sistema de secreción tipo IV	3.82
<i>SMa1319</i>	VirB2 Proteína del sistema de secreción tipo IV	1.97
<i>SMa1321</i>	VirB1 Proteína del sistema de secreción tipo IV	4.16
<i>SMa1322</i>	Hipotética proteína	2.87
<i>SMa1459</i>	Putativa deshidrogenasa	-1.13
<i>SMB20756</i>	pccA putativa propionil CoA carboxilasa	-0.90
<i>SMB20861</i>	Putativa deshidrogenasa oxidorreductasa FAD flavoproteína	-0.93
<i>SMB21086</i>	Hipotética proteína	1.15
<i>SMc01331</i>	Hipotética proteína conservada	-0.92
<i>SMc01404</i>	Putativa proteína aspartato racemosa	-0.93
<i>SMc02728</i>	Fhs Probable proteína formato tetrahidrofolato ligasa	-1.14

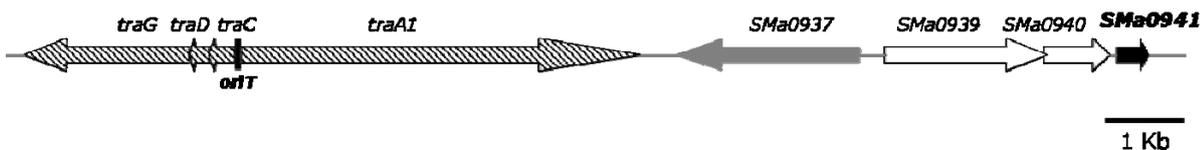
\* Los valores de M se consideran significativos cuando son superiores a 0.9 e inferiores a -0.9, con un  $p \leq 0.05$

En la Tabla 2.3 se muestra la lista completa de genes obtenida en el estudio transcriptómico 1021 (pTE3-*SmrctB*) versus 1021 (pTE3). Se puede observar un incremento

en la expresión de genes implicados en la transferencia conjugativa, tales como *traC*, *traD* y *traG*. De igual forma ocurre con los genes *virB*, así como el gen *SMa1322* que se encuentra localizado adyacente al extremo 5' del gen *virB1*. También aparecieron diferencialmente inducidos los genes *SMa0907* y *SMa0941*, que codifican para dos hipotéticas proteínas.

### 2.1.5. Estudio del gen *SMa0941*

Existen varios motivos por los que este gen ha sido objeto de un estudio más detallado. En primer lugar porque apareció inducido tanto en una cepa 1021RctA<sup>-</sup> como en la cepa que sobreexpresaba el gen *SmrctB*. En segundo lugar por su localización genética, ya que se encuentra localizado en el entorno de elementos responsables de la transferencia conjugativa de pSymA, tales como el gen que codifica para la relaxasa (*traA1*), el origen de transferencia (*oriT*) y el operón *traCDG* (Figura 2.2)



**Figura 2.2. Localización genética del gen *SMa0941*.** La región Dtr (*tra*) de *S. meliloti* se representa con flechas ralladas. El gen *SMa0941* se representa con una flecha negra y los genes *SMa0940* y *SMa0939* con flechas blancas. Otros genes se representan con flechas grises. El *oriT* (origen de transferencia) se representa en negro.

El gen *SMa0941* codifica para una hipotética proteína de 127 aa que posee un dominio REC (Receiver), un dominio receptor de señal que originariamente fue identificado en bacterias (CheY, OmpR, NtrC y PhoB), y que más recientemente se ha identificado también en proteínas eucariotas (Wolanin *et al.*, 2002). Este dominio está implicado en la transmisión, mediante reacciones de fosforilación, de la señal captada por el componente sensor en sistemas reguladores de dos componentes. El gen *SMa0941* podría estar funcionalmente asociado a un teórico sistema regulador de dos componentes formado por los genes adyacentes *SMa0940*, que codificaría para un regulador de respuesta, y *SMa0939*, que codifica para una hipotética histidina quinasa (Figura 2.2). Aunque habitualmente el dominio REC suele estar asociado a dominios proteicos de unión de ADN, no es infrecuente que REC sea el único dominio funcional presente en proteínas de este tipo (Laud y Goulian, 2007), como ocurre con el producto del gen *SMa0941*. Antes de iniciar un estudio funcional de

*SMa0941*, se decidió corroborar los datos de inducción obtenidos en los experimentos de microarrays mediante la técnica de PCR a tiempo real. Como puede observarse en la Tabla 2.4, la expresión del gen *SMa0941* se incrementó tanto en un mutante 1021RctA<sup>-</sup>, como en una cepa que sobreexpresa el gen *SmrctB*, siendo dicho aumento más pronunciado en este último caso. Una vez corroborada la influencia de *rctA* y *rctB* sobre la transcripción del gen *SMa0941*, se decidió estudiar el efecto de la sobreexpresión de dicho gen, así como la de los genes adyacentes *SMa0939-40* y del hipotético operón que formarían los genes *SMa0939*, *SMa0940* y *SMa0941*.

**Tabla 2.4.** Expresión relativa del gen *SMa0941* en los experimentos 1021RctA<sup>-</sup> vs. 1021 y 1021 (pTE3-*SmrctB*) vs. 1021 (pTE3)

Experimento	Expresión relativa	Error típico
1021RctA <sup>-</sup> vs. 1021	2,16	± 0,74
1021 (pTE3- <i>SmrctB</i> ) vs. 1021 (pTE3)	9,04	± 2,63

Datos de expresión y error típico obtenidos como media de al menos tres experimentos independientes.

Una vez amplificados los fragmentos que contenían tanto el gen *SMa0941* como el hipotético operón *SMa0939-40-41* al completo, se intentaron clonar con varias estrategias diferentes en distintos vectores de clonación, aunque en todos los casos resultó imposible obtener las correspondientes construcciones, lo que podría sugerir que la sobreexpresión del mismo podría tener un efecto tóxico para la bacteria (véase en Anexo 2.2).

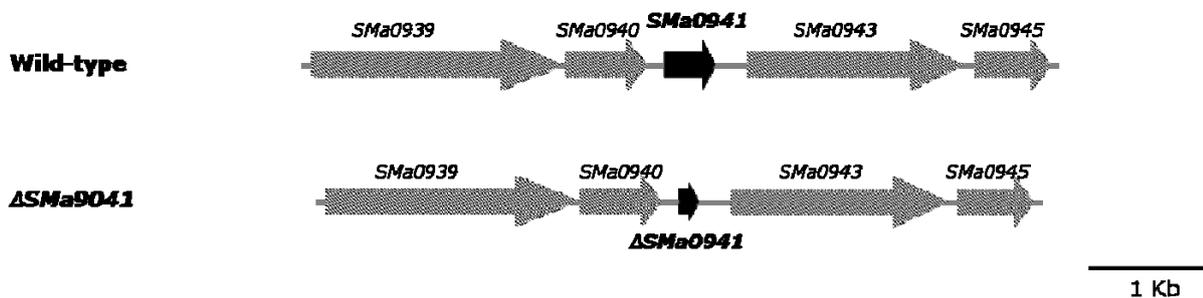
Por su parte, como puede observarse en la Tabla 2.5, la sobreexpresión de los genes *SMa0939* y *SMa0940* (Véase Anexo 2.3) no tuvo efecto sobre la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pSymA, ni desde la cepa 100TSS (pTE3-0939-40) ni desde 1021RctA<sup>-</sup> (pTE3-0939-40) hacia *AtGMI9023*, tomando como cepas control de la transferencia a las cepas 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup>.

**Tabla 2.5.** Influencia de la sobreexpresión de los genes *SMa0939-SMa0949* en la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti*

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS (pTE3)	N.D.
1021RctA <sup>-</sup> (pTE3)	4,3 x 10 <sup>-5</sup>
100TSS (pTE3- <i>SMa0939-40</i> )	N.D.
1021RctA <sup>-</sup> (pTE3- <i>SM0939-40</i> )	3,2 x 10 <sup>-5</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

Por otra parte, se decidió construir un mutante defectivo en el gen *SMa0941* con objeto de determinar su influencia sobre la tasa de transferencia del plásmido pSymA. Para ello se usó la técnica de PCR solapante por la que se consiguió eliminar el gen *SMa0941* sin producir efectos polares sobre la transcripción de otros genes (Véase Anexo 2.4). En la Figura 2.3 se muestra la representación gráfica de la delección del gen *SMa0941*.



**Figura 2.3. Representación gráfica de la delección del gen *SMa0941*.** El gen a deleccionar se representa con una flecha negra. Otros genes adyacentes se representan con flechas grises.

La mutación fue introducida en las cepas 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup>, y las cepas resultantes se usaron como donadores en un experimento de conjugación que tuvo como cepa receptora a la cepa *AtGMI9023*. Como puede observarse en la Tabla 2.6, una delección del gen *SMa0941* no promueve la transferencia conjugativa del pSymA en una cepa silvestre (100TSS) y tampoco parece afectar significativamente a la transferencia conjugativa en un mutante en el gen *rctA*.

**Tabla 2.6.** Influencia de una mutación en el gen *SMa0941* sobre la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti*

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
100TSS $\Delta$ <i>SMa0941</i>	N.D.
1021RctA <sup>-</sup>	3,2 x 10 <sup>-5</sup>
1021RctA $\Delta$ <i>SMa0941</i>	5,1 x 10 <sup>-5</sup>

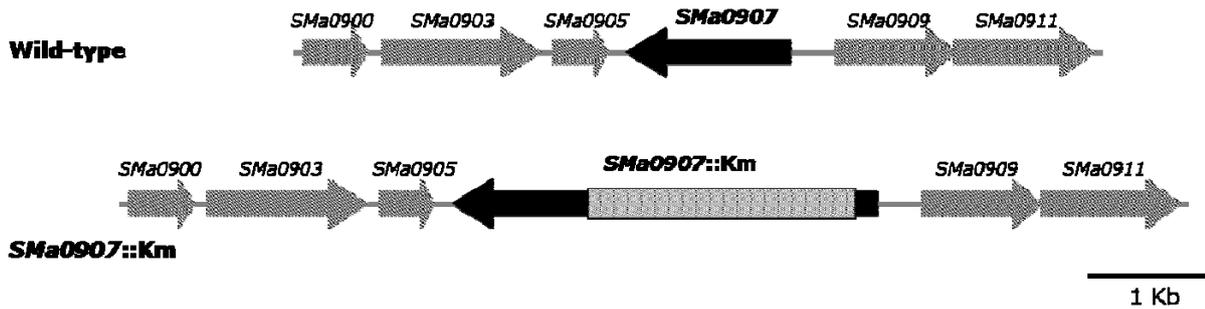
N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

### 2.1.6. Estudio del gen *SMa0907*

El gen *SMa0907* apareció diferencialmente inducido en una cepa que sobreexpresa el gen *SmrctB*. *SMa0907* codifica para una hipotética proteína, que presenta un dominio DUF1173 de función desconocida y caracterizado por la presencia de 3 residuos conservados de cisteína en el extremo amino terminal de las proteínas (pfam06666; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?ascbin=8&maxaln=10&eltype=2&uid=191578>).

Homólogos de *SMa0907* están presentes en otras especies de rizobios, habitualmente también en replicones plásmidicos que contienen genes *rctA* y/o *rctB*, como son el plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42 (RHE\_PD00156, localizado muy cercano al operón *virB1-virB11*; 71% identidad), el pSymB de *Rhizobium* sp. NGR234 (NGR\_b10390; 68% identidad), o los plásmidos B y C de *R. etli* CIAT652 (RHECIAT\_PB0000172, 71% identidad; RHECIAT\_PC0000897, 69% identidad). Sin embargo no parece existir un homólogo de *SMa0907* en el plásmido pATC58 de *A. tumefaciens*.

El estudio de *SMa0907* se ha llevado a cabo mediante dos abordajes diferentes. Por un lado se obtuvo un mutante en dicho gen (Figura 2.4, véase Anexo 2.6), y se determinó la influencia de esta mutación sobre la transferencia conjugativa del pSymA.



**Figura 2.4. Representación gráfica de la mutación en el gen *SMA0907*.** El gen diana se representa con una flecha negra. Otros genes se representan con flechas grises. La mutación se obtuvo mediante la inserción de un gen de resistencia a Km.

Como se puede observar en la Tabla 2.7, una mutación en el gen *SMA0907* no promovió la transferencia conjugativa del pSymA desde la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 ni pareció afectar la conjugación de este plásmido desde un fondo RctA<sup>-</sup>. Sin embargo, la mutación en *SMA0907* redujo casi un orden la magnitud la frecuencia de transferencia del pSymA desde una cepa que sobreexpresaba el gen *SmrctB*, lo que sugiere que este gen, sin ser esencial, podría ser importante para la eficiencia conjugativa de pSymA.

**Tabla 2.7.** Influencia de una mutación en el gen *SMA0907* sobre la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti*

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
1021RctA <sup>-</sup>	3,2 x 10 <sup>-5</sup>
1021 <i>SMA0907</i>	N.D.
1021RctA <i>SMA0907</i>	3,5 x 10 <sup>-5</sup>
1021 (pTE3- <i>SmrctB</i> )	3,4 x 10 <sup>-4</sup>
1021 <i>SMA0907</i> (pTE3- <i>SmrctB</i> )	6,6 x 10 <sup>-5</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

Por otro lado, se abordó el efecto de la sobreexpresión de *SMA0907* sobre la transferencia conjugativa de pSymA. Para ello se amplificó un fragmento de ADN que contenía al gen *SMA0907* de *S. meliloti* 1021 y se clonó en el vector pTE3, bajo control transcripcional del promotor *trp* (véase Anexo 2.5). Esta construcción fue introducida en las

cepas 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup>, y las correspondientes cepas derivadas fueron utilizadas como donadoras en cruces con AtGMI9023 como cepa receptora. Como se puede observar en la Tabla 2.8, en ningún caso se observaron cambios significativos en las frecuencias de transferencia del pSymA.

**Tabla 2.8.** Influencia de la sobreexpresión del gen *SMa0907* sobre la transferencia conjugativa de pSymA de *S. meliloti*

Cepas Donadoras	Frecuencia de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
100TSS (pTE3-0907)	N.D.
1021RctA <sup>-</sup>	3,2 x 10 <sup>-5</sup>
1021RctA <sup>-</sup> (pTE3-0907)	5,4 x 10 <sup>-5</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

## 2.2. Identificación y estudio del gen *rctR* (*SMa0955*), un regulador transcripcional implicado en la transferencia del pSymA de *S. meliloti*

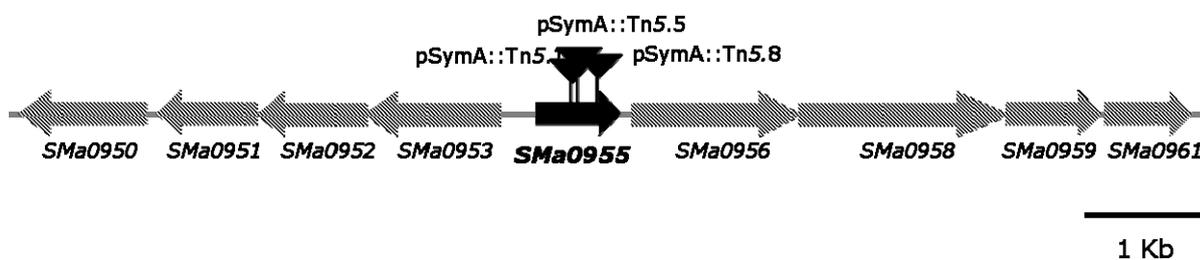
Para la identificación de nuevos genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico (pSymA) de *S. meliloti*, se aplicó la estrategia originalmente utilizada por Pérez-Mendoza y colaboradores (2005), que permitió identificar el gen *rctA*. Se realizó una mutagénesis generalizada de la cepa 100TSS de *S. meliloti* con el transposón Tn5 (marcada con un gen de resistencia a Sm/Spc en el gen *otsA*, localizado en el pSymA), mediante el empleo del vector suicida pSUP2021 (Simon *et al.*, 1983). Se consiguieron 4x10<sup>4</sup> transposantes tras la realización de 3 cruces paralelos, donde cada uno de los transconjugantes supuestamente portaba una inserción única del transposón Tn5. La eliminación de las células de *E. coli* se llevó a cabo mediante el crecimiento sucesivo de los transconjugantes en un medio mínimo donde *E. coli* no puede crecer. La ausencia de células de *E. coli* se comprobó tras la siembra de 100 µl de la mezcla de transposantes en placas de Endo-agar (medio para el crecimiento de coliformes, en el que *S. meliloti* no puede crecer; ver Material y Métodos, sección 2.1).

La selección de las inserciones de interés se llevó a cabo mediante el uso del total de transposantes 100TSS Km<sup>R</sup> como donadores en masa en conjugación con la cepa

*AtGMI9023*. Mediante este proceso se esperaba seleccionar, entre las diferentes inserciones del genoma de 10OTSS, aquellas localizadas en el *pSymA* y que promoviesen la transferencia conjugativa del mismo. Aparecieron sólo 3 transconjugantes de *AtGMI9023*  $Km^R$  y mediante digestión de su ADN genómico con *EcoRI* y posterior hibridación frente al transposón *Tn5*, se comprobó que cada uno tenía una única copia del transposón *Tn5* insertada en el genoma. Los transconjugantes obtenidos se denominaron *At (pSymATn5.1)*, *At (pSymATn5.5)* y *At (pSymATn5.8)*.

### 2.2.1. Identificación de *SMa0955*

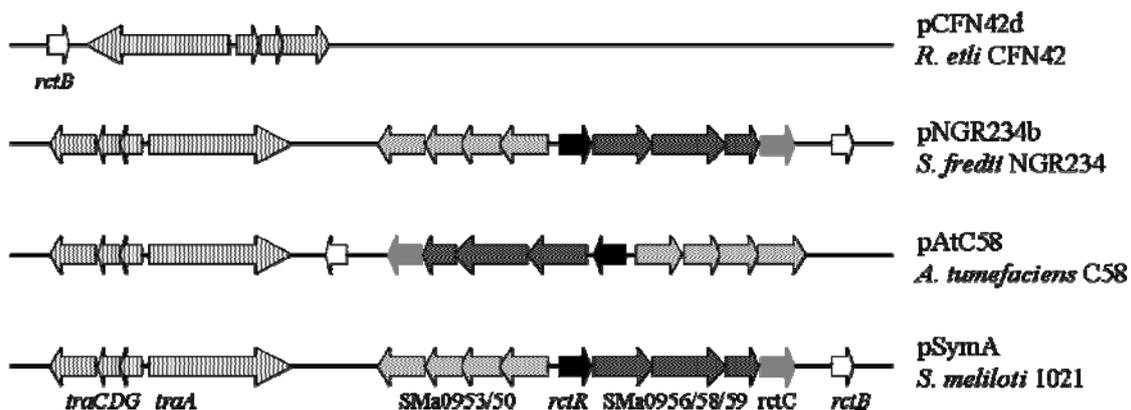
Se llevó a cabo la caracterización de las inserciones del transposón que promovían la transferencia de *pSymA*. Para ello se extrajo el ADN genómico de cada una de las cepas de *A. tumefaciens* portadoras del *pSymA::Tn5*. Posteriormente se digirieron los ADNs genómicos con la enzima *EcoRI* y se ligaron con el vector *pUC18* linearizado con la misma enzima. Después de transformar la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  con las diferentes ligaciones, se seleccionaron los transformantes portadores del plásmido *pUC18* con los fragmentos *EcoRI* que contenían las diferentes inserciones, mediante selección en LB suplementado con *Ap*, *Km* y X-gal. Se verificó la presencia del *Tn5* en cada uno de los clones obtenidos. Posteriormente, se subclonaron *BamHI* por separado ambos brazos del transposón *Tn5* de cada uno de los clones, junto a la secuencia adyacente de ADN de *S. meliloti*, nuevamente en el vector *pUC18*. Se secuenciaron cada uno de ellos usando cebadores específicos de la secuencia del transposón *Tn5* (Ver material y métodos, 5.5.1) determinándose así la localización exacta de cada inserción de *Tn5* dentro del genoma de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) (Figura 2.5).



**Figura 2.5. Localización de diferentes inserciones de *Tn5* en el gen *SMa0955*.** Las posiciones de los transposones se muestran con triángulos negros.

Como se muestra en la Figura 2.5, las tres inserciones estuvieron localizadas sobre un mismo ORF, *SMa0955*. Las inserciones Tn5.1 y Tn5.5 se localizaban en el mismo fragmento *EcoRI* separadas entre sí por 10 pb, y la Tn5.8 se encontró en un fragmento *EcoRI* diferente al de las otras dos inserciones, pero afectando el mismo ORF. El gen *SMa0955* se encuentra localizado en el pSymA, cercano a los operones *traA1* y *traCDG*. La secuencia de aminoácidos del producto del gen *SMa0955* muestra un alto grado de homología con reguladores transcripcionales de la familia GntR. Al igual que la mayoría de estas proteínas, *SMa0955* de *S. meliloti* presenta un motivo HTH (Helix-Turn-Helix) de unión a ADN situado en el extremo N-terminal, y un dominio FDC (Dominio C-terminal FadR; PF07729) en el extremo C-terminal (Rigali *et al.*, 2002).

A tenor de la significativa conservación de secuencias, homólogos del gen *SMa0955* de *S. meliloti* estarían también presentes en los plásmidos pNGR234b de *Rhizobium sp.* NGR234 (NGR\_b10600, 87% identidad) y pATC58 de *A. tumefaciens* C58 (*Atu5125*, 55% identidad), localizados además en contextos genéticos similares. Sin embargo, no parece existir un homólogo de *SMa0955* en el genoma de *R. etli* CFN42 ni de otras cepas de *R. etli* secuenciadas, aunque si en genomas secuenciados de *S. fredii* (como HH103, SFHH103\_06241; o USDA257, USDA257\_c29520), e incluso en cepas de bradyrhizobios (como *Bradyrhizobium sp.* ORS 375 o *Bradyrhizobium sp.* STM 3843), en donde podrían localizarse también en contextos genéticos similares a *SMa0955* (Figura 2.6).



**Figura 2.6. Entorno genético del gen *SMa0955*.** El gen *SMa0955* se encuentra en las bacterias *S. meliloti*, *Rhizobium sp.* NGR234 y *A. tumefaciens*, y además en contextos genéticos similares.

En todos los casos, este contexto genético incluye dos operones adyacentes a *SMa0955* en *S. meliloti* 1021: un operón que probablemente codifica para un transportador

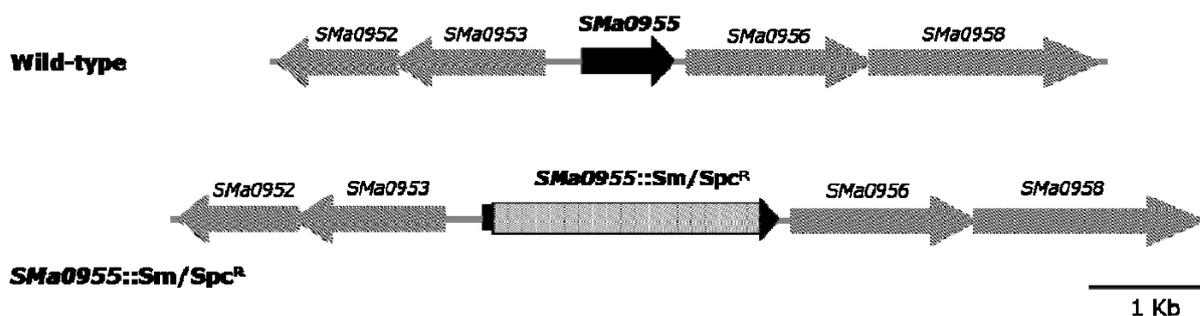
ABC, que se transcribe en dirección opuesta a *SMa0955* (*SMa0950-SMa0951-SMa0952-SMa0953*), y un segundo hipotético operón compuesto de varios genes conservados (*SMa0956-SMa0958-SMa0959-SMa0961*), que codifican para sendas proteínas con funciones teóricas diversas. Así, *SMa0956* codificaría para una putativa aminotransferasa con homología a glutamato-1-semialdehído aminomutasa (HemL), relacionadas con la producción de ácido  $\delta$ -aminolevulínico. *SMa0958* codificaría para una enzima que posee un dominio de unión a tiamina pirofosfato (TPP), mientras que *SMa0959* podría pertenecer a la familia de dehidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR, de Short-chain Dehydrogenase Reductase) que contienen un pliegue "Rossmann" conservado e involucrado en la unión de NAD(P)(H). Por su parte, el gen *SMa0961* codifica probablemente un regulador de respuesta (RR, de Response Regulator), caracterizado por un dominio receptor (REC, Receiver) en el extremo N-terminal y un dominio efector de unión a ADN en el C-terminal. Un análisis virtual de posibilidad de fosforilación de *SMa0961*, realizado en el sitio <http://prosite.expasy.org/>, indicó que la proteína *SMa0961* es susceptible de ser fosforilada en el Asp-53, un residuo conservado en la mayoría de este tipo de proteínas.

### **2.2.2. Caracterización funcional del gen *SMa0955* de *S. meliloti***

Para ahondar en el papel que desempeña el gen *SMa0955* en la transferencia del plásmido simbiótico pSymA de *S. meliloti*, se realizaron diversos estudios de complementación, funcionalidad y expresión de varios genes implicados en la transferencia de pSymA.

#### 2.2.2.1. Construcción de mutantes *SMa0955* mediante mutagénesis dirigida

Para comprobar que la transferencia de pSymA se debía a la mutación que presentaban los diferentes transposantes de *A. tumefaciens* en el gen *SMa0955*, se procedió a generar una nueva mutación en dicho gen mediante mutagénesis dirigida por delección de *SMa0955* y posterior inserción de un gen de resistencia a Sm/Spc, mediante la técnica de intercambio de marcador (véase Anexo 2.7).



**Figura 2.7. Mutación del gen *SMA0955* (*rctR*).** Representación esquemática de la mutación generada en la cepa 1021RctR<sup>-</sup>, mediante delección del gen *SMA0955* (flecha negra) y posterior inserción de un gen de resistencia a Sm/Spc.

El mutante resultante que se denominó 1021RctR<sup>-</sup> (Figura 2.7), se conjugó con las cepas AtGMI9023 y SmA818 de *S. meliloti* (1021 curada del plásmido pSymA), con el resultado de un aumento de la tasa de transferencia del pSymA desde indetectable a una frecuencia de transferencia de  $5,2 \times 10^{-6}$  (Tabla 2.9), lo que verificaba la importante implicación del gen *rctR* en la inhibición de la transferencia conjugativa de pSymA.

**Tabla 2.9.** Transferencia conjugativa de pSymA desde mutantes 1021RctR<sup>-</sup> hacia AtGMI9023 y SmA818

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>	
	AtGMI9023	SmA818
100TSS	N.D.	N.D.
1021RctR <sup>-</sup>	$5,2 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

#### 2.2.2.2. Complementación genética del mutante 1021RctR<sup>-</sup>

Para verificar el papel del gen *SMA0955* como regulador negativo de la transferencia, se realizó un estudio de complementación del mutante 1021RctR<sup>-</sup>. Para ello, se clonó el gen *rctR* de *S. meliloti* en el vector pJB3Tc19, resultado el plásmido pJB3-*rctR* (véase Anexo 2.8), y se introdujo en el mutante 1021RctR<sup>-</sup>. La cepa complementada se conjugó con la cepa receptora AtGMI9023, determinándose la frecuencia de transferencia del pSymA desde la cepa complementada en relación a la correspondiente cepa parental (1021RctR<sup>-</sup> portadora del vector pJB3 vacío).

**Tabla 2.10.** Complementación del mutante 1021RctR<sup>-</sup>

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
1021RctR <sup>-</sup> (pJB3)	5,2 x 10 <sup>-6</sup>
1021RctR <sup>-</sup> (pJB3- <i>rctR</i> )	N.D.

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

Las frecuencias mostradas en la Tabla 2.10 indicaban, de manera inequívoca, que la complementación del mutante 1021RctR<sup>-</sup> con una copia funcional de *SMa0955* en *trans*, reducía hasta frecuencias no detectables la transferencia del plásmido simbiótico pSymA observada en el mutante 1021RctR<sup>-</sup>, es decir, se restauraba la situación silvestre en condiciones de laboratorio. Este resultado confirmaba al gen *SMa0955* como un nuevo elemento represor de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *S. meliloti*. Por ello *SMa0955* ha sido renombrado como *rctR*.

### 2.2.3. Análisis del transcriptoma del mutante 1021RctR<sup>-</sup>

Como se ha descrito anteriormente, un mutante en el gen *rctR* promueve la transferencia conjugativa del plásmido pSymA a una frecuencia algo inferior a la observada en el mutante 1021RctA<sup>-</sup>. En cualquier caso, la inactivación de ambos genes *rctR* y *rctA* parecía conllevar un mismo efecto, la desrepresión de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pSymA, lo que sugería que la función de ambos genes estaba de alguna forma conectada. Aunque el estudio del transcriptoma de un mutante RctA<sup>-</sup> no arrojó mucha luz sobre la implicación de otros genes en la regulación de la conjugación de los plásmidos simbióticos, y dada la probable función de RctR como regulador transcripcional (familia GntR), se decidió realizar un análisis de los cambios transcriptómicos provocados por una mutación en *rctR*, lo que permitiría identificar aquellos genes regulados, directa o indirectamente, por RctR.

Se utilizaron los microarrays de *S. meliloti* 1021 ya descritos anteriormente, y se compararon los niveles de transcritos en células de la cepa silvestre 1021 y del mutante 1021RctR<sup>-</sup>. La preparación de los cultivos bacterianos, la obtención de los ARNs y el procedimiento de marcaje e hibridación fueron similares a los utilizados en experimentos

previos. Un total de 28 genes aparecieron diferencialmente expresados en el experimento (Arrayexpress accession E-MEXP-3664) (Tabla 2.11).

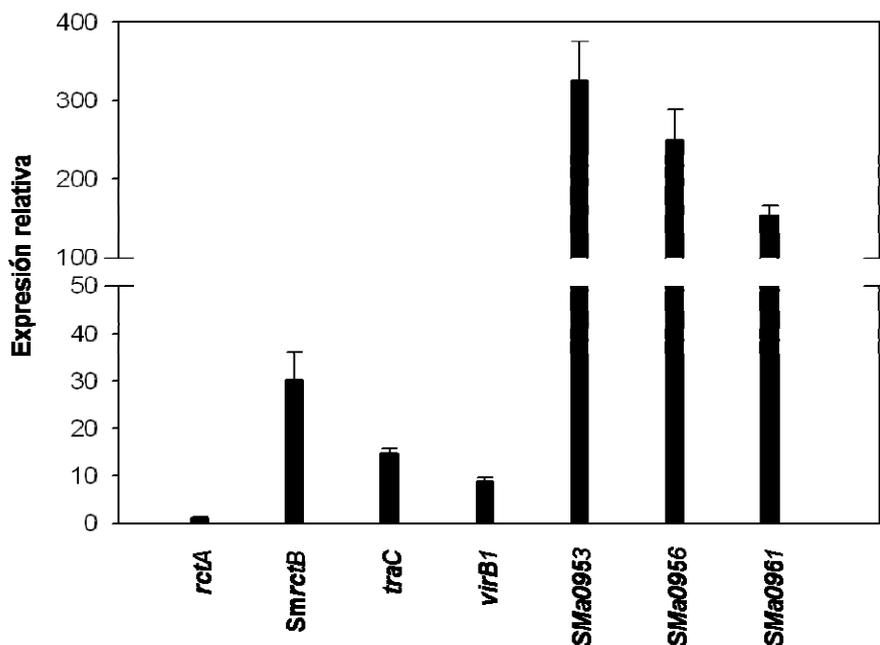
Como se observa en la Tabla 2.11, en un mutante 1021RctR<sup>-</sup> aparecieron inducidos los genes *virB*, pero a diferencia de los transcriptomas anteriores, no aparecieron como activados los genes *tra*. Tampoco aparecieron los genes *rctA* ni *rctB*. Destacó de nuevo la inducción del gen *SMa0941*, hecho que también había ocurrido en un mutante RctA<sup>-</sup>, así como en una cepa silvestre que sobreexpresa el gen *SmrctB*. Así mismo, aparecieron como sobreexpresados la mayoría de los genes de los dos operones adyacentes a *rctR* (*SMa0953-50* y *SMa0956-61*), anteriormente descritos. Es bastante común en reguladores de la familia GntR que los genes regulados se localicen adyacentes o cercanos al propio regulador transcripcional (Hoskisson y Rigali, 2009). También aparecieron diferencialmente expresados varios genes cromosómicos, aunque estos no fueron objeto de estudio posterior.

**Tabla 2.11.** Lista de genes diferencialmente expresados en un mutante 1021RctR<sup>-</sup>

Genes	Descripción	Valor de M <sup>*</sup>
<i>SMa0564</i>	Hipotética proteína conservada posible oxidorreductasa	- 2.23
<i>SMa0609</i>	Hipotética proteína	- 1.05
<i>SMa0941</i>	Hipotética proteína	1.75
<i>SMa0950</i>	Probable <i>attC</i>	4.39
<i>SMa0951</i>	AttB proteína permeasa de transporte tipo ABC	3.76
<i>SMa0952</i>	AttA2 proteína permeasa de transporte tipo ABC	4.18
<i>SMa0953</i>	AttA1 proteína permeasa de transporte tipo ABC	4.46
<i>SMa0956</i>	AtrB probable glutamato 1 semialdehído 21 aminomutasa	5.86
<i>SMa0958</i>	AtrC probable acetolactato sintasa	1.61
<i>SMa0959</i>	Probable deshidrogenasa	3.67
<i>SMa0961</i>	Putativo regulador de respuesta de sistema de dos componentes	1.13
<i>SMa0972</i>	Hipotética proteína conservada	1.17
<i>SMa0990</i>	Hipotética proteína	1.51
<i>SMa1313</i>	VirB5 componente del sistema de secreción tipo IV	1.91
<i>SMa1318</i>	VirB3 componente del sistema de secreción tipo IV	0.92
<i>SMa1321</i>	VirB1 componente del sistema de secreción tipo IV	2.46
<i>SMa1573</i>	CpaE2 probable proteína de ensamblaje del pilus	- 0.96
<i>SMa1787</i>	Hipotética proteína	- 1.02
<i>SMa1838</i>	Putativa deshidrogenasa	- 1.08
<i>SMb20137</i>	Hipotética proteína conservada	- 0.98
<i>SMb20589</i>	PcaF putativa proteína beta cetoalquil CoA tiolasa	- 0.95
<i>SMb20786</i>	Putativa permeasa de unión a aminoácidos de cadena ramificada ABC	- 1.55
<i>SMb20971</i>	Putativa proteína de unión a azúcares de un transportador tipo ABC	- 1.31
<i>SMc00088</i>	Hipotética proteína transmembrana desconocida	2.54
<i>SMc00100</i>	Hipotética proteína conservada	2.31
<i>SMc00158</i>	Hipotética proteína	- 0.93
<i>SMc00819</i>	KatA catalasa hidroxiperoxidasa HPII(III)	1.48
<i>SMc01453</i>	TRm22 Probable proteína transposasa	- 2.10

\*Los valores de M son superiores a 0.9 e inferiores a -0.9, con un  $p \leq 0.05$

Con objeto de verificar los resultados de expresión de varios de los genes obtenidos en el transcriptoma 1021RctR<sup>-</sup> vs. 1021, se estudió la expresión mediante PCR a tiempo real de algunos de los genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico, como los genes *SMa0953*, *SMa0956*, *SMa0961* y *virB1*, así como los genes *rctA*, *SmrctB* y *traC*. Los resultados corroboraron la mayor expresión de los genes *SMa0953*, *SMa0956*, *SMa0961* y *virB1* en el mutante 1021RctR<sup>-</sup> con respecto a su cepa parental, 1021. Aunque los genes *rctA*, *SmrctB* y *traC* no aparecieron diferencialmente expresados en los ensayos de microarrays, los resultados de la PCR a tiempo real demostraron una inducción significativa de los genes *traC* y *rctB* en un fondo RctR<sup>-</sup> con respecto a la cepa silvestre, pero no se observaron cambios en los niveles de transcripción del gen *rctA* (Figura 2.8). Estos resultados sugerían que RctR inhibe la transferencia conjugativa de pSymA mediante la represión del gen *rctB*.

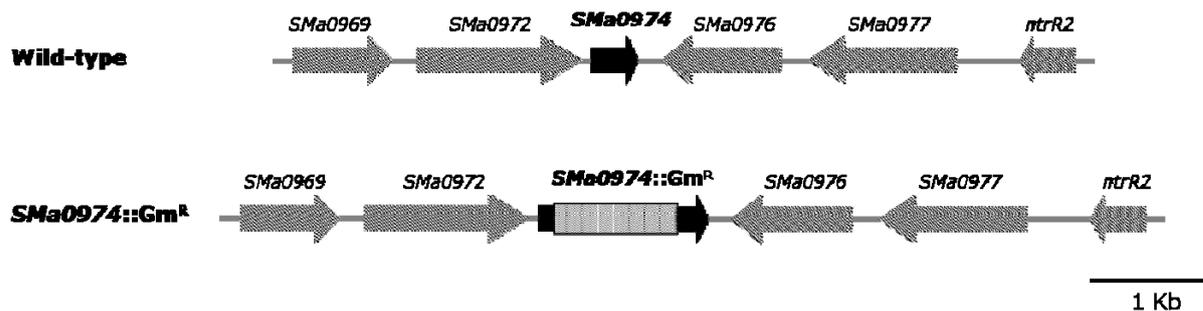


**Figura 2.8. Influencia de *rctR* sobre la transcripción de genes de pSymA.** La expresión relativa de los genes se calculó como la diferencia de los niveles de transcritos de estos genes entre la cepa 1021RctR<sup>-</sup> comparada con la cepa 1021. Los resultados son la media de al menos dos experimentos biológicos independientes con tres réplicas técnicas cada uno. Las barras indican el error estándar con un 95% de confianza.

### 2.2.3.1. Fenotipo conjugativo de un mutante doble en *rctR* y *rctB*

Como se ha demostrado anteriormente, el gen *rctR* influye en la expresión de genes que intervienen en la transferencia genética horizontal del plásmido pSymA, de forma que una mutación en este gen provoca el aumento de la expresión de genes como *SmrctB*, *traC* y

*virB1*, directamente implicados en el proceso de conjugación del plásmido simbiótico pSymA. Para verificar si el gen *rctB* podría participar en el control de la transferencia conjugativa de pSymA en la misma ruta de regulación que RctR, se construyó un mutante doble *rctRrctB*. Para ello, se interrumpió el gen *SmrctB* con un gen de resistencia a Gm mediante la técnica de intercambio de marcador (véase Anexo 2.9), en un fondo 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose la cepa 1021RctRQ1 (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Mutación en *SMA0974* (*SmrctB*) de *S. meliloti* 1021. Inserción de un gen de resistencia a Gm en el gen *SmrctB*, representado en color negro.

El doble mutante 1021RctRQ1 se conjugó con la cepa receptora *AtGMI9023* y se determinó la frecuencia de transferencia del pSymA en relación al mutante 1021RctR<sup>-</sup>. Los resultados mostraron que la mutación del gen *SmrctB* en un fondo genético RctR<sup>-</sup> reducía la transferencia conjugativa del pSymA hasta niveles no detectables (Tabla 2.12), lo cual indicaba que *rctR* y *rctB* funcionan dentro de la misma ruta de regulación y demostraba, de nuevo, la importante función desempeñada por el gen *SmrctB* en el control de la conjugación de pSymA.

**Tabla 2.12.** Efecto de una mutación en el gen *SmrctB* en un fondo RctR<sup>-</sup>

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
1021RctR <sup>-</sup>	5,2 x 10 <sup>-6</sup>
1021RctRQ1	N.D.

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

#### 2.2.4. Estudio de los genes *SMa0950*, *SMa0951*, *SMa0952* y *SMa0953*

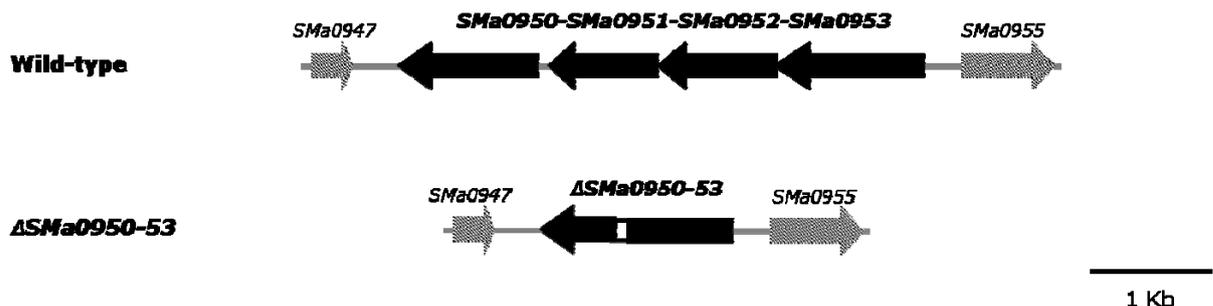
Como se observa en la Tabla 2.11, los genes *SMa0950-53* aparecieron diferencialmente expresados en el transcriptoma 1021RctR<sup>-</sup> frente a 1021, y además con altos niveles de expresión. Dichos genes se localizan también en la zona de transferencia y podrían codificar un hipotético sistema de transporte que podría intervenir en la transferencia conjugativa del plásmido pSymA.

En un estudio más completo de estos genes, encontramos que el gen *SMa0950* aparece en la base de datos como una proteína periplásmica de unión a sustrato perteneciente a un transportador tipo ABC. Si comparamos su secuencia con otras secuencias de diferentes rizobios, obtenemos que tiene un 84,3% de identidad con la proteína de *Rhizobium sp.* NGR234 NGR\_b10560, que se define como un transportador. El gen *SMa0951* se define como una permeasa perteneciente a un sistema de transporte tipo ABC de membrana interna. Contiene un dominio proteico IPR000515 que se define como componente de unión a proteína de membrana interna de sistemas de transporte. Los sistemas transportadores bacterianos dependientes de proteínas son sistemas multicomponentes (Ames, 1986; Higgins *et al.*, 1990), normalmente compuestos de una proteína periplásmica de fijación del sustrato, una o dos proteínas integrales de membrana interna homólogas y una o dos proteínas de la membrana periférica de unión al ATP, que acopla la energía al transporte activo. Las proteínas integrales de membrana interna trasladan el sustrato a través de la membrana. El producto del gen *SMa0951* muestra una homología del 86,7% con la proteína NGR234 NGR\_b10580 de *Rhizobium sp.*, que se describe como una proteína permeasa similar a AttA2 del transportador tipo ABC. El gen *SMa0952*, según la base de datos, codificaría para una permeasa de transporte tipo ABC, en la que encontramos el mismo dominio proteico que la proteína *SMa0951*, presentando la misma homología con la proteína NGR\_b10580 de *Rhizobium sp.* Por último, el gen *SMa0953* codifica para una proteína de unión a ATP, perteneciente a un transportador tipo ABC. Un análisis de la secuencia aminoacídica de *SMa0953*, reveló que el producto del gen *SMa0953* muestra una homología del 80,4% con la proteína NGR234 NGR\_b10590 de *Rhizobium sp.* Esta proteína se define en la base de datos como una proteína del tipo AttA1 perteneciente al transportador ABC.

Los transportadores tipo ABC pertenecen a la superfamilia denominada “cassette de unión a ATP” (ABC), que utiliza la hidrólisis de ATP para activar diversos sistemas

biológicos. Estos transportadores están implicados en la exportación o importación de una amplia variedad de sustratos que van desde pequeños iones hasta macromoléculas. La principal función de los sistemas de importación ABC es proporcionar los nutrientes esenciales para las bacterias. Son exclusivos de las procariotas y sus cuatro dominios suelen estar constituidos por polipéptidos independientes (dos proteínas ABC y dos proteínas DTM). Los sistemas importadores de procariotas requieren más proteínas extracitoplasmáticas de unión de sustrato (una o más por sistema) para desempeñar su función, en contraste con los transportadores tipo ABC que se usan para la exportación de sustancias o en la focalización de los componentes de membrana. Este tipo de exportador ABC se encuentra en todos los organismos vivos y, en general, el dominio DTM se fusiona con el dominio ABC por varias combinaciones diferentes. Algunos exportadores eucariotas codifican los cuatro dominios en la misma cadena polipeptídica (Saurin *et al.*, 1999).

Tras el estudio *in silico* de los genes que forman el hipotético operón de transporte, se procedió al estudio funcional de los mismos. Como hemos mencionado anteriormente, este conjunto de genes aparece considerablemente inducido en un mutante 1021 RctR<sup>-</sup> con respecto a su cepa parental 1021. Debido a ello, se decidió realizar un mutante carente de estos genes para determinar su posible efecto sobre la transferencia conjugativa del plásmido pSymA (véase Anexo 2.10). En la Figura 2.10, se representa gráficamente la delección de estos genes.



**Figura 2.10. Representación gráfica de la delección de los genes *SMA0950-SMA0953*.** Los genes diana se representan en color negro.

La delección en los genes *SMA0950-SMA0953* fue realizada en las cepas 100TSS y 1021RctR, obteniéndose los dobles mutantes 100TSSQ3 y 1021RctRQ3, respectivamente. Como se observa en la Tabla 2.13, no se observó ningún efecto debido a la ausencia de estos genes sobre la transferencia conjugativa del plásmido pSymA hasta la cepa receptora de

*AtGMI9023*. No obstante, como se discutirá más adelante, esto no tiene por qué significar que los genes *SMa0950-53* no tengan una participación activa en el proceso de transferencia de pSymA, sino que bajo las condiciones estudiadas (ausencia o presencia simultánea de RctR y *SMa0950-53*) no es posible poner de manifiesto dicho hipotético papel activo.

**Tabla 2.13.** Influencia de una mutación en los genes *SMa0950-53* sobre la transferencia conjugativa del pSymA de *S. meliloti* hasta *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
100TSSQ3	N.D.
1021RctR <sup>-</sup>	$5,2 \times 10^{-6}$
1021RctRQ3	$5,5 \times 10^{-6}$

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

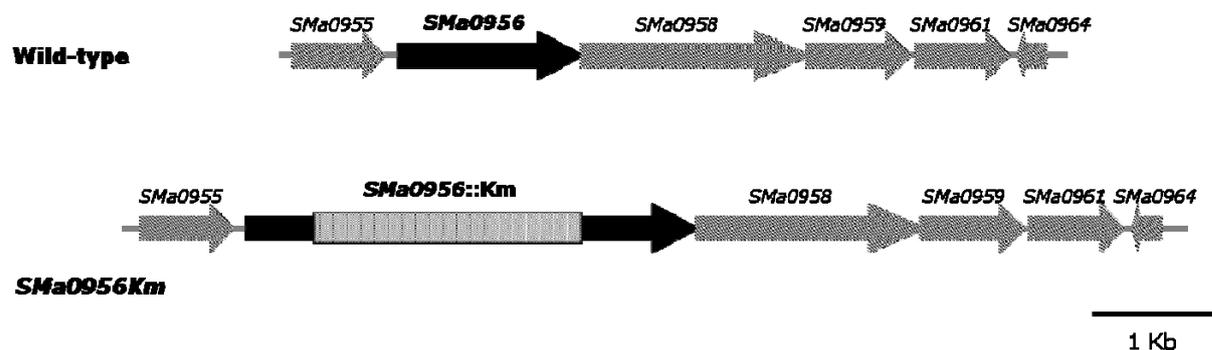
### 2.2.5. Estudio de los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959*

Como se observa en la Tabla 2.11, el hipotético operón localizado aguas abajo al gen *rctR*, compuesto por los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959*, apareció inducido en un mutante *rctR*. El producto del gen *SMa0956* muestra una identidad del 58% con el gen *Atu5124* que codifica para una aminotransferasa de clase III. Las aminotransferasas comparten ciertos rasgos con otras enzimas pirodoxalfosfato-dependientes, como la unión covalente del grupo pirodoxalfosfato a un residuo lisina. Basándose en la similitud de sus secuencias, se pueden agrupar en subfamilias (Yun *et al.*, 2004). Además, *SMa0956* muestra una homología del 82.2% con la proteína NGR\_b10610 de *Rhizobium sp.* NGR234, que aparece en la base de datos como AtrB, glutamato -1-semialdehído 1, 2-aminomutasa (HemL) y con homología a proteínas 4-aminobutirato aminotransferasas.

El producto del gen *SMa0958* muestra homología con proteínas que requieren de tiamina pirofosfato. Contiene un dominio IPR000399 de unión a TPP. *SMa0958* muestra un 88.4% de homología con la proteína NGR\_b10620 de *Rhizobium sp.* NGR234, que se denomina AtrC y codifica para una hipotética acetolactato sintasa. Así mismo, muestra una homología del 69% con el gen *Atu5123* de *A. tumefaciens* que codifica para una hipotética

acetolactato sintasa, y en torno al 29% de conservación de secuencia con los productos de genes anotados como acetolactato sintasa en otros rhizobios como es el caso de *Rhizobium etli* CFN42, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *M. loti* MAFF 303099 y *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 y ORS278.

En cuanto al producto del gen *SMa0959*, posee una identidad del 54% con el gen *Atu5122* de *A. tumefaciens* que codifica una hipotética 3-cetoacilreductasa (proteína portadora de acilo) y una homología del 81% con la proteína NGR234 NGR\_b10630 de *Rhizobium* sp., que se define en la base de datos como una 3-oxoacil-reductasa (proteína portadora de acilos). También muestra menores niveles de conservación (en torno al 36%) de identidad con proteínas anotadas en los genomas de *Bradyrhizobium* sp. ORS278 y BTAi1, *M. loti* MAFF 303099, *Azospirillum* sp. B510, *Frankia alni* ACN14a, *Klebsiella pneumoniae* Kp342. Además, muestra homología con deshidrogenasas de alcoholes de cadena corta, pues contiene un dominio IPR002198 deshidrogenasa/reductasa SDR de cadena corta. La familia de deshidrogenasas-reductasas de cadena corta (SDR) (Jornvall *et al.*, 1995) es una familia muy extensa de enzimas, donde la mayoría son conocidas por ser oxidorreductasas dependientes de NAD o NADP. La mayoría de los miembros de esta familia son proteínas de alrededor de 250 a 300 residuos aminoácidos. La mayoría de las deshidrogenasas poseen al menos 2 dominios (Benyajati *et al.*, 1981), uno para la unión de la coenzima, a menudo NAD, y el segundo de unión a sustrato. Este último dominio determina la especificidad del sustrato y contiene aminoácidos que participan en la catálisis.



**Figura 2.11. Representación gráfica del mutante en el gen *SMa0956*.** Para la obtención del mutante, se insertó el gen de resistencia a Km.

Con el fin de estudiar la participación de este hipotético operón en la transferencia conjugativa de pSymA, se generó un mutante en el gen *SMa0956* mediante la inserción de un

gen de resistencia a Km (véase Anexo 2.11). La mutación se introdujo en la cepa 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose el mutante 1021RctRQ2 (Figura 2.11).

Posteriormente, este mutante se ensayó como donador en cruces utilizando a *AtGMI9023* como cepa receptora. Como se puede observar en la Tabla 2.14, la inserción del gen de resistencia a Km en el gen *SMa0956*, en un fondo 1021 RctR<sup>-</sup>, redujo la transferencia conjugativa de pSymA hasta niveles indetectables, lo que sugería un posible papel del operón *SMa0956-59* en la transferencia conjugativa de pSymA.

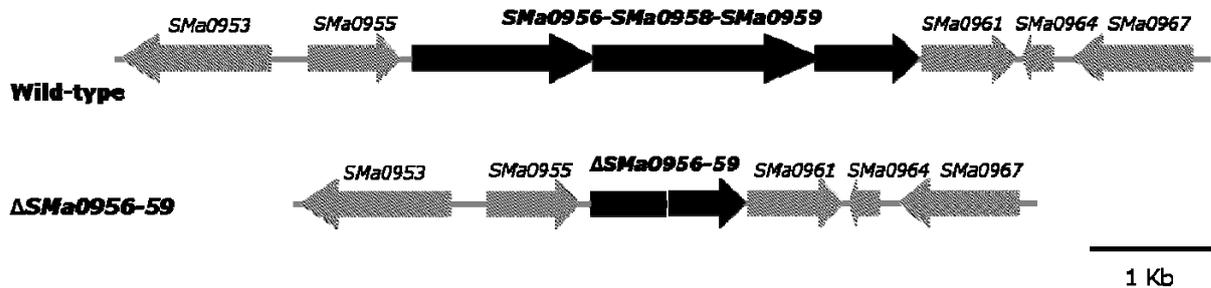
**Tabla 2.14.** Influencia del operón *SMa0956-SMa0961* en la transferencia conjugativa del pSymA de *S. meliloti* hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
1021RctR <sup>-</sup>	5,2 x 10 <sup>-6</sup>
1021RctRQ2	N.D.
1021RctRQ2 (pJB3-09565859)	N.D.

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

Para verificar el fenotipo observado en el mutante 1021RctRQ2, se amplificó un fragmento de ADN que contenía los genes *SMa0956-SMa0958-SMa0959* y se clonó en el vector de expresión pJB3Tc19 (véase Anexo 2.12). La construcción fue introducida en el mutante 1021RctRQ2, y se ensayó como donador en cruces con *AtGMI9023* como cepa receptora. Los resultados mostraron que la complementación genética en *trans* de los genes *SMa0956-SMa0958-SMa0959* no revirtió el fenotipo (no transferencia de pSymA) de la cepa 1021RctRQ2 (Tabla 2.14). Esto indicaba que el gen de resistencia a Km insertado en el gen *SMa0956* podría estar afectando la transcripción de genes localizados aguas abajo, particularmente al gen *SMa0961* (Figura 2.11). Para verificar esta posibilidad, se construyó una nueva mutación, esta vez mediante delección de los genes *SMa0956-SMa0958-SMa0959* pero sin la introducción de genes de resistencia a antibióticos, de forma que la mutación no afectase la transcripción de genes situados aguas abajo (véase Anexo 2.13). En la Figura 2.12

se muestra la representación gráfica del mutante defectivo en los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959*.



**Figura 2.12.** Representación gráfica de la deleción de los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959*. Los genes diana se representan en color negro.

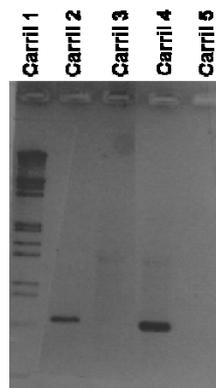
Dicha deleción fue introducida en la cepa 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose el mutante 1021RctRQ5, y se determinó la capacidad de transferencia de pSymA hacia *AtGMI9023* respecto al mutante 1021RctR<sup>-</sup>. Como puede observarse en la Tabla 2.15, la deleción de los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959* en el mutante RctR<sup>-</sup> no produjo ningún cambio en la tasa de transferencia de pSymA con respecto al mutante simple RctR<sup>-</sup>. Esto sugería que el fenotipo observado en el mutante 1021RctRQ2 (Tabla 2.14) podría ser debido no a la propia mutación sino a su efecto polar sobre la expresión del gen *SMa0961*, lo que a su vez indicaba un posible papel del gen *SMa0961* en la transferencia conjugativa del pSymA. Además, y de acuerdo a los resultados de los experimentos con microarrays, *SMa0961* estaría también regulado por RctR.

**Tabla 2.15.** Influencia del operón *SMa0956-SMa0959* en la transferencia conjugativa del pSymA de *S. meliloti* hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
1021RctR <sup>-</sup>	5.2 10 <sup>-6</sup>
1021RctRQ5	4.7 10 <sup>-6</sup>

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

El posible efecto polar ejercido por la inserción del gen de resistencia a Km en *SMa0956* (cepa 1021RctRQ2) sobre la expresión del gen *SMa0961* fue corroborado por las pruebas de cotranscription de los genes *SMa0959* y *SMa0961*. Usando los oligos atrBC59op.int.5 y *SMa0961.R* y muestras de ARN extraídas de la cepa de *S. meliloti* 1021RctR<sup>-</sup>, cuyas células se cultivaron en medio TY, pudimos obtener un amplicón de 627 de nt que abarca el extremo 3' del *SMa0959* y el extremo 5' del *SMa0961*. Este hecho apoyaba firmemente que *SMa0961* y los genes localizados aguas arriba constituyen un operón (Figura 2.13).



**Figura 2.13. Patrón transcripcional de la región *SMa095659-SMa0961* relacionada con la transferencia conjugativa de pSymA.** Carril 1, Marcador III de peso molecular de ADN (Roche); Carril 2, cDNA amplificado a partir del ARN extraído de células de 1021RctR<sup>-</sup>; Carril 3, cDNA amplificado a partir del ARN extraído de células de 1021RctRQ2; Carril 4, control positivo usando ADN genómico de 1021RctR<sup>-</sup>; Carril 5, control negativo usando ARN total extraído de células de 1021RctR<sup>-</sup>

### 2.2.6. Estudio del gen *SMa0961*

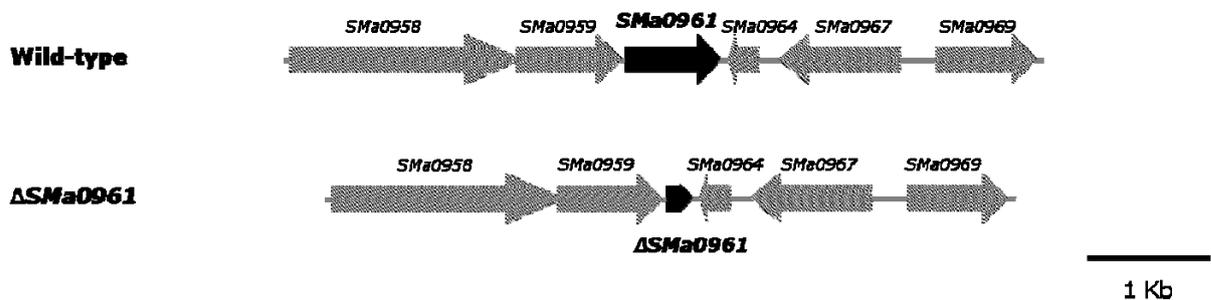
El producto del gen *SMa0961* codifica para una proteína de 240 aminoácidos con homología a reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes, por lo que es interesante estudiarlo desde el punto de vista de la transferencia, ya que son varios los casos en que la transferencia conjugativa se ve afectada por este tipo de reguladores (Stock *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002; Serna *et al.*, 2010). *SMa0961* contiene un dominio denominado IPR001789 que pertenece a los sistemas de regulación de dos componentes que las bacterias utilizan para sensar cambios, responder y adaptarse a cambios en las condiciones ambientales, condiciones de crecimiento o estreses.

Un análisis de la secuencia proteica de *SMa0961* mediante BLASTp reveló que este gen aparecía representado en otros rizobios, presentando una homología del 76% con la

proteína NGR\_b10640 (del plásmido pNGR234b) de *Rhizobium sp.* NGR234, que corresponde a un putativo regulador de respuesta de un sistema de dos componentes. También presenta homología del 37% con la proteína *Atu5119* del plásmido pAt de *A. tumefaciens* C58, pero no se localiza ningún homólogo en el genoma de *R. etli* CFN42 (Figura 2.6).

El producto del gen *SMa0961* posee un dominio receptor de señal (REC) en el extremo N-terminal, que se predice que puede ser fosforilado en el Asp-53, y un dominio efector de unión a ADN en el extremo C-terminal. Sin embargo, el gen *SMa0961* no está ligado a ningún gen análogo a una quinasa sensora, como ocurre en la mayoría de los sistemas reguladores de dos componentes (Stock *et al.*, 2000).

Debido a la importancia que podría tener este gen en la transducción de cambios en el ambiente que promovieran la transferencia conjugativa de los plásmidos de *S. meliloti*, se decidió abordar su estudio mediante la delección del gen (véase nexa 2.14) en las cepas 100TSS y 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose así los mutantes 100TSS $\Delta$ 0961 y 1021RctR $\Delta$ 0961, a los que se denominó 100TSSQ4 y 1021RctRQ4, respectivamente. En la Figura 2.14 se muestra la representación gráfica de dicha mutación.



**Figura 2.14.** Representación gráfica de la delección del gen *SMa0961*. El gen diana se representa en color negro.

En la Tabla 2.16 se muestran las tasas de transferencia del pSymA desde estos mutantes hacia *AtGMI9023*. Como se observa en la Tabla 2.16, la ausencia del gen *SMa0961* no modificó la tasa de transferencia de pSymA desde la cepa 100TSS, que continuó siendo indetectable. Por su parte, la delección del gen *SMa0961* en un fondo 1021RctR<sup>-</sup> provocó que la tasa de transferencia se redujese, respecto a la cepa 1021RctR<sup>-</sup>, hasta hacerse indetectable, lo que sugería la participación del gen *SMa0961* en el control de la transferencia conjugativa del plásmido pSymA.

**Tabla 2.16.** Influencia de la mutación en el gen *SMa0961* en la transferencia conjugativa del pSymA de *S. meliloti* hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS	N.D.
100TSSQ4	N.D.
1021RctR <sup>-</sup>	$5,2 \times 10^{-6}$
1021RctRQ4	N.D.

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

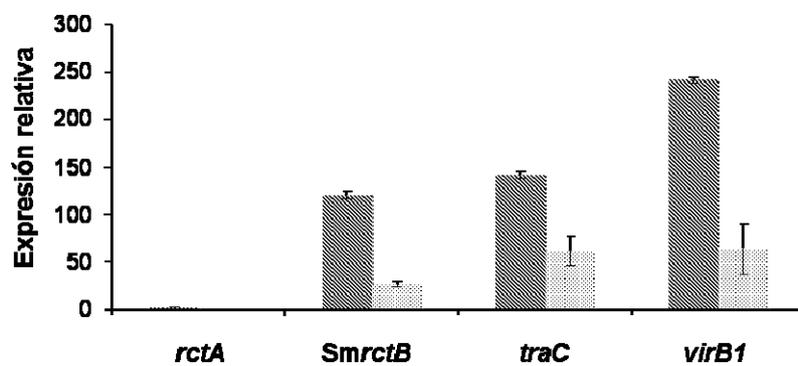
Como se ha descrito anteriormente, la transcripción del gen *SMa0961* estaba significativamente incrementada en un mutante defectivo en el gen *rctR*, mientras que una mutación en el gen *SMa0961* inhibía la transferencia conjugativa de pSymA observada en el mutante *rctR*. Por tanto, parecía plausible que un aumento de la expresión del gen *SMa0961* en una cepa silvestre podría tener como consecuencia la desrepresión de la transferencia conjugativa de pSymA. Para confirmar esto, *SMa0961* se clonó bajo el promotor del *trp*, obteniéndose el plásmido pTE3-0961 (véase Anexo 2.15), que se introdujo en la cepa 100TSS, utilizándose como donador en experimentos de conjugación, usando como cepa receptora a *AtGMI9023*. Como puede observarse en la Tabla 2.17, la sobreexpresión de *SMa0961* en la cepa 100TSS promovió la conjugación del plásmido pSymA a frecuencias de  $3,5 \times 10^{-4}$ . Estos resultados corroboraban la idea de que el producto del gen *SMa0961* actúa como un elemento de regulación positiva de la transferencia conjugativa de pSymA, de forma análoga a la función que realiza el producto del gen *SmrctB*.

**Tabla 2.17.** Influencia de la sobreexpresión del *SMa0961* en la transferencia conjugativa del pSymA de *S. meliloti* hacia *AtGMI9023*

Cepas Donadoras	Frecuencias de Transferencia <sup>a</sup>
100TSS (pTE3)	N.D.
100TSS (pTE3-0961)	$3,5 \times 10^{-4}$

N.D., transferencia no detectada; <sup>a</sup> las frecuencias están calculadas como el número de transconjugantes por célula donadora y son la media de al menos tres experimentos.

Para verificar si la sobreexpresión del gen *SMa0961* estaba afectando la transcripción de los genes que intervienen en la transferencia conjugativa del plásmido pSymA, se analizó la expresión de los genes *rctA*, *SmrctB*, *traC* y *virB1* mediante PCR a tiempo real, en un fondo en el que se sobreexpresa el gen *SMa0961* en comparación con un fondo 1021 (Figura 2.15). Los resultados mostraron un incremento de la expresión de todos estos genes, con la excepción de *rctA*, cuando se sobreexpresaba el gen *SMa0961*, lo que apoyaba la idea de que *SMa0961* es otro elemento importante en la regulación de la transferencia conjugativa de pSymA. Por tanto, renombramos al gen *SMa0961* como *rctC*.



**Figura 2.15. Análisis de la expresión relativa de los genes *rctA*, *traC* y *virB1* en un fondo 1021 (pTE3-*SmrctB*) y 1021 (pTE3-0961) versus 1021 (pTE3).** La expresión relativa de los genes *rctA*, *SmrctB*, *traC* y *virB1* se calculó como la diferencia de los niveles de transcritos de estos genes entre la cepa silvestre que contenía el vector sobreexpresando el gen *SmrctB* (gris oscuro) o el gen *SMa0961* (gris claro) respecto a la misma cepa conteniendo el vector pTE3 vacío. Los resultados son las medias de al menos dos experimentos biológicos independientes con tres réplicas técnicas cada uno. Las barras de error indican el error estándar con un 95% de confianza.

Aunque los genes implicados en la transferencia conjugativa de *S. meliloti* aumentan su expresión cuando ambos genes *SmrctB* y/o *SMa0961* se encuentran sobreexpresados (Figura 2.15) es bastante probable que *rctC* controle la expresión de *rctB* y no al revés. De hecho, cuando *rctC* es sobreexpresado también aumenta la transcripción de *rctB*. Sin embargo, pudimos comprobar que *rctB* no afecta la transcripción de *rctC*. Los niveles de expresión de *rctC* fueron similares en un fondo *rctR* que en un doble mutante *rctRrctB* (1021RctRQ1; expresión relativa  $1,39 \pm 0,1$ ). Por otro lado, la sobreexpresión de *rctB* en la cepa 1021 no provocó cambios en la expresión de *rctC* respecto a la cepa silvestre 1021 (expresión relativa  $1,05 \pm 0,12$ ). Todos estos resultados indicaban que *rctC* se encuentra por encima de *rctB* en la cascada regulatoria que conduce a la activación de la transferencia conjugativa del pSymA.

### 2.3. Discusión

La transferencia conjugativa de los plásmidos de *S. meliloti*, pSymA y pSymB, dependen de la represión ejercida por el gen *rctA* en condiciones de laboratorio, por un mecanismo similar al que controla la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*. Del mismo modo que ocurre con el plásmido simbiótico de *R. etli*, el pSymA de *S. meliloti* es autotransferente bajo ciertas condiciones ambientales desconocidas, las cuales desencadenarían la inactivación de la función represora de RctA (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2008). Aún se desconocen no solo la señal o señales que desencadenan el proceso, señales que podrían proceder del ambiente o del entorno intracelular, sino la forma en que se transduce la señal predicha y los reguladores que participan en el bloqueo de la actividad represora de RctA. En *R. etli* solo otro gen, *rctB*, se sabe que participa en este sistema. Un aumento en la expresión de *rctB* permite la desrepresión de los genes de la transferencia conjugativa, presumiblemente porque afecta a la expresión y/o actividad del producto del gen *rctA*, mediante un mecanismo aún desconocido (Pérez-Mendoza *et al.*, 2004, 2005).

En esta tesis se han identificado tres nuevos reguladores, además del gen *rctA*, que participan en el control de la transferencia de los pSyms de *S. meliloti*. Se ha identificado a *SMa0974* como un ortólogo del gen *rctB* de *R. etli*, necesario para contrarrestar la acción represora de *rctA*. El gen *SMa0974* de *S. meliloti* 1021 codifica una proteína que muestra un 25% de identidad (48% de similitud) con la proteína RctB de *R. etli*. A pesar del bajo grado de conservación de secuencia, ambos genes son funcionales e intercambiables para la desrepresión de los genes de la transferencia conjugativa de pSyms en una y otra especie. La sobreexpresión de *SmrctB* promueve la transferencia conjugativa del plásmido pSymA desde *S. meliloti* hacia *AtGMI9023* a una frecuencia 10 veces mayor a la observada en un mutante *rctA*. Sin embargo, el efecto de la sobreexpresión del gen *SmrctB* y el de la mutación del gen *rctA* no parecen ser acumulables, ya que la frecuencia de transferencia del pSymA desde un mutante *rctA* no se altera cuando se sobreexpresa *SmrctB* desde un promotor heterólogo. Este resultado no tiene fácil explicación, aunque podría sugerir una mayor complejidad de la actividad reguladora de RctA de la que hasta ahora se ha descrito, como por ejemplo que pudiera influenciar, de forma directa o indirecta, la expresión de genes que afecten a la eficiencia del proceso conjugativo.

El gen *SmrctB* ejerce un efecto positivo sobre la expresión de genes implicados en el

mecanismo de transferencia conjugativa del pSymA. Mediante la técnica de PCR a tiempo real, se ha podido constatar que la sobreexpresión del gen *SmrctB* conduce a un aumento de la expresión de los genes *tra* y *virB*, como ocurría en el sistema de regulación de la transferencia conjugativa del pSym de *R. etli*. Sin embargo, y al contrario de lo que ocurre en *R. etli*, donde una sobreexpresión de *rctB* reduce los niveles de expresión del gen *rctA*, *SmrctB* no parece afectar a la transcripción del gen *rctA*, por lo que *SmrctB* podría ejercer su efecto sobre *rctA* post-transcripcionalmente, una posibilidad que ya había sido sugerida anteriormente (Perez-Mendoza *et al.*, 2005). Debido a que las proteínas RctB predichas no muestran conservación de secuencia con proteínas de función conocida, no es posible especular con el mecanismo por el que *rctB* antagoniza la acción represiva de *rctA*.

A pesar de la conservación del par represor-antirrepresor *rctA-rctB* tanto en el pSym de *S. meliloti* como en el de *R. etli*, hay dos elementos regulatorios en el pSymA de *S. meliloti*, cuya función se ejerce aguas arriba a *rctB* en la cascada de señalización, que no están presentes en *R. etli*. Por un lado está el gen *rctC* (*SMa0961*), que codifica un probable regulador de respuesta (RR) perteneciente a la familia de reguladores de dos componentes. Nuestros resultados indican que la expresión de *rctC* es necesaria para la activación de la transcripción de *rctB* y, por tanto, para la desrepresión del sistema conjugativo. Por el contrario, hemos podido demostrar que *rctB* no tiene influencia sobre la expresión de *rctC*. La expresión del gen *rctC* desde un promotor heterólogo permite aumentar la transcripción de *rctB* (y por tanto de los genes *tra* y *virB*) y una inducción en la transferencia conjugativa de pSymA. *rctC* parece ser el último gen de un operón tetracistrónico (*SMa0956-SMa0958-SMa0959-rctC*), donde es precedido por tres genes que codifican proteínas con diversas supuestas funciones. *rctC* podría codificar un RR huérfano, ya que no está asociado a genes que codifiquen para quinasas sensoras. Sin embargo, como muchos RR, la proteína RctC parece contener un residuo conservado de Asp (Asp-53 in RctC) que normalmente necesita ser fosforilado para activar el dominio de unión al ADN asociado (Stock *et al.*, 2000) y, por tanto, para regular la transcripción de los genes diana. Futuras cuestiones a resolver son, por ejemplo, si la fosforilación de RctC es necesaria para la activación de la transferencia conjugativa y si RctC se une directamente al promotor del gen *rctB*.

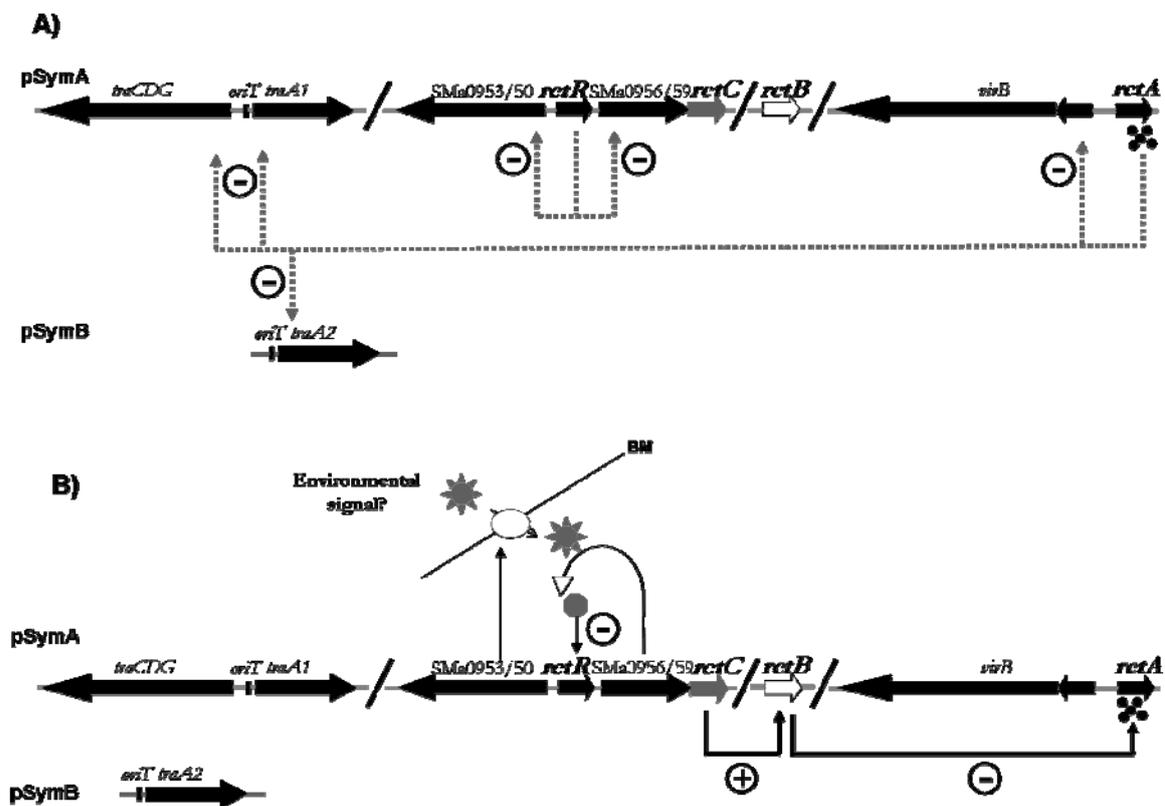
La expresión del operón *SMa0956-SMa0958-SMa0959-rctC* aumenta cuando otro regulador transcripcional, *rctR* (*SMa0955*) es bloqueado. En una cepa *RctR*<sup>-</sup>, la transcripción tanto del gen *rctC* como del *rctB* se ve aumentada, junto con el incremento de la expresión de

los genes conjugativos (*tra*, *virB*), lo que desbloquea la transferencia conjugativa de pSymA. Otro operón que aumenta su transcripción en un mutante RctR<sup>-</sup> es el operón *SMa0953-SMa0952-SMa0951-SMa0950* (*SMa0953/50*), que probablemente codifique para un transportador de membrana tipo ABC y una proteína periplásmica de unión a ligando.

El gen *rctR* codifica para un regulador transcripcional que muestra una alta homología con la familia de reguladores GntR. Se ha visto que este tipo de reguladores responden a estímulos externos (Rigali *et al.*, 2002), por lo que también se les denomina sistemas de regulación de un componente. Un rasgo característico de la familia GntR de reguladores transcripcionales, muchos de ellos represores, es la presencia en la proteína reguladora de un dominio N-terminal de unión a ADN junto a un dominio de unión a ligando y/o un dominio de oligomerización (Hoskisson y Rigali, 2009). La unión al ligando específico conlleva un cambio conformacional de la proteína que implica cambios en su afinidad de unión a los promotores que regula. Los reguladores GntR están localizados frecuentemente adyacentes a los genes que controlan, lo que a veces puede ser indicativo de los componentes con los que interactúan. El gen *rctR* no es exclusivo de plásmidos simbióticos de los rizobios, sino que también se encuentra presente en el plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens* y el pNGR234b de *Rhizobium* sp. NGR234.

El gen *rctR* es adyacente y reprime la transcripción de dos operones, *SMa0953/50* y *SMa0956-SMa0958-SMa0959-rctC* que contienen genes con diversas funciones predichas. Como hemos discutido arriba, al menos uno de estos genes, *rctC*, tiene un efecto directo sobre la transferencia conjugativa de pSymA, al ser necesario para la activación del gen antirrepresor *rctB*. Para el resto de genes de estos 2 operones, no se ha podido de momento obtener evidencias de su posible papel activo, quizá por la limitación que supone el trabajar con mutantes para poder evidenciar la transferencia conjugativa en el laboratorio. No obstante, ha de considerarse la posibilidad de que la función de estos genes se sitúe cascada arriba de RctR, quizás controlando la propia actividad represora de RctR, lo que les otorgaría un papel preponderante en el proceso conjugativo. Esta posibilidad está apoyada por varios hechos relevantes: primero, la posición adyacente entre *rctR* y estos 2 operones, no solamente en pSymA sino en otros plásmidos donde parece conservado todo el sistema; segundo, el hecho de que ambos operones estén regulados (reprimidos) por RctR; tercero, que el gen *rctC*, que como ha quedado demostrado en este trabajo es necesario para activar *rctB*, se encuentre transcripcionalmente ligado a los *SMa0956-SMa0958-SMa0959*, a pesar de que las hipotéticas

actividades de aquel y estos son muy diferentes; cuarto, que de acuerdo a todos los estudios transcriptómicos realizados en este trabajo, los operones *SMa0953/50* y *SMa0956-SMa0958-SMa0959-rctC* parecen ser los únicos directamente regulados por RctR. Todo ello ha de unirse al hecho de que en varios otros ejemplos de reguladores tipo GntR, los genes controlados por el regulador transcripcional participan en el metabolismo del ligando que, tras unirse al dominio FCD, determina la actividad del dominio HTH del regulador transcripcional (Rigali *et al.*, 2002). Por tanto, aunando el modo de acción aceptado para los reguladores tipo GntR y nuestros resultados, proponemos un modelo de la cascada de señalización que llevaría a la desrepresión de las funciones de la transferencia conjugativa del pSym en *S. meliloti* (Figura 2.16)



**Figura 2.16. Modelo propuesto para la regulación de transferencia conjugativa de los plásmidos simbióticos de *S. meliloti*.** +, activación; -, represión o inhibición. A) bajo condiciones no favorables (medios de laboratorio estándar), RctA mantiene reprimidos los genes de la transferencia conjugativa en ambos pSyms, mientras que RctR mantiene reprimidos a los operones *SMa0953/50* y *SMa0956-58-59-rctC* y por tanto *rctB* permanece inactivo. B) La conjugación se logra por acción de un compuesto ambiental desconocido, supuestamente importado por el transportador ABC codificado por *SMa0953/50* que tras ser modificado por los productos de *SMa0956-58-59*, se uniría a RctR inhibiendo su actividad represora, activándose así la transcripción de *rctC*, lo que permitiría la expresión del gen *rctB* para contrarrestar la acción del represor RctA.

En este modelo, el operón *SMa0953/50* (que codifica un transportador ABC y una proteína periplásmica de unión a ligando) estaría involucrado en la importación de un componente extracelular desconocido, el cual podría subsecuentemente ser modificado por la acción de los genes *SMa0956-SMa0958-SMa0959* para producir el componente que se uniría a RctR. La unión de RctR a este supuesto compuesto inhibiría su actividad represora, activándose la transcripción del operón *SMa0956-SMa0958-SMa0959-rctC*. La expresión de RctC llevaría al aumento de la transcripción de *rctB*, el evento clave que hasta ahora conocemos, necesario para antagonizar la represión que *rctA* ejerce sobre la transcripción de los genes conjugativos en ambos pSymA y pSymB.

Existen homólogos de los operones *SMa0953/50* and *SMa0956-SMa0958-SMa0959-rctC*, así como del gen *rctR*, en plásmidos de rizobios como el pNGR234b y en el plásmido de *Agrobacterium* pATC58, pero están ausentes en el genoma de *R. etli*. Esto indica que la clave en la activación de *rctB* para antagonizar la represión de *rctA* se debe de llevar a cabo a través de diferentes cascadas de señalización en distintos plásmidos tipo RctA. Será muy interesante averiguar si estas diferencias genéticas reflejan la posibilidad de que la conjugación de los distintos plásmidos de tipo RctA pueda también proceder en respuesta a diferentes tipos de señales o condiciones ambientales.

Además de los nuevos genes reguladores identificados, se estudiaron también los genes *SMa0941* y *SMa0907*. Ambos genes aparecieron diferencialmente expresados en los estudios del transcriptoma de las cepas 1021RctA<sup>-</sup> y 1021(pTE3-SmrctB) en el caso de *SMa0941*, o de 1021(pTE3-SmrctB) en el caso de *SMa0907*.

Según las bases de datos consultadas, el gen *SMa0941* codifica para una hipotética proteína con un dominio REC, relacionado con receptores de señales transducidas mediante reacciones de fosforilación/defosforilación en sistemas reguladores de dos componentes, muy abundantes en bacterias y otros organismos superiores (Wolanin *et al.*, 2002). No obstante, *SMa0941* no contiene un dominio de unión a DNA, lo que indica que no tiene una participación directa en la regulación transcripcional de hipotéticos genes diana. Se han descrito reguladores RR que no interaccionan directamente con los genes que regulan. Este es el caso de CheY, paradigma de la familia de reguladores de respuesta en sistemas de señalización de dos componentes. CheY recibe la señal desde el elemento sensor, CheA, que es una histidina quinasa. La transducción de señales implica la transferencia de un grupo fosfato desde CheA autofosforilada hasta CheY (Wolanin *et al.*, 2003). CheY fosforilado

interacciona con FliM, un componente del complejo del motor flagelar, controlando así la dirección de rotación del flagelo. Muchos otros miembros de esta familia de reguladores de respuesta contienen un dominio de CheY receptor que a menudo se encuentra asociado a un dominio efector de unión a ADN.

*SMa0941* se encuentra asociado a un hipotético sistema de regulación de dos componentes formado por los genes adyacentes *SMa0940*, que codificaría un regulador de respuesta, y *SMa0939* que codificaría para una histidina quinasa. Mediante un análisis por PCR a tiempo real, se corroboró que el gen *SMa0941* se activaba en ausencia del gen *rctA* y con la sobreexpresión del gen *SmrctB* en comparación con los niveles de expresión de la cepa silvestre. No obstante, no fue posible obtener una construcción genética que sobreexpresase *SMa0941* solo o en compañía de los genes *SMa0939-SMa0940*, lo que hubiese podido arrojar luz sobre su posible implicación en la regulación de la transferencia conjugativa de pSymA. No obstante, pudo comprobarse que la ausencia de *SMa0941* no tuvo ningún efecto sobre la transferencia de pSymA desde una cepa silvestre o desde un mutante *RctA*<sup>-</sup>. Tampoco pudo observarse ningún tipo de efecto por la sobreexpresión de los genes *SMa0939-SMa0940*. Así pues, la única relación del gen *SMa0941* con el proceso de transferencia conjugativa, constatada hasta el momento, es que su expresión se encuentra elevada cuando se dan condiciones para la transferencia de pSymA, esto es, en mutantes *rctA* o cuando *SmrctB* se encuentra sobreexpresado.

Por su parte, el gen *SMa0907*, cuya expresión se vió aumentada cuando se sobreexpresaba el gen *SmrctB*, codifica para una hipotética proteína que posee un dominio DUF1173 (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF06666>) de función desconocida, caracterizado por la presencia de tres residuos cisteína conservados en el extremo N-terminal. Diversas proteínas hipotéticas homólogas al producto de *SMa0907* se encuentran muy conservadas en muchas proteobacterias, incluidos rizobios, como es el caso de RHE\_PD00156 del plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42, localizado muy próximo a los genes *vir* implicados en la transferencia conjugativa de dicho plásmido. Se observó que en un mutante en el gen *SMa0907* la tasa de transferencia promovida por la sobreexpresión de *SmrctB* disminuye un orden de magnitud, lo que sugiere que aunque no es un gen imprescindible para la transferencia, podría ser importante para la eficiencia del sistema.

Seguramente existen varios genes más implicados en la regulación y eficiencia de la transferencia de pSymA (e indirectamente de pSymB) de *S. meliloti* 1021. La dificultad de

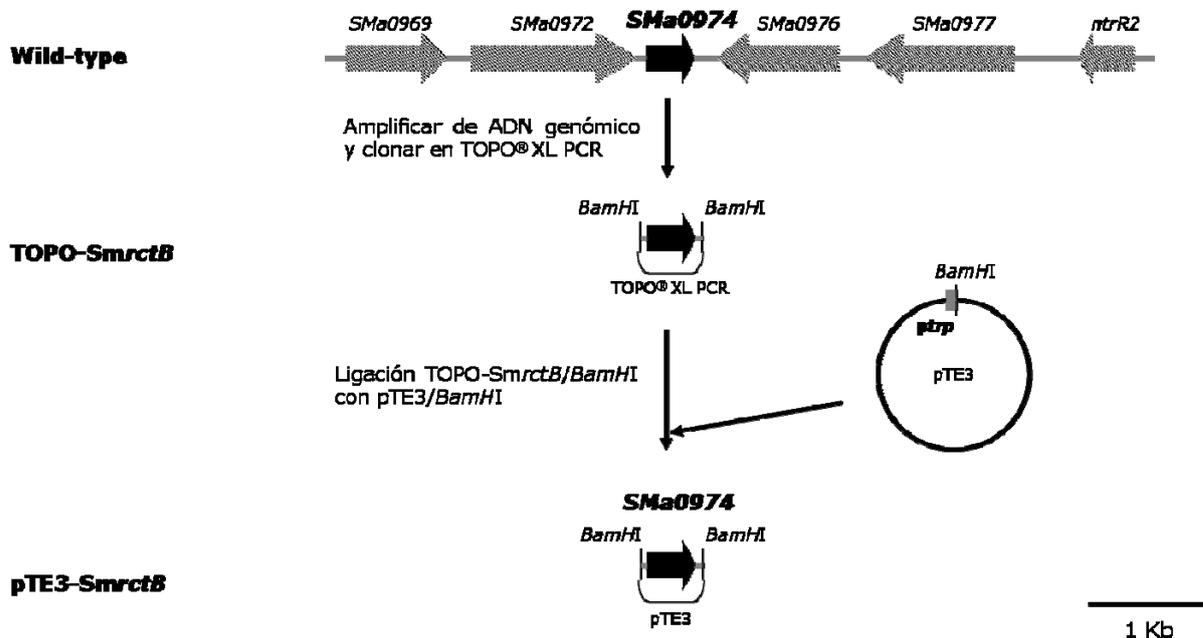
identificarlos en algunos casos estriba en que, dado que se trata de un sistema que normalmente se encuentra reprimido, hasta el momento para poder observar la transferencia de estos plásmidos es necesario alterar primero su regulación. Esto implica una alteración del sistema que, como se ha discutido anteriormente para los genes *SMa0953/50* y *SMa0956-SMa0958-SMa0959*, puede llevar a enmascarar la importancia de otros elementos participantes. Esta labor identificativa se verá facilitada cuando sea posible cuantificar la transferencia de estos plásmidos sin necesidad de modificar genéticamente a las bacterias donadoras. Para ello será muy importante identificar primero las condiciones ambientales, señales químicas o de otro tipo que promueven la desrepresión de este sistema conjugativo. La identificación de varios de los componentes importantes del sistema de transducción de señales que participan en dicha desrepresión, supone un paso importante hacia la futura búsqueda e identificación de dichas señales. Queda también abierta la cuestión de si en otros plásmidos de tipo RctA, como el pSym de *R. etli*, existe un sistema de transducción de señales análogo al identificado en esta tesis, y si en todo caso las diferencias observadas con el pSymA de *S. meliloti* pueden significar que ambos plásmidos activan sus funciones conjugativas en respuesta a diferentes o similares señales y condiciones ambientales.

## **ANEXO CAPÍTULO II**



### Anexo 2.1. Construcción de pTE3-SmrctB

Para obtener la construcción pTE3-SmrctB, el gen *SMa0974* (*SmrctB*) se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores SmrctB.f (5'-ATAGGATCCACAGGACTCTCAGCC-3') y SmrctB.r (5'-AAAGGATCCCACGCTTGAAACGGC-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *Bam*HI (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 430 pb se clonó en el vector TOPO® XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-SmrctB. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de TOPO-SmrctB se aisló tras someter el plásmido a digestión *Bam*HI y se subclonó en el vector pTE3 previamente digerido con la misma enzima de restricción. El plásmido resultante, pTE3-SmrctB, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.



### Anexo 2.2. Construcción de pTE3-0941 y pTE3-0939/41

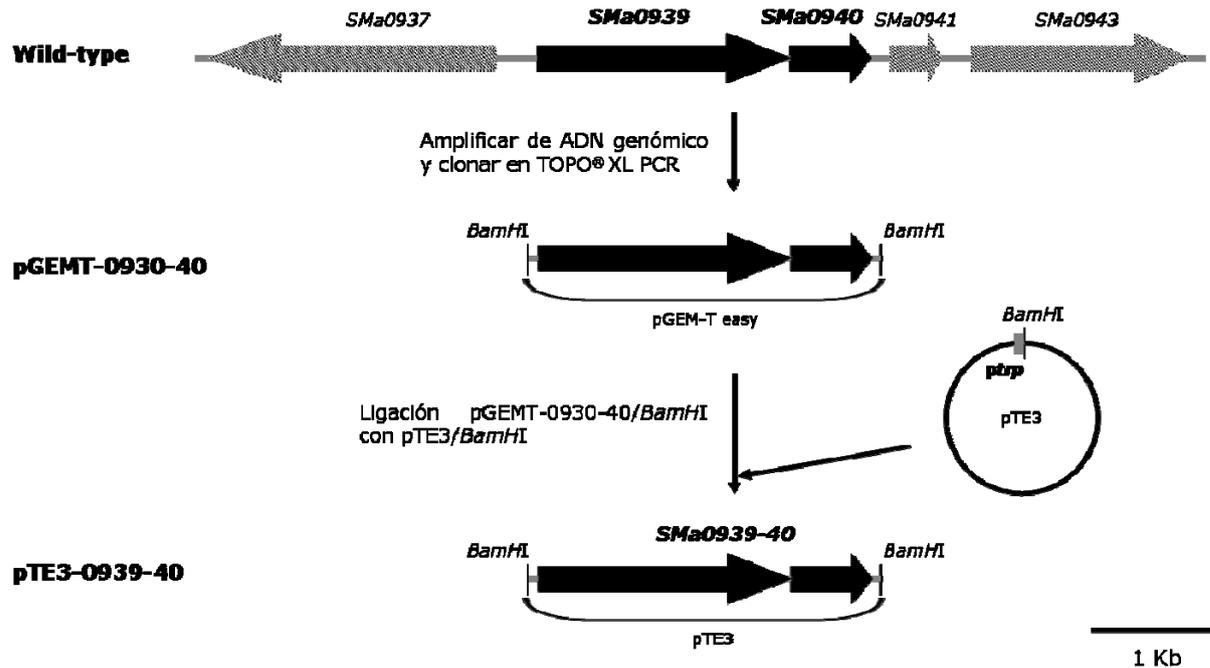
Para obtener la construcción pTE3-0941, el gen *SMa0941* se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores *SMa0941f* (5'-ATGGATCCAGCACTGGAAAGG-3') y *SMa0941r* (5'-ATGGATCC TATGCGGGTAGACC -3'), en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima de restricción *Bam*HI (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior.

Para la obtención de la pTE3-0939-41, los genes *SMa0939*, *SMa0940* y *SMa0941* se amplificaron a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores *SMa0939-41.F* (5'-AGGGCAACCGACGAAGTA-3') y *SMa0939-41.R* (5'-TTTCTTCTCCCTGATTGC-3').

Los correspondientes productos de amplificación de 431 pb y 3,33 Kb se intentaron clonar en distintos vectores de clonación (pGEM-T easy, TOPO<sup>®</sup> XL PCR) sin resultado alguno.

### Anexo 2.3. Construcción de pTE3-0939-40

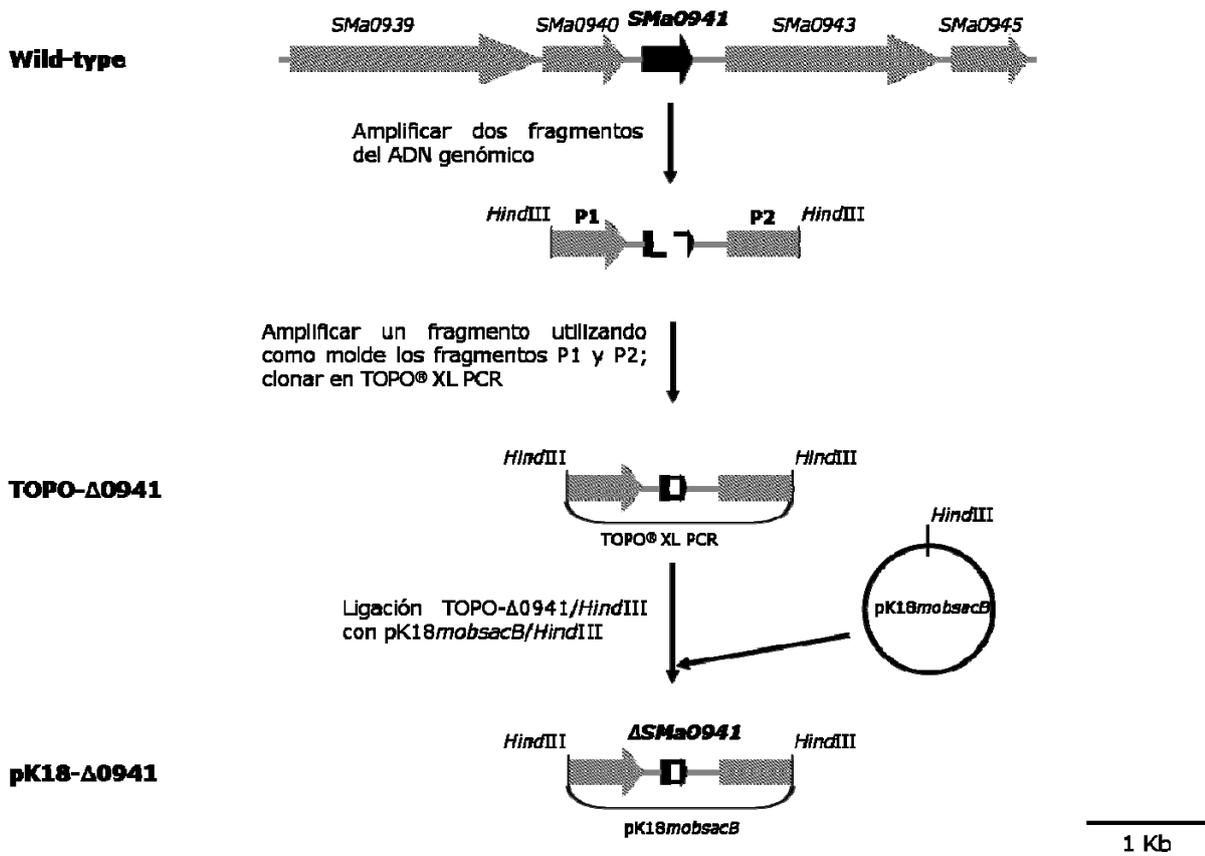
Para obtener la construcción pTE3-0939-40, los genes *SMa0939* y *SMa0940* se amplificaron a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores *SMa0939-40f* (5'-ATGGATCCAGAAAGCGTTCCTCG-3') y *SMa0939-40r* (5'-ATGGATCCACGAATGTGAAGGC-3') en los que se incluyó la secuencia de reconociendo del enzima de restricción *Bam*HI (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 2,58 Kb se clonó en el vector pGEM-T easy dando lugar a pGEMT-0939-40. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de pGEMT-0939-40 se aisló tras someter el plásmido a digestión *Bam*HI y se subclonó en el vector pTE3 previamente digerido con la misma enzima de restricción. El plásmido resultante, pTE3-0939-40, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a las cepas 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup>. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm, Spc y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.



#### Anexo 2.4. Construcción de un mutante en el gen *SMA0941* de *S. meliloti* 1021

Para obtener una versión deletada de *SMA0941* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa *S. meliloti* 1021 dos productos: utilizando los cebadores  $\Delta$ *SMA0941.1* (5'- AAAAAGCTT ATCGAGTCCTACTCATCTGG-3', *Hind*III) y  $\Delta$ *SMA0941.2* (5'- GCAGCAATCAACGACCTCAAACCACAGG-3') se obtuvo el producto P1 de 744 pb que contiene secuencias adyacente al extremo 5' del gen *SMA0941*; con los cebadores  $\Delta$ *SMA0941.3* (5'- CCTGTGGTTTGAGGTCGTTGATTGCTGC-3') y  $\Delta$ *SMA0941.4* (5'-AAAAAGCTTTGAGGTGATAGAGATTGCCG-3', *Hind*III) se obtuvo el producto P2 de 808 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' del gen *SMA0941*. A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos P1 y P2 y los cebadores  $\Delta$ *SMA0941.1* y  $\Delta$ *SMA0941.4*, se obtuvo un producto de fusión de 1,55 Kb en el que el gen *SMA0941* de 384 pb ha sufrido una deleción de 240 pb. El producto de PCR generado de 1,55 Kb se clonó en TOPO<sup>®</sup> XL PCR dando lugar al plásmido TOPO- $\Delta$ 0941. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia resultado de errores de la polimerasa. Utilizando los sitios *Hind*III incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión deletada, el inserto de 1,55 Kb se subclonó en el vector suicida *pK18mobsacB* digerido *Hind*III. La construcción resultante se denominó *pK18- $\Delta$ 0941* que se

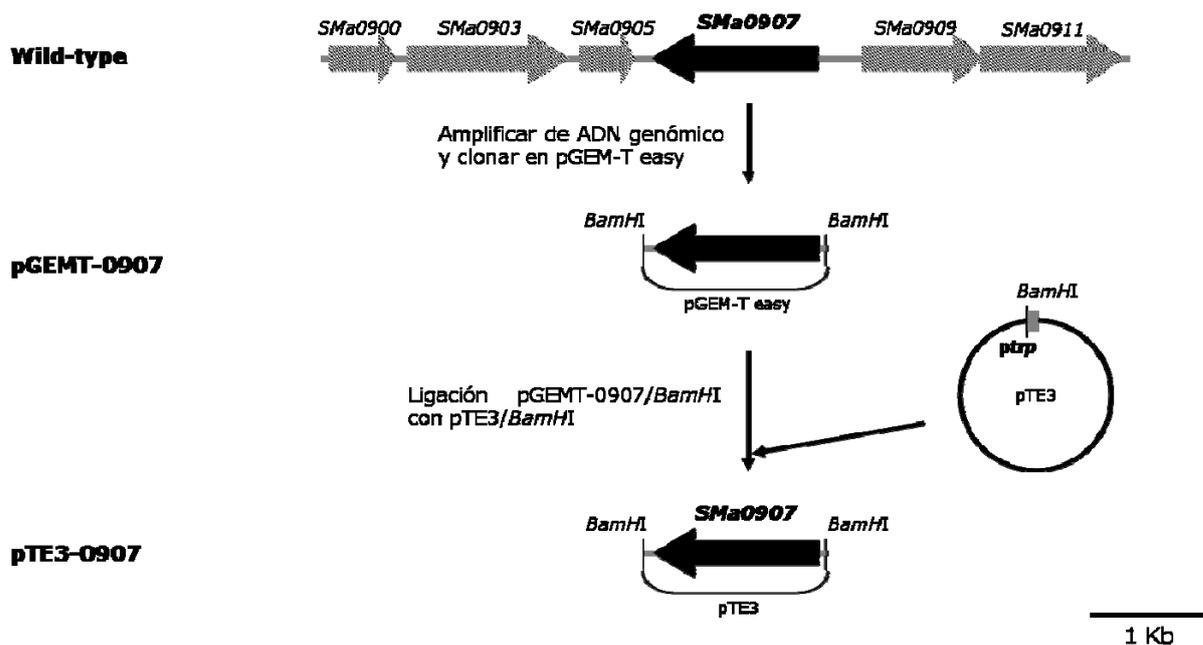
transfirió por conjugación biparental a las cepas de *S. meliloti*: 100TSS y 1021RctA<sup>-</sup> para la obtención de mutantes en el gen *SMa0941* mediante intercambio alélico. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no pudo replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes Km sensibles en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. El vector pK18*mobsacB* permite una selección adicional basada en la sensibilidad a sacarosa que confiere la presencia de gen *sacB* (Schäfer et al. 1994).



La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Pst*I utilizando como sonda la región amplificada P1 de 744 pb marcada con digoxigenina. En las cepas que contienen la versión intacta de *SMa0941*, la sonda hibrida en dos fragmentos *Pst*I de 730 pb y 162 pb, mientras que en los mutantes los fragmentos *Pst*I son de 476 pb y 162 pb por efecto de la delección de 254 pb.

### Anexo 2.5. Construcción de pTE3-0907

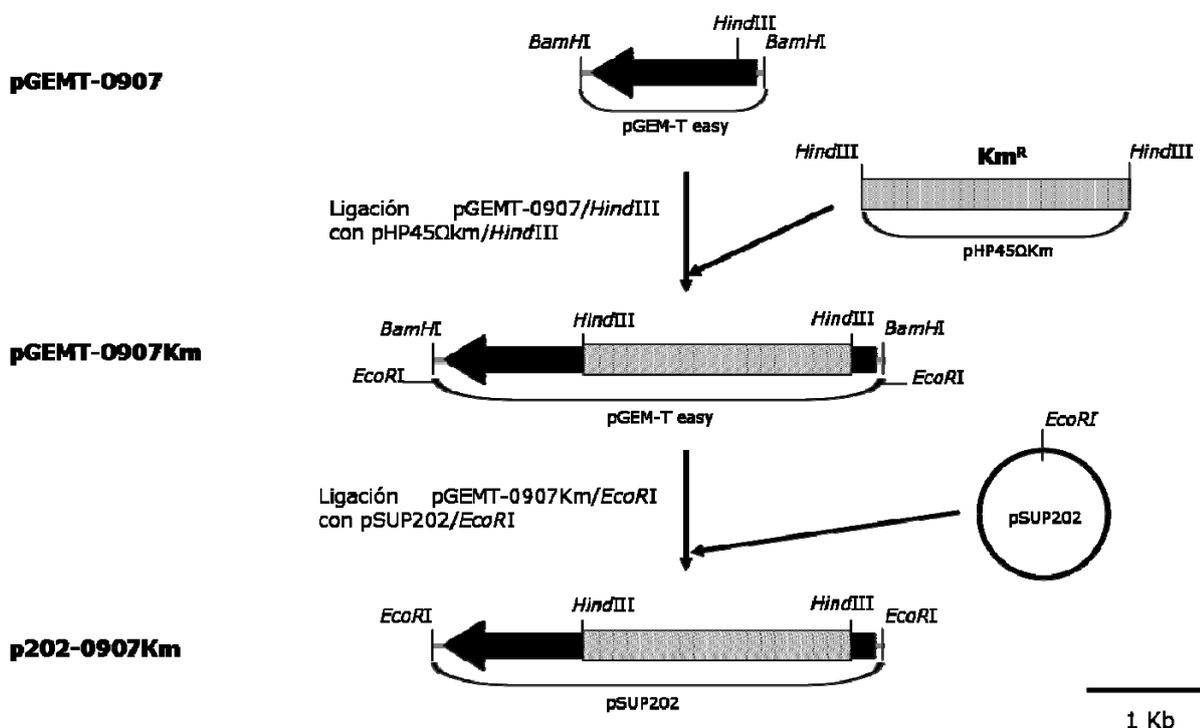
Para obtener la construcción pTE3-0907, el gen *SMa0907* se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores *SMa0907.f* (5'-TTTGGATCCAAGGATAGATGCCAAGAGCC-3') y *SMa0907.r* (5'-TTTGGATCCGTGTTCTTATCGTCTCGCCC-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *Bam*HI (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 1,33 Kb se clonó en el vector pGEM-T easy dando lugar al plásmido pGEMT-0907. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de pGEMT-0907 se aisló tras someter el plásmido a digestión *Bam*HI y se subclonó en el vector pTE3 previamente digerido con la misma enzima de restricción.



El plásmido resultante, pTE3-0907, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.

### Anexo 2.6. Construcción de un mutante en el gen *SMa0907* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se digirió el plásmido pGEMT-0907 (Anexo 2.5) con la enzima de restricción *Hind*III y se ligó con un gen de resistencia a Km que se obtuvo a partir de la digestión con *Hind*III del vector pHP45Ω, obteniéndose el plásmido pGEMT-0907Km. Este plásmido fue digerido con *Eco*RI y el fragmento de 3,63 Kb se subclonó en el plásmido suicida pSUP202 digerido con *Eco*RI. El plásmido resultante p202-0907Km, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021, obteniéndose el mutante 1021*SMa0907*.

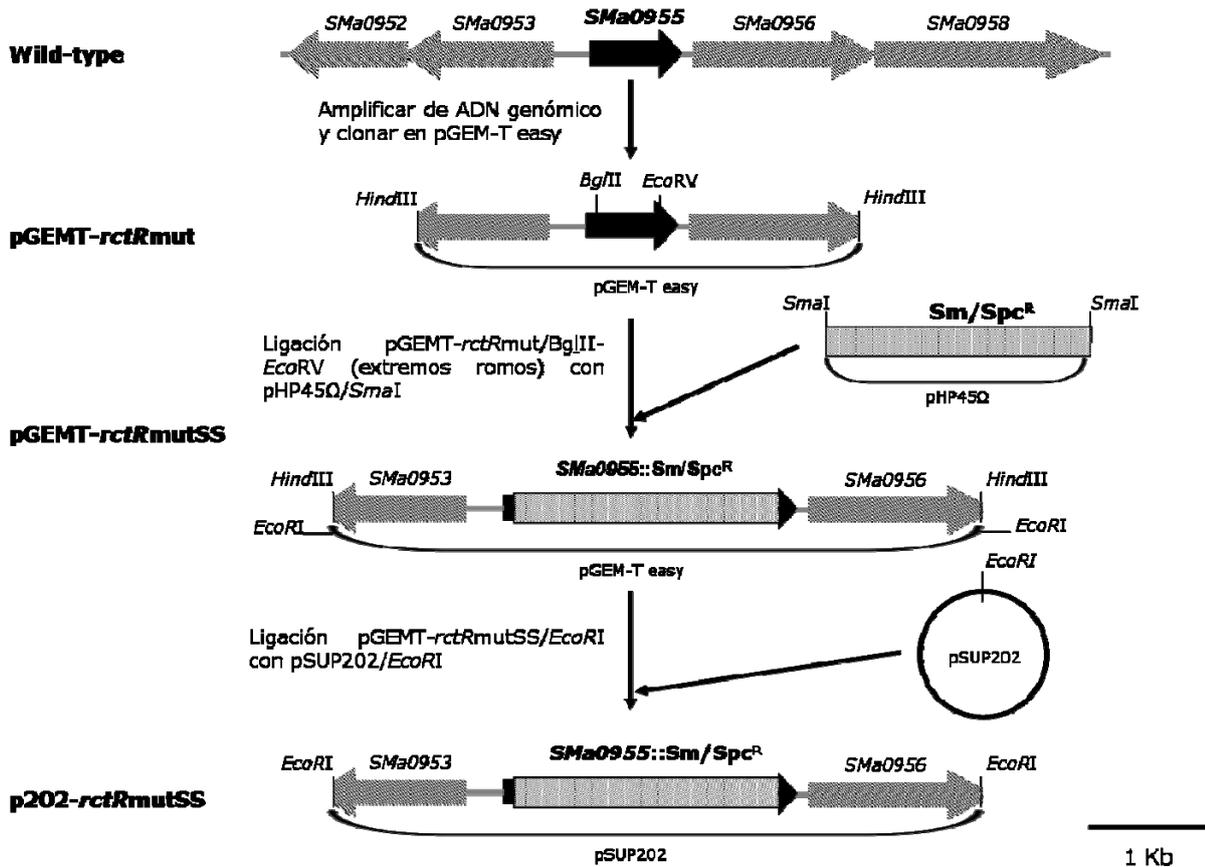


La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Eco*RI utilizando como sonda el plásmido p202-0907Km digerido con *Eco*RI marcada con digoxigenina. En las cepas que contienen la versión intacta del gen *SMa0907*, la sonda hibrida con un fragmento *Eco*RI de unas 10 Kb, mientras que en los mutantes pasa a ser de 12,3 Kb por efecto de la inserción del gen de resistencia a Km de 2,3 Kb.

**Anexo 2.7. Construcción de un mutante en el gen *SMa0955 (rctR)* de *S. meliloti* 1021**

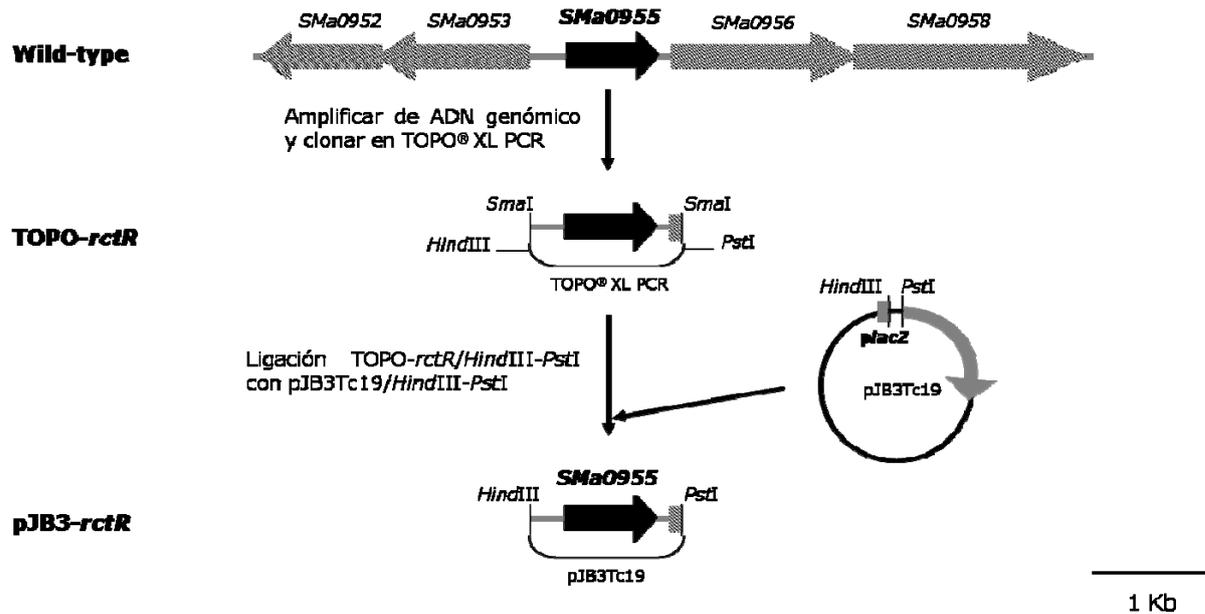
Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 3,275 pb que contenía el gen *SMa0955 (rctR)*, mediante el uso de los cebadores *rctRmut.1* (5'-TTTAAGCTTTGTCGAACCGATGAACACCG-3') y *rctRmut.2* (5'-TTTAAGCTTATAGGGTAGAAGAATGCCCG-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *HindIII* (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El producto de PCR generado se clonó en el vector pGEMT-easy dando lugar al plásmido pGEMT-*rctRmut*. Posteriormente, un fragmento *BglIII/EcoRV* de 619 pb que incluía gran parte del gen *rctR*, se sustituyó por un gen de resistencia a Sm/Spc que se obtuvo a partir del vector pHP45Ω, digiriendo *SmaI* y purificando la banda correspondiente al gen de resistencia. De este modo se obtuvo la construcción pGEMT-*rctRmutSS* que se utilizó para recuperar el inserto mediante digestión *EcoRI*. El fragmento de ADN aislado se subclonó en el plásmido suicida pSUP202 digerido también con *EcoRI*. La construcción resultante p202-*rctRmutSS*, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021, obteniéndose el mutante 1021RctR.

La mutación se verificó en los transconjugantes obtenidos mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* utilizando como sonda el plásmido p202-*rctRmutSS* marcado con digoxigenina. La sonda hibrida con dos fragmentos de 7,09 Kb y 1,8 Kb del genoma de *S. meliloti* 1021, y en los mutantes pasa a hibridar en un solo fragmento *EcoRI* de 8,89 Kb por efecto de la delección de 619 pb del gen *rctR* e inserción del gen de resistencia a Sm/Spc.



### Anexo 2.8. Construcción de pJB3-rctR

Para obtener la construcción pJB3-rctR, el gen *SMa0955* (*rctR*) se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores *rctR.f* (5'-AAACCCGGGGCTGCTGGACGCTCTTCG-3') y *rctR.r* (5'-AAACCCGGGTAGATGCTTGGACCTACTG-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *SmaI* (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 1,12 Kb se clonó en el vector TOPO<sup>®</sup> XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-rctR. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de TOPO-rctR se aisló tras someter el plásmido a digestión *HindIII/PstI* y se subclonó en el vector pJB3Tc19 previamente digerido con la misma enzima de restricción.

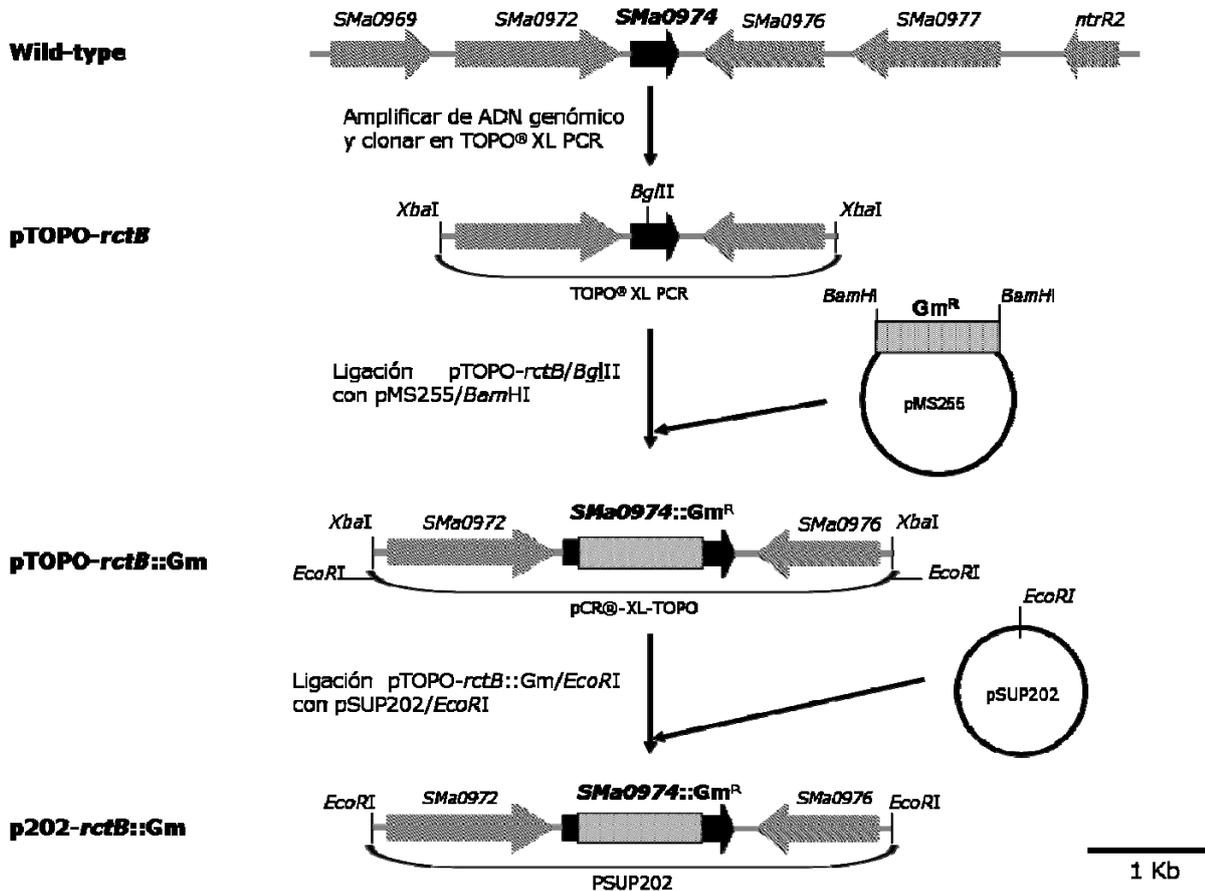


El plásmido resultante, pJB3-*rctR*, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021Rct<sup>R</sup>. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm, Spc y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.

### Anexo 2.9. Construcción de un mutante en el gen *SMA0974* (*SmrctB*) de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 2,88 Kb que contenía el gen *SMA0974* (*SmrctB*), mediante el uso de los cebadores *rctB.f.up* (5'-AATTCTAGAAGTTCGGCGACAAACG-3') y *rctB.r.down* (5'-AATTCTAGATTGATCACCATGTCGC-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento de la enzima *XbaI* (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El producto de PCR generado se clonó en el vector TOPO® XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-*rctB*, que se digirió posteriormente con *BglII* y se insertó el gen *aacC1* (Gentamicina, Gm<sup>R</sup>) digerido con *BamHI*, obteniéndose la construcción pTOPO-*rctB*::Gm. Este plásmido fue digerido con *EcoRI* y el fragmento Gm<sup>R</sup> de 2,93 Kb, que contiene el gen *SmrctB* interrumpido con un gen de resistencia a Gm, se subclonó en el plásmido suicida pSUP202 digerido también con *EcoRI*. El plásmido resultante p202-*rctB*::Gm, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de

*E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose el mutante 1021RctRQ1.



La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Pst*I utilizando como sonda el plásmido pSUP202-*rctB*::Gm digerida con *Eco*RI marcada con digoxigenina. En las cepas que contienen la versión intacta del gen *SmrctB*, la sonda hibrida con un fragmento *Pst*I de unas 1,199 pb, mientras que en los mutantes pasa a ser de 2,19 Kb por efecto de la inserción del gen de resistencia a Gm de 994 pb.

**Anexo 2.10. Construcción de un mutante en el operón SMA0950-SMA0951-SMA0952-SMA0953 de *S. meliloti* 1021, por delección mediante PCR solapante.**

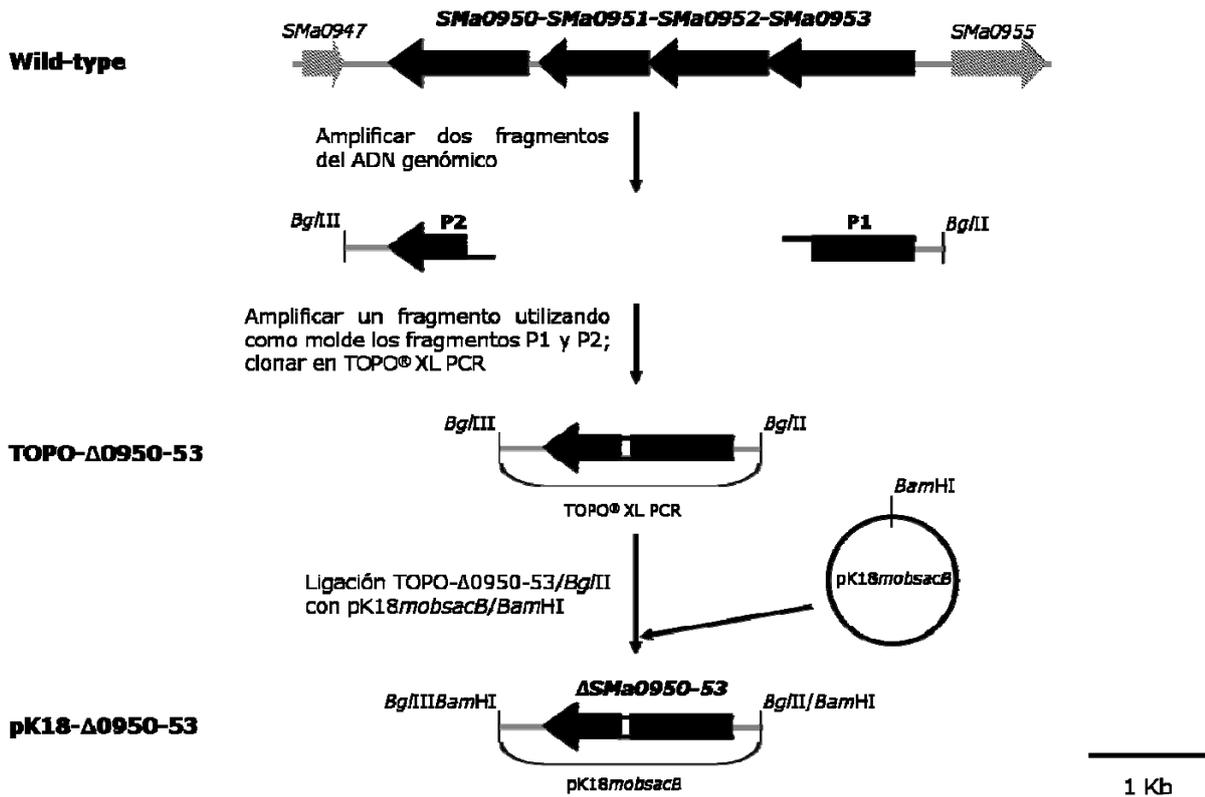
La versión delecionada de los distintos genes se han obtenido fusionando, mediante reacción de PCR, dos amplicones solapantes, correspondientes al ADN que flanquea a

izquierda y derecha la delección, metodología basada en Ho y colaboradores (1989) y Griffiths y colaboradores (2008) (ver Material y Métodos).

Para obtener una versión deleccionada (4,4 Kb) del operón *SMa0950-SMa0951-SMa0952-SMa0953* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* dos productos: utilizando los cebadores attAop1 (5'-AAAAGATCTTCGCATCAACGACTACTAGC-3', *Bg*III) y attAop2 (5'-CGTGTCCCACATATAACGTTTGCTCAGC-3') se obtuvo un fragmento (P1) de 978 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 5' del gen *SMa0953*; con los cebadores attAop3 (5'-GCTGAGCAAACGGTATATGTGGGACACG-3') y attAop4 (5'-AAAAGATCTCAACCTTATCGACGACAAGG-3', *Bg*III) se obtuvo un fragmento (P2) de 911 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' del gen *SMa0950*. A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos P1 y P2 y los cebadores attAop1 y attAop4, se obtuvo un producto de fusión de 1,88 Kb en el que se ha producido la delección del operón *SMa0950-53*.

El producto de PCR generado de 1,88 Kb se clonó en TOPO<sup>®</sup> XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-Δ0950-53. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia resultado de errores de la polimerasa. Utilizando los sitios *Bg*III incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión deleccionada, el inserto de 1,88 Kb se subclonó en el vector suicida pK18*mobsacB* digerido con *Bam*HI. La construcción resultante se denominó pK18-Δ0950-53 que se transfirió por conjugación biparental a las cepas 10OTSS y 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose los mutantes 1021OTSSQ3 y 1021RctRQ3, respectivamente. Los eventos de reemplazamiento alélico en el operón *SMa0950-53* se seleccionaron como se ha descrito para los mutantes *SMa0941* y *SMa0956-59*.

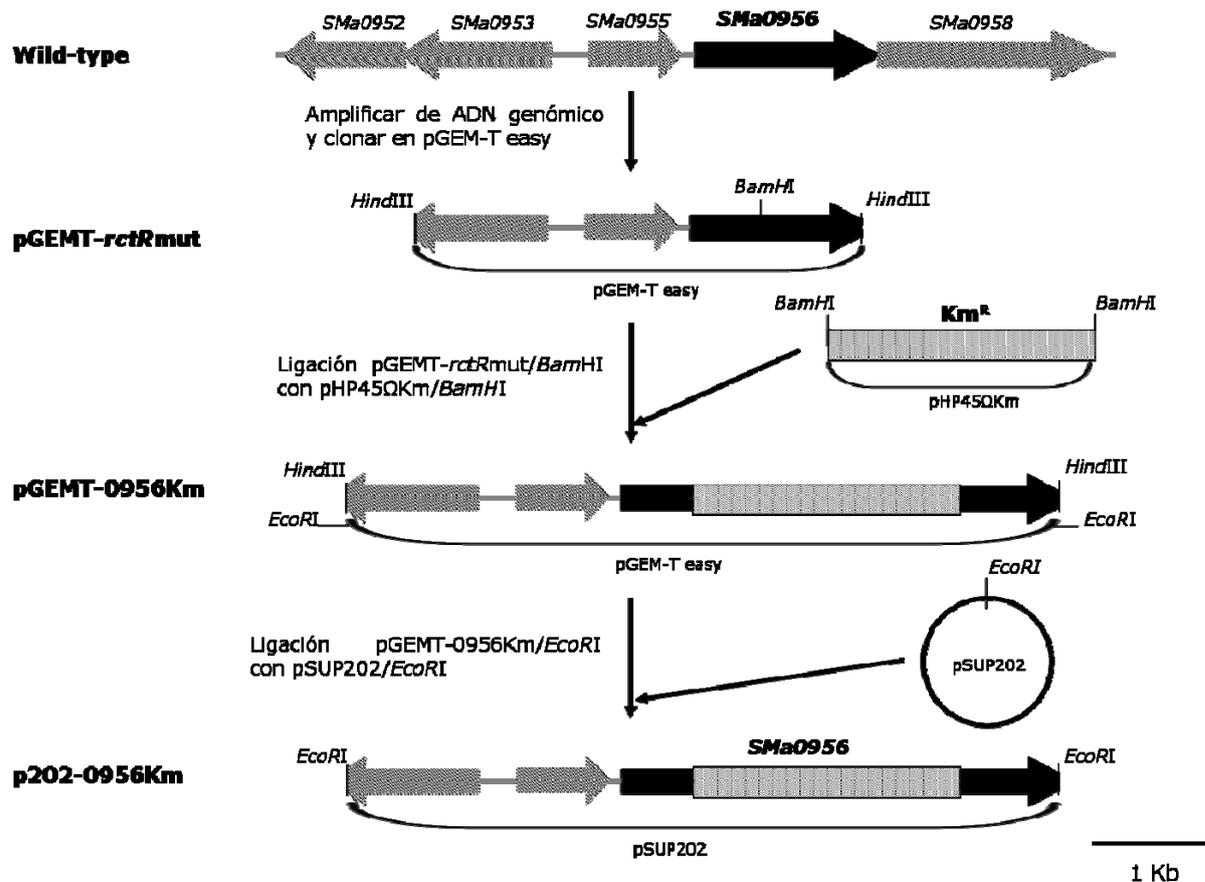
La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Hind*III utilizando como sonda el fragmento amplificado P2 de 911 pb marcado con digoxigenina. En las cepas que contienen la versión intacta del operón *SMa0950-SMa0951-SMa0952-SMa0953*, la sonda hibrida con un fragmento *Hind*III de una 4,65 Kb, mientras que en los mutantes 102OTSSQ3 pasa a ser de 7,18 Kb por efecto de la delección de 2,61 Kb y en los mutantes 1021RctRQ3 pasa a ser un fragmento *Hind*III de 3,62 Kb.



### Anexo 2.11. Construcción de un mutante en el gen *SMa0956* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se digirió el plásmido pGEMT-*rctR*mut (Anexo 2.2.3) con la enzima de restricción *Bam*HI y se insertó un gen de resistencia a Km que se obtuvo a partir del vector pHP45Ω, digiriendo *Bam*HI y purificando la banda correspondiente al gen de resistencia. El plásmido resultante pGEMT-0956Km se digirió con *Eco*RI y el fragmento de 3,817 pb que contenía el gen *SMa0956* con el gen de resistencia a Km se subclonó en el plásmido suicida pSUP202 digerido con *Eco*RI. El plásmido resultante p202-0956Km, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 1021RctR, obteniéndose el mutante 1021RctRQ2.

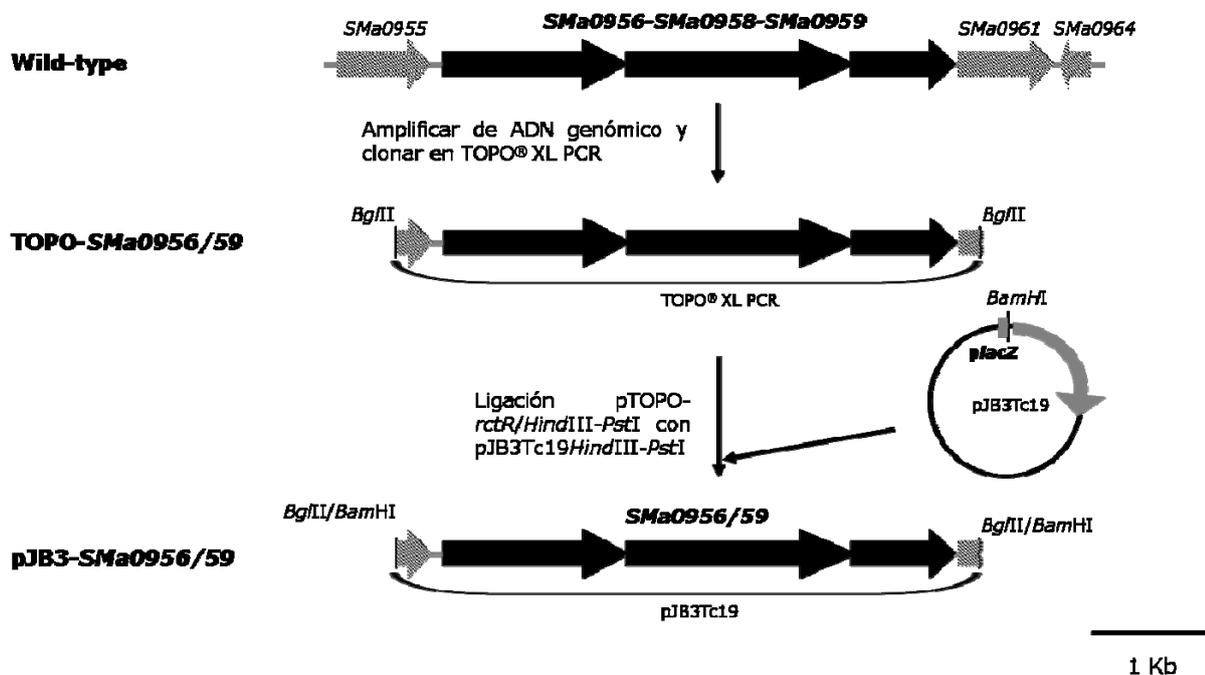
La mutación se verificó en los transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Eco*RI utilizando como sonda el vector p202-*rctR*mutSS digerido con *Eco*RI.



### Anexo 2.12. Construcción de pJB3-*SMA0956/59*

Para obtener la construcción pJB3-*SMA0956/59*, los genes *SMA0956*, *SMA0958* y *SMA0959* se amplificó un fragmento de 4,38 Kb a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti*, utilizando los cebadores atrBopr.f2 (5'-AAAAGATCTTTACGGTCTATCGTCTCG-3') y atrBopr.r2 (5'-AAAAGATCTCAACCAGGACAGCGAGCG-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *Bgl*III (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 4,38 Kb se clonó en el vector TOPO<sup>®</sup> XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-*SMA0956/59*. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de TOPO-*SMA0956/59* se aisló tras someter el plásmido a digestión *Bgl*III y se subclonó en el vector pJB3Tc19 previamente digerido con *Bam*HI. El plásmido resultante, pJB3-*SMA0956/59*, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa

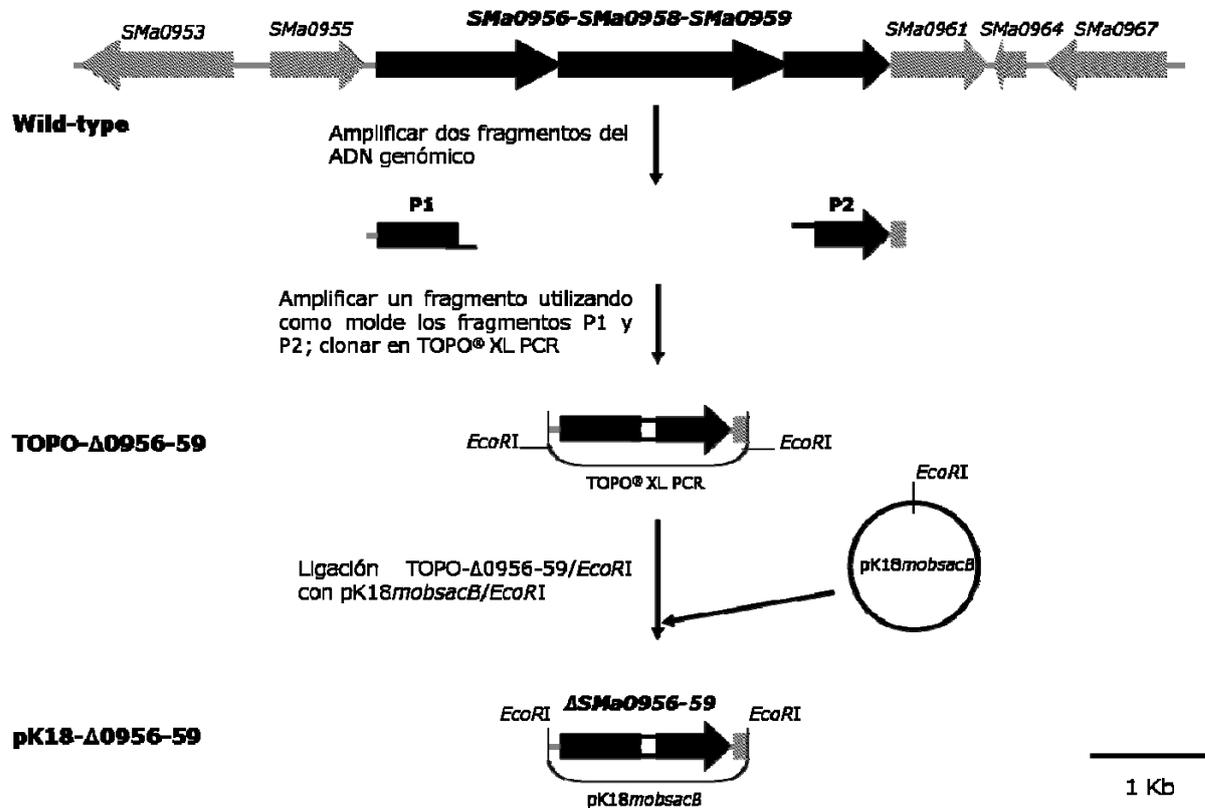
1021RctRQ2. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm, Spc y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.



### Anexo 2.13. Construcción de un mutante en los genes *SMA0956*, *SMA0958* y *SMA0959* de *S. meliloti* 1021, por delección mediante PCR solapante.

Para obtener una versión delecionada de los genes *SMA0956-SMA0958-SMA0959* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* dos productos: utilizando los cebadores atrBC59.1 (5'-TTTGTTGCGTGGACTTGACG-3') y atrBC59.2 (5'-CCGAAAGAAGGACGTGAAGCGAAGCAGG-3') se obtuvo el producto P1 de 696 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 5' del gen *SMA0956*; con los cebadores atrBC59.3 (5'-CCTGCTTCGCTTCACGTCCTTCTTTCGG-3') y atrBC59.4 (5'-CAGTTCGCTCACATCGGAGC-3') se obtuvo el producto P2 de 692 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' gen *SMA0959*. A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos P1 y P2 y los cebadores atrBC59.1 y atrBC59.4, se obtuvo un producto de fusión de 1,38 pb en el que ha habido una delección de los genes *SMA0956*, *SMA0958* y *SMA0959*. El producto de PCR generado de 1,38 Kb se clonó en TOPO® XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-Δ0956-59. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían

alteraciones en la secuencia resultado de errores de la polimerasa. La construcción TOPO- $\Delta$ 0956-59 se utilizó para recuperar el inserto *EcoRI*.



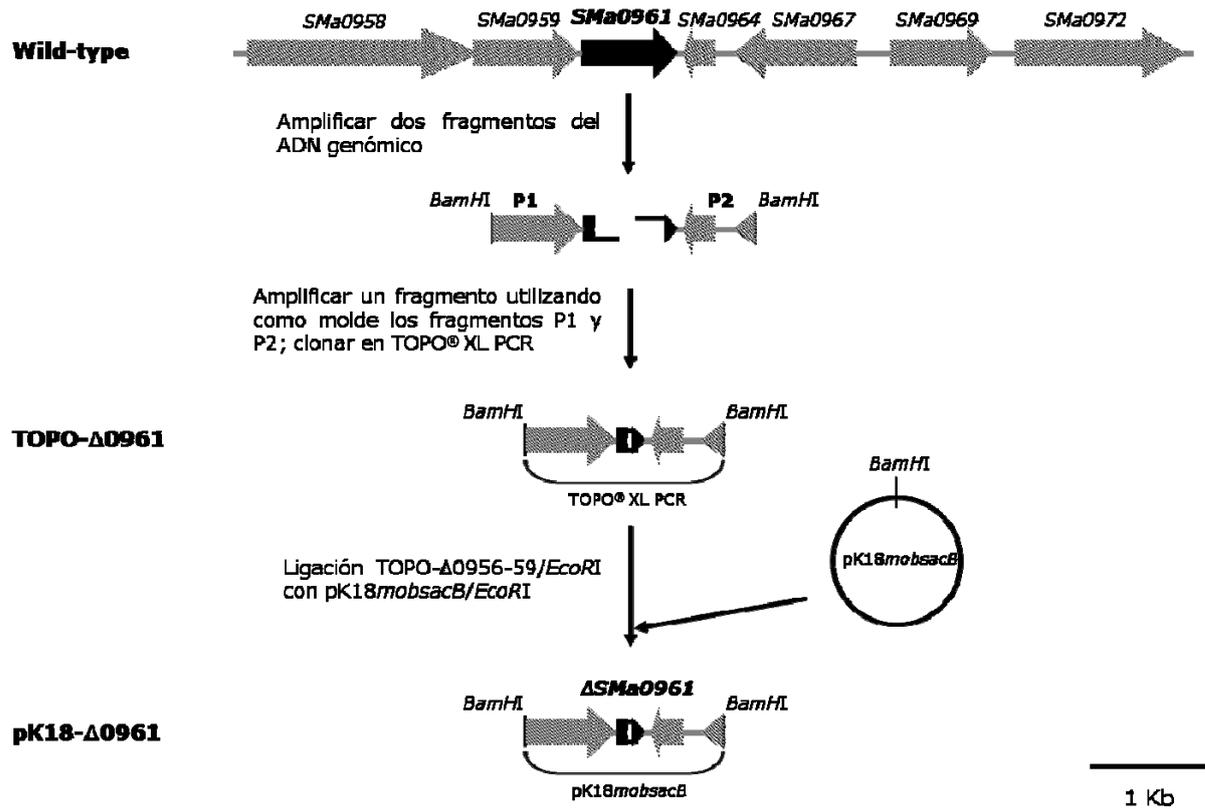
El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pK18*mobsacB* y la nueva construcción se denominó pK18- $\Delta$ 0956-59, que se utilizó para la obtención de un mutante delecionado en los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959* mediante intercambio alélico. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no pudo replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes Km sensibles en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. El vector pK18*mobsacB* permite una selección adicional basada en la sensibilidad a sacarosa que confiere la presencia de gen *sacB*.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Bam*HI utilizando como sonda el fragmento amplificado P2 de 692 pb marcado con digoxigenina. En las cepas que contienen la versión intacta de los genes *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959*, la sonda hibrida con un fragmento *Bam*HI de unas 5,2 Kb, mientras que en los mutantes pasa a ser de 2,5 Kb por efecto de la deleción de 2,7 Kb.

**Anexo 2.14. Construcción de un mutante en el gen *SMa0961* de *S. meliloti* 1021, por delección mediante PCR solapante.**

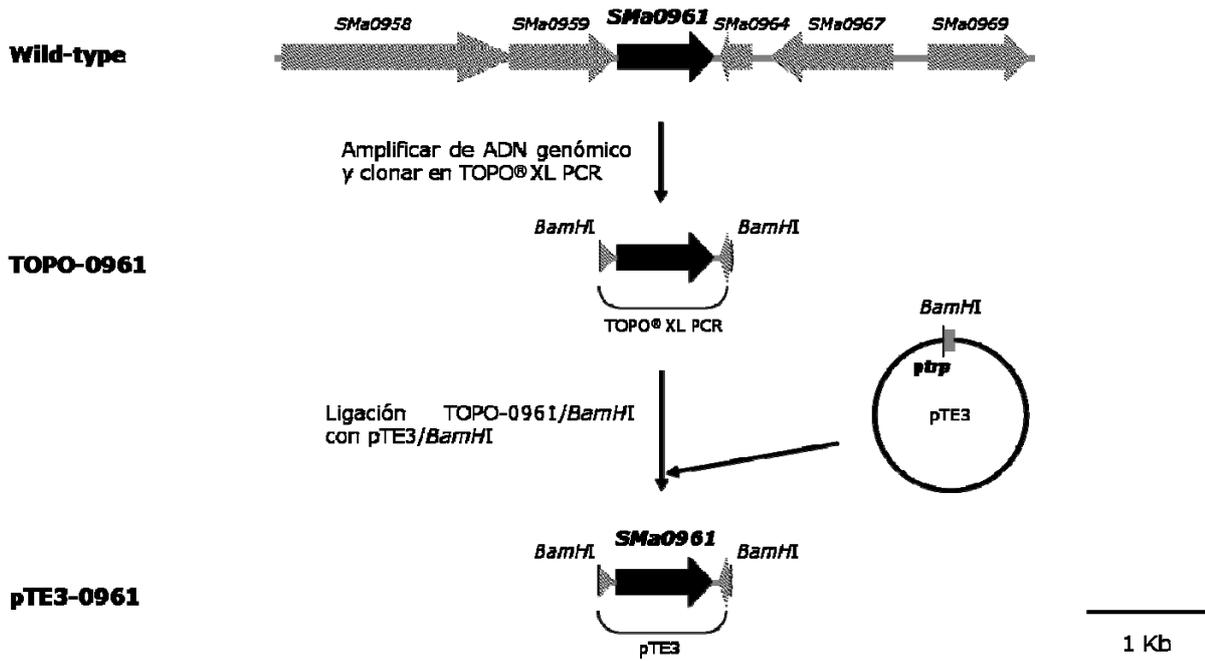
Para obtener una versión delecionada del gen *SMa0961* (*rctC*) en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* dos productos: utilizando los cebadores  $\Delta$ SMa0961.1 (5'-AAAGGATCCCCCATCAATGTTGAAAGCG-3', *Bam*HI) y  $\Delta$ SMa0961.2 (5'-CGGATAACATCAGGCGAGAATGTACTCG-3') se obtuvo el producto P1 de 745 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 5' del gen *SMa0961*; con los cebadores  $\Delta$ SMa0961.3 (5'-CGAGTACATTCTCGCCTGATGTTATCCG-3') y  $\Delta$ SMa0961.4 (5'-AAAGGATCCCGCATCAATATGTAGCGTGG-3', *Bam*HI) se obtuvo el producto P2 de 718 pb que contiene la secuencia adyacente al extremo 3' del gen *SMa0961*. A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos P1 y P2 y los cebadores  $\Delta$ SMa0961.1 y  $\Delta$ SMa0961.4, se obtuvo un producto de fusión de 1,4 Kb en el que el gen *SMa0961* de 723 pb ha sufrido una delección de 560 pb. El producto de PCR generado de 1,4 Kb se clonó en TOPO<sup>®</sup> XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-0961. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia resultado de errores de la polimerasa. Utilizando los sitios *Bam*HI incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión delecionada, el inserto de 1,4 Kb se subclonó en el vector suicida pK18*mo*sacB digerido *Bam*HI. La construcción resultante se denominó pK18-0961 que se transfirió por conjugación biparental a las cepas 10OTSS y 1021RctR<sup>-</sup>, obteniéndose los mutantes 10OTSSQ4 y 1021RctRQ4. Los eventos de reemplazamiento alélico en el gen *SMa0961* se seleccionaron como se ha descrito para los mutantes *SMa0941* y *SMa0956/59*.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Eco*RI utilizando como sonda la región amplificada P2 de 718 pb marcada con digoxigenina. En las cepas que contienen la versión intacta de *SMa0961*, la sonda hibrida con un fragmento *Eco*RI de unas 1,24 Kb, mientras que en los mutantes pasa a ser de 1,15 kb por efecto de la delección de 560 pb.



### Anexo 2.15. Construcción de pTE3-0961

Para obtener la construcción pTE3-0961, el gen *SMa0961* se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* utilizando los cebadores 0961exp.F (5'-AAAGGATCCGGTGAACCTGAAGAAGTAGC-3') y 0961exp.R (5'-AAAGGATCCTGGTTTGAGGTATTCCTACG-3') en los que se incluyó la secuencia de reconocimiento del enzima *BamHI* (región que aparece subrayada en la secuencia de los cebadores) para facilitar un clonaje posterior. El correspondiente producto de amplificación de 943 pb se clonó en el vector TOPO® XL PCR dando lugar al plásmido TOPO-0961. Tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores que pudieran haber sido introducidos por la polimerasa, el inserto de TOPO-0961 se aisló tras someter el plásmido a digestión *BamHI* y se subclonó en el vector pTE3 previamente digerido con la misma enzima de restricción. El plásmido resultante, pTE3-0961, previa introducción por transformación a la cepa movilizadora de *E. coli* S17.1, se transfirió por conjugación a la cepa 100TSS y 1021RctRQ2. Los transconjugantes se seleccionaron en MM adicionado de Sm, Spc y Tc, y se comprobaron mediante análisis de su ADN plasmídico.



Anexo 2.16. Lista de genes diferencialmente expresados en un mutante 1021RctA<sup>-</sup> vs. 1021

Genes	Descripción	Valor de M*
<i>SMa0095</i>	putativa aminopeptidasa	-0.9408
<i>SMa0101</i>	hipotética proteína conservada	-1.0656
<i>SMa0104</i>	proteína de unión a soluto de putativo transportados ABC	-0.9819
<i>SMa0252</i>	hipotética proteína conservada	-1.0108
<i>SMa0695</i>	ArcB ArcB ornitina carbamoyl transferasa	-1.0823
<i>SMa0930</i>	probable proteína de transferencia conjugativa traC	1.2318
<i>SMa0933</i>	probable proteína de transferencia conjugativa traC	2.0619
<i>SMa0941</i>	hipotética proteína	1.4096
<i>SMa1050</i>	hipotética proteína	-1.0864
<i>SMa1057</i>	hipotética proteína conservada	-0.9069
<i>SMa1077</i>	proteína conservada inducida simbióticamente Nex18	-1.3782
<i>SMa1078</i>	hipotética proteína conservada	-1.0111
<i>SMa1081</i>	hipotética proteína	-0.9180
<i>SMa1097</i>	hipotética proteína	-0.9019
<i>SMa1259</i>	hipotética proteína	-1.0223
<i>SMa1311</i>	proteína de secreción tipo IV VirB6	1.2674
<i>SMa1313</i>	proteína de secreción tipo IV VirB5	1.4891
<i>SMa1315</i>	proteína de secreción tipo IV VirB4	1.7512
<i>SMa1318</i>	proteína de secreción tipo IV VirB3	2.4610
<i>SMa1319</i>	proteína de secreción tipo IV VirB2	1.0086
<i>SMa1321</i>	proteína de secreción tipo IV VirB1	2.8453
<i>SMa1322</i>	hipotética proteína	1.7293
<i>SMa1323</i>	hipotética proteína	-0.9632
<i>SMb20264</i>	putativa proteína permeasa de transportador de aminoácidos ABC	-0.9408
<i>SMb20284</i>	putativa proteína de unión a espermidina/putrescina de transportador periplásmico tipo ABC	-0.9428
<i>SMb20647</i>	hipotética proteína	3.0355
<i>SMb20941</i>	ExsA msba-like proteína de exportación de azúcares tipo ABC	1.7248
<i>SMb21182</i>	putativa proteína conservada anclada a la membrana	-0.9133
<i>SMb21197</i>	OppB proteína permeasa de absorción de oligopéptidos ABC	-1.2121
<i>SMb21198</i>	OppC proteína permeasa de absorción de oligopéptidos ABC	-0.9722
<i>SMb21284</i>	putativa proteína enzimática similar a uricasa	-1.1187
<i>SMc00094</i>	BetB proteína betain aldehído dehidrogenasa BADH oxidoreductasa	-0.9483
<i>SMc00198</i>	hipotética proteína desconocida	1.1666
<i>SMc00335</i>	RpsA proteína ribosómica S1 30s	-0.9764
<i>SMc00364</i>	RplT probable proteína ribosómica L20 50s	1.1186
<i>SMc00409</i>	hipotética proteína de péptido señal	1.5375
<i>SMc00485</i>	RpsD probable proteína ribosómica S4 30s	1.0971
<i>SMc00567</i>	RpsR putative proteína ribosómica S18 30s	1.3759
<i>SMc00821</i>	hipotética proteína	0.9345
<i>SMc00965</i>	hipotética proteína conservada	-1.1990
<i>SMc01152</i>	RpsT proteína ribosómica S20 30s	1.0937
<i>SMc01299</i>	RplN probable proteína ribosómica L14 50s	1.0633
<i>SMc01323</i>	putativa subunidad transmembrana preproteína translocasa SecE	0.9986
<i>SMc01369</i>	RpmG probable proteína ribosómica L33 50s	0.9421
<i>SMc01535</i>	hipotética proteína	-0.9236
<i>SMc01557</i>	hipotética proteína de péptido señal	0.9337
<i>SMc01586</i>	hipotética proteína transmembrana	0.9075
<i>SMc01815</i>	putativa proteína oxidoreductasa de sulfuro de hierro	-1.3971

Genes	Descripción	Valor de M <sup>*</sup>
<i>SMc02049</i>	GcvP probable proteína glicina deshidrogenasa descarboxilasa	-0.9263
<i>SMc02120</i>	AapM proteína permeasa de transporte general L-aminoácidos ABC	-1.0864
<i>SMc02156</i>	hipotética proteína conservada	-1.2019
<i>SMc02181</i>	PutA proteína bifuncional prolina deshidrogenasa	-1.0306
<i>SMc02227</i>	FadB putativa alfa subunidad del complejo de oxidación de grasas	-0.9136
<i>SMc02228</i>	FadA putativa proteína acetil coA aciltransferasa	-1.3780
<i>SMc02229</i>	putativa proteína acil coA deshidrogenasa	-1.3860
<i>SMc02266</i>	hipotética proteína conservada	1.0815
<i>SMc02352</i>	putativa proteína glutamina sintetasa	-1.0373
<i>SMc02356</i>	putativa proteína periplásmica de unión a aminoácidos de cadena ramificada de transportador tipo ABC	-1.0433
<i>SMc02389</i>	hipotética proteína desconocida transmembrana	1.2272
<i>SMc02507</i>	SitC putativa proteína de transporte de hierro de transportador de membrana tipo ABC	-1.3509
<i>SMc02508</i>	SitB putativa proteína de unión a ATP de transportador de membrana tipo ABC	-1.4914
<i>SMc02509</i>	SitA putativa proteína de unión a hierro periplásmica de transportador de membrana tipo ABC	-1.0449
<i>SMc02551</i>	CysS probable proteína cisteinil ARNt sintetasa	1.0367
<i>SMc02689</i>	probable aldehído deshidrogenasa	-1.0528
<i>SMc02707</i>	hipotética proteína conservada	1.3390
<i>SMc02718</i>	hipotética proteína desconocida	1.0376
<i>SMc02897</i>	putativa proteína transmembrana citocromo c	0.9980
<i>SMc03061</i>	AgIE proteína periplásmica de transportador ABC de unión a alfa glucósidos	-0.9849
<i>SMc03132</i>	OrdL3 putativa proteína oxidoreductasa	-1.2326
<i>SMc03133</i>	putativa proteína permeasa de transporte de aminoácidos ABC	-0.9287
<i>SMc03139</i>	hipotética proteína conservada	-1.6977
<i>SMc03770</i>	RplU probable proteína ribosómica L21 50s	1.7350
<i>SMc03772</i>	RpmA probable proteína ribosómica L27 50s	1.6499
<i>SMc03773</i>	hipotética proteína conservada	1.9328
<i>SMc03858</i>	PheAa putativa corismato mutasa	1.0313
<i>SMc04009</i>	hipotética proteína conservada	1.0152
<i>SMc04164</i>	hipotética proteína	1.2946

## **CONCLUSIONES**



- 1.- El plásmido pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1201 es un plásmido movilizable por conjugación. Dicha movilización es dependiente de funciones conjugativas, como el sistema de secreción de tipo IV, codificadas en el pSymA de la misma cepa.
- 2.- Ambos megaplásmidos, pSymA y pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021, poseen sendos *oriTs* y relaxasas (TraA1 y TraA2) funcionales. La transcripción de los genes correspondientes, *traA1* y *traA2*, es reprimida por el regulador transcripcional RctA. Además, dichos genes necesitan situarse en *cis* con respecto a sus respectivos *oriT* para que la eficiencia de transferencia de cada plásmido sea óptima.
- 3.- La transferencia conjugativa del plásmido pSymA de *Sinorhizobium meliloti* 1021, y por extensión la del pSymB, se encuentra regulada a través de una pareja represor-antirrepresor codificada por los genes *rctA-rctB*, de forma similar a la descrita para el plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* CFN42. En condiciones de cultivo habituales en el laboratorio, la expresión del gen *rctB* se encuentra inhibida, lo que permite la acción del represor *rctA* impidiendo la conjugación de dichos plásmidos.
- 4.- El gen *rctR* (*SMa0955*) localizado en el pSymA, codifica para un regulador transcripcional de la familia GntR que mantiene inhibida la transcripción del antirrepresor *rctB* en las condiciones de cultivo habituales en el laboratorio. RctR no reprime directamente la transcripción de *rctB*, sino que reprime la expresión de otro gen, *rctC* (*SMa0961*), el cual es necesario para la activación del antirrepresor *rctB*.
- 5.- RctR representa un elemento central en la ruta de transducción de señales que promueven la actividad conjugativa de los plásmidos simbióticos de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en condiciones naturales. Probablemente, la actividad represora de RctR es modulada a través de algún compuesto químico, de naturaleza todavía desconocida, en cuyo transporte y procesamiento podría implicar al producto de los genes *SMa0950*, *SMa0951*, *SMa0952*, *SMa0953*, *SMa0956*, *SMa0958* y *SMa0959*.

## *Conclusiones*

6.- La ausencia de los genes *rctR* y *rctC* del genoma de *R. etli* sugiere que distintos plásmidos RctA podrían regular su transferencia conjugativa en respuesta a señales y/o condiciones ambientales también diferentes.

## **BIBLIOGRAFÍA**



Abraham, L.J. y Rood, J.I. (1985) Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **161**: 636-640.

Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. y Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* **370**: 621-628.

Altieri, M.A. (1994) Biodiversity and pest management in agroecosystems. Harworth Press, New York.

Altschul, S.F., Madden, T.L. Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

Ames, G.F. (1986) Bacterial periplasmid transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 397-425.

Andrzejewska, J., Lee, S.K., Olbermann, P., Lotzing, N., Katzowitsch, E., Linz, B., *et al.* (2006) Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV *cag* pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J. Bacteriol.* **188**: 5865-5877.

Arends, K., Schiwon, K., Sakinc, T., Hübner, J. y Grohmann, E. (2012) Green fluorescent protein-labeled monitoring tool to quantify conjugative plasmid transfer between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 895-899.

Averhoff, B. (2009) Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 611-626.

Backert, S. y Meyer, T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 207-217.

Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A. y Amieva, M.R. (2005) *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 16339-16344.

Balzer, D., Pansengrau, W. y Lanka, E. (1994) Essential motifs of relaxase (TraI) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4. *J. Bacteriol.* **176**: 4285-4295.

Bannam, T.L., Teng, W.L., Bulach, D., Lyras, D. y Rood, J.I. (2006) Functional identification of conjugation and replication regions of the tetracycline resistance plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **188**: 4942-4951.

Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Long, S.R. *et al.* (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 9883-9888.

Bashan, Y. y Levanony, Y. (1991) Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* **137**: 99-103.

Becker, A., Schmidt, M., Jager, W. y Pühler, A. (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**: 37-9.

Beck von Bodman, S., Hayman, G.T. y Farrand, S.K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 643-647.

Beck von Bodman, S. y Farrand, S.K. (1995) Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* **177**: 5000-5008.

Benyajati, C., Place, A.R., Powers, D.A. y Sofer, W. (1981) Alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*: relationship of intervening sequences to functional domains in the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 2717-2721.

Beringer, J.E. (1974) R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.

Bever, J.D. y Simms, E.L. (2000) Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of *Rhizobium*. *Heredity* **85**: 366- 372.

Bhattacharjee, M.K. y Meyer, R.J. (1993) Specific binding of MobA, a plasmid-encoded protein involved in the initiation and termination of conjugal DNA transfer, to single-stranded oriT DNA. *Nucleic Acid Res.* **21**: 4563-4568.

Bladergroen, M.R. y Spaink, H.P. (1998) Genes and signal molecules involved in the rhizobia-*Leguminosae* symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 353-359.

Blaser, M. J. y Atherton, J.C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence biology and disease. *J. Clin. Invest.* **113**: 321-333.

Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K. y Valla, S. (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 370-9.

Bloemberg, G.V. y Lugtenberg, B.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-50.

Bourzac, K.M. y Guillemin, K. (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol.* **7**: 911-919.

Bourzac, K.M., Botham, C.M. y Guillemin, K. (2007) *Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect. Immun.* **75**: 1203-1213.

Bowen, G.D. y Rovira, A.D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy.* **66**: 1-102.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W. y Backert, S. (2005) NF-KappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 9300-9305.

Brewin, N.J., Beringer, J.E. y Johnston, A.W.B. (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between 2 strains of *Rhizobium-leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 1244-1346.

Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R. y Romero, D. (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**: 34-43.

- Broughton, W.J. y Perret, X. (1999) Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 305-311.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S. y Perret, X. (2000) Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**: 5641-5652.
- Brynstad, S., Sarker, M.R., McClane, B.A., Granum, P.E. y Rood, J.I. (2001) Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* **69** : 3483-3487.
- Buhrdorf, R. Forster, C., Haas, R. y Fischer, W. (2003) Topological analysis of a putative *virB8* homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 213-217.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. y Guédon, G. (2002) The ICESt1 elements of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid.* **48**: 77-97.
- Burrus, V. y Waldor, M.K. (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* **155**: 376-386.
- Cabezón, E., Lanka, E. y de la Cruz, F. (1994) Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColeI by the IncW plasmid R388: *trwB* and RP4 *traG* are interchangeable. *J. Bacteriol.* **176**: 4455-4458.
- Cabezón, E., Sastre, J.I. y de la Cruz, F. (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 400-406.
- Cascales, E. y Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**: 137-149.
- Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y. y Jurkevitch, E. (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**: 1-11.
- Chai, Y., Zhu, J. y Winans, S.C. (2001) TrlR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function *in vitro* by forming inactive TrlR: TraR dimmers. *Mol. Microbiol.* **40**: 414-421.
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D.W. y Nester, E.W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **184**: 4838-4845.
- Chen, I. y Dubnau, D. (2004) DNA Uptake during bacterial transformation. *Nat. rev. Microbiol.* **2**: 241-249.
- Chen, I., Christie, P.J. y Dubnau, D. (2005) The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* **310**: 1456-1460.
- Cheng, G., Malenkos, J.W., Cha, M.R., Fuqua, C. y Chen, L. (2004) Quorum-sensing antiactivator TraM forms a dimmer that dissociates to inhibit TraR. *Mol. Microbiol.* **52**: 1641-1651.
- Cho, H. y Winans, S.C. (2007) TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* **63**: 1769-1782.

Christie, P.J. (1997) *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* **179**: 3085-3094.

Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. y Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 451-485.

Clewell, D.B. (1993) Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. In *Bacterial conjugation*, Clewell, D.B., ed., pp. 349-367. Plenum Press, New York.

Cook, D.M. y Farrand, S.K. (1992) The *oriT* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J. Bacteriol.* **174**: 6238-6246.

Cook, D.M., Li, P.L., Ruchaud, F., Padden, S. y Farrand, S.K. (1997) Ti plasmid conjugation is independent of *vir*: reconstitution of the *tra* functions from pTiC58 as a binary system. *J. Bacteriol.* **179**: 1291-1297.

Couturier, M.R., Tasca, E., Montecucco, C. y Stein, M. (2006) Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect. Immun.* **74**: 273-281.

Crossman, L.C., Castillo-Ramírez, S., McAnnula, C., Lozano, L., Vernikos, G.S., Acosta, J.L., Ghazoui, Z.F., Hernández-González, I., Meakin, G., Walker, A.W., Hynes, M.F., Young, J.P., Downie, J.A., Romero, D., Johnston, A.W., Dávila, G., Parkhill, J. y González, V. (2008) A common genomic framework for a diverse assembly of plasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS One.* **3**: e2567.

Danino, V.E., Wilkinson, A., Edwards, A. y Downie, J.A. (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.

Deaker, R., Roughley, R.J. y Kennedy, I.R. (2004) Legume seed inoculation technology- a review. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1275- 1288.

Debelle, F., Moulin, L., Mangin, B., Denaire, J. y Boivin, C. (2001) Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim. Pol.* **48**: 359-365.

DeFlaun, M.F. y Levy, S.B. (1989) Genes and their varied hosts. In: Levy S.B., Miller R.V. (eds) *Gene transfer in the environment*. McGraw-Hill, New York, p. 1-32.

Denison, R.F. (2000) Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *Am. Nat.* **156**: 567-576.

Ding, Z. Y., Atmakuri, K. y Christie, P.J. (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* **11**: 527-535.

Ding, H. y Hynes, M.F. (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can.J. Microbiol.* **55**: 917-927.

Ding, H., Yip, C.B. y Hynes, M. (2013) Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain VF39SM. *J. Bacteriol.* **195**: 328.

Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M.J. y Sanjuán, J. (2006) *J. Bacteriol.* **188**: 7617-7625.

Domínguez-Ferreras, A., Soto, M.J., Pérez-Arnedo, R., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2009) Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. *J. Bacteriol.* **191**: 7490-7499.

Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Pühler, A. y Meyer, F. (2003) EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.* **106**: 135-146.

Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S. y Benade, S.P. (2011) The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes Environ.* **26**: 101-112.

Doyle, J.J. (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci.* **3**: 473-478.

Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **55**: 395-424.

Edwards, A., Frederix, M., Wisniewski-Dye', F., Jones, J., Zorreguieta, A. y Downie, J.A. (2009) The *cin* and *rai* Quorum-Sensing Regulatory Systems in *Rhizobium leguminosarum* Are Coordinated by ExpRand CinS, a Small Regulatory Protein Coexpressed with CinI. *J. Bacteriol.* **191**: 3059-3067.

Egelhoff, T.T. y Long, S.R. (1985) *Rhizobium meliloti* nodulation genes: identification of nodABC gene products, purification of nodA protein, and expression of nodA in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **164**: 591-9.

Farrand, S.K. (1998) Conjugal plasmid and their transfer. In *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J. (eds.). Amsterdam: Kluwer Academic Publisher., pp. 199-233.

Figurski, D.H. y Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 1648-1652.

Finan, T.M., Hartweg, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G.C. y Signer, E.R. (1984) General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **159**: 120-124.

Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F. y Signer, E.R. (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**: 66-72.

Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P. *et al.* (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 9889-9894.

Firth, N., Ippen-Ihler, K., Skurray, R.A. (1996) In: Neidhart, F.C., Curtiss III R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.C. Eds, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, D.C., American Society for Microbiology. 2377-2401.

Fisher, H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**: 352-386.

Francia, M.V. y Clewell, D.B. (2002) Amplification of the tetracycline resistance determinant of pAMalphi in *Enterococcus faecalis* requires a site-specific recombination event involving relaxase. *J. Bacteriol.* **184**: 5187-5193.

Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C. y de la Cruz, F. (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 79-100.

Franssen, H.J., Vijn, L., Yang, W.C. y Bisseling, T. (1992) Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* **19**: 89-107.

Fraysse, N., Couderc, F., y Poinsot, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1365-1380.

Frederix, M., Edwards, A., McAnulla, C. y Downie, J.A. (2011) Co-ordination of quorum-sensing regulation in *Rhizobium leguminosarum* by induction of an anti-repressor. *Mol. Microbiol.* **81**: 994-1007.

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

Frick, D.N. y Richardson, C.C. (2001) DNA primases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 39-80.

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

Fuqua, C. y Winans, S.C. (1996) Localization of OccR- activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol. Microbiol.* **20**: 1199-1210.

Fürste, J.P., Ziegelin, G., Pansegrau, W. y Lanka, E. (1987) Conjugative transfer of promiscuous plasmid RP4: plasmid-specified functions essential for formation of relaxosomes. In *Mechanism of DNA replication and recombination*. McMackern, K (ed). New York: Lyss, Inc., pp. 553-564.

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

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

García-de los Santos, A., Brom, S. y Romero, D. (1996) *Rhizobium* plasmids in bacteria legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 119-125.

Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V. y de la Cruz, F. (2009) The Diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbio. Rev.* **33**: 657-687.

Gelvin, S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 223-256.

Glick, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology.* **41**: 109- 117.

Godiard, L., Lepage, A., Moreau, S., Laporte, D., Verdenaud, M., Timmers, T. y Gamas, P. (2011) MtbHLH1, a bHLH transcription factor involved in *Medicago truncatula*

nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges. *New Phytol.* **191**: 391-404.

Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F. y Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**: 637-641.

Gomis-Rüth, F.X., Solá, M., de la Cruz, F. y Coll, M. (2004) Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr. Pharm. Des.* **10** : 1551-65.

González- Pérez, B., Lucas, M. Cooke, L.A., Vyle, J.S., de la Cruz, F. y Moncalian, G. (2007) Analysis of DNA processing reactions in bacterial conjugation by using suicide oligonucleotides. *EMBO J.* **26**: 3847- 3857.

González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., *et al.* (2003) The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology* **4**: R36.

González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I. *et al.* (2003) The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* **4**: R36.

Goodner *et al.*, (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2323-2328.

Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kunding, C., Beck, C., Marty, R. y Hennecke, H. (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* **183**: 1002-1010.

Grange, W., Duckely, M., Husale, S., Jacob, S., Engel, A. y Hegner, M. (2008) VirE2: a unique ssDNA-compacting molecular machine. *PLoS Biol.* **6**: e44.

Grohmann, E., Muth, G. y Espinosa, M. (2003) Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 277-301.

Guasch, A., Lucas, M., Moncalian, G., Cabezas, M., Pérez-Luque, R., Gomis-Rüth, F. X., de la Cruz, F. y Coll, M. (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 1002-1010.

Gubbins, M.J., Lau, I., Will, W.R., Manchak, J.M., Raivio, T.L. y Frost, L.S. (2002) The positive regulator, TraJ, of the *Escherichia coli* F plasmid is unstable in a *cpxA*<sup>\*</sup> background. *J. Bacteriol.* **184**: 5781-5788.

Guo, M., Hou, Q., Hew, C.L. y Pan, S.Q. (2007a) *Agrobacterium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**: 1201-1212.

Guo, M., Jin, S., Sun, D., Hew, C.L. y Pan, S.Q. (2007b) Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**: 20019-20024.

Guzmán, L.M. y Espinosa, M. (1997) The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.* **266**: 688-702.

- Hahn, M. y 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.
- Hamilton, C.M., Lee, H., Li, P-L, Cook, D.M., Piper, K.R., Beck von Bodman, S. *et al.* (2000) TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* **182**: 1541-1548.
- Hansen, G. y Chilton, M.D. (1999) Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **240**: 21-57.
- Harrison, P.W., Lower, R.P., Kim, N.K. y Young, J.P. (2010) Introducing the bacterial “chromid”: not a chromosome, not a plasmid. *Trends. Microbiol.* **18**: 141-148.
- Hattermann, D.R. y Stacey, G. (1990) Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 833-836.
- He, X., Chang, W., Pierce, D.L., Seib, L.O., Wagner, J. y 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.
- Heinemann, J.A. y Sprague, G.F. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**: 205-9.
- Heinemann, J.A. (1991) Genetics of gene transfer between species. *Trends Genet.* **7**: 181-5.
- Hekman, K., Guja, K. Larkin, C. y Schildbach, J.F. (2008) An intrastrand three- DNA-base interaction is a key specificity determinant of F transfer initiation and of F TraI relaxase DNA recognition and cleavage. *Nucleic Acids Res.* **36**: 4565- 4572.
- Herrera-Cervera, J.A., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1996) Ammonia inhibition of plasmid pRmeGR4a conjugal transfer between *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1145-1150.
- Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 87-97.
- Higgins, C.F., Hyde, S.C., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Gill, D.R. y Gallagher, H.P.(1990) Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 571-592.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. y Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Hooykaas, P.J.J., Vanbrussel, A.A.N., Dendulkas, H., Vanslogteren, G.M.S. y Schilperoort, R.A. (1981) Sym plasmid of *Rhizobium-trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium* plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**: 212-230.
- Hooykaas, P.J.J. y Beijersbergen, A.G.M. (1994) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 157-179.
- Hoskisson, P.A. y Rigali, S. (2009). Chapter 1: Variation in form and function the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. **69**:1-22.

Hughes, M.L., Poon, R., Adams, V., Sayeed, S., Saputo, J., Uzal, F.A., McClane, B.A. y Rood, J.I. (2007) Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. *J. Bacteriol.* **189**: 7531-7538.

Huguet, T., Rosenberg, C., Casse-Delbart, F. *et al.* (1983) Studies on *Rhizobium meliloti* plasmids and on their role in the control of nodule formation and nitrogen fixation: the pSym megaplasmid and other large plasmids. In *Mol. Gen. Bacteria Plant Interact.* Pühler, A. (ed). Berlin: Springer-Verlag, pp. 36-45.

Hwang, I., Cook, D.M. y Farrand, S.K. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J. Bacteriol.* **177**: 449-458.

Hwang, I., Smyth, A.J., Luo, Z.Q. y Farrand, S.K. (1999) Modulating quorum sensing by antiactivation: TraM interacts with TraR to inhibit activation of Ti plasmid conjugal transfer genes. *Mol. Microbiol.* **34**: 282-294.

Hynes, M.F., Brucksch, K. y Priefer, U. (1988) Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium-leguminosarum* strain. *Arch. Microbiol.* **150**: 326-332.

Innes, R.W., Hirose, M.A. y Kuempel, P.L. (1988) Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J. Bacteriol.* **170**: 3793-3802.

Johnston, A.W.B., Beynon, J.L., Buchananwollaston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R. y Beringer, J.E. (1978) High-frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* **276**: 634-636.

Johnston, A.W.B., Hombrecher, G., Brewin, N.J. y Cooper, M.C. (1982) Transmissible plasmid in *Rhizobium-leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 85-93.

Jones, K.M., Lloret, J., Daniele, J.R. y Walker, G.C. (2007) The type IV secretion system of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 is required for conjugation but not for intracellular symbiosis. *J. Bacteriol.* **189**: 2133-2138.

Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. y Ghosh, D. (1995). Short-chain deshydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry.* **34**: 6003-6013.

Juhas, M., Crook, D.W., Dimopoulou, I.D., Lunter, G., Harding, R.M., Ferguson, D.J. y Hood, D.W. (2007) Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J. Bacteriol.* **189**: 761-771.

Juhas, M., Crook, D.W. y Hood, D.W. (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol.* **10**: 2377-2386.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W. y Crook, D. W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 376-393.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T. *et al.* (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**: 331-338.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S. *et al.* (2002) Complete genomic sequence of nitrógeno-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**:189-197.

Karplus, K. (1998) Hidden Markov models for detecting remote protein homologues. *Bioinformatics.* **14**: 846-856.

Kennedy, A.C. y Smith, K.L. (1995) Soil microbiol Diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil.* **170**: 75-86.

Kloepper, J.W. y Schroth, M.N. (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria.* Ed. Station de Pathologic Vegetal et Phytobacteriologic. **2**: 879-882. Angers, France.

Kondorosi, E., Roudier, F. y Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: Growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 488-492.

Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G. y Stathopoulos, C. (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* **187**: 4306-4314.

Krishnapillai, V. (1988) Molecular genetic análisis of bacterial plasmid promiscuity. *FEMS Microbiol. Rev.* **4**: 223-237.

Krol, E. y Becker, A. (2004) Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 1-17.

Kumar, R.B. y Das, A. (2002) A Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteína VirD4. *Mol. Microbiol.* **43**: 1523-1532.

Kutter, S., Buhrdorf, R. Haas, J., Scheneider-Brachert, W., Haas, R. y Fischer, W. (2008) Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J. Bacteriol.* **190**: 2161-2171.

Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R. y Wessler, S. *et al.* (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**: 862-866.

Labes, M., Pühler, A. y Simon, R. (1990) A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. *Gene* **89**: 37-46.

Lamb, J.W., Hombrecher, G. y Johnston, A.W.B. (1982) Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium-phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 449-452.

Lanka, E. y Barth, P.T. (1981) Plasmid RP4 specifies a deoxyribonucleic acid primase involved in its conjugal transfer and maintenance. *J. Bacteriol.* **148**: 769-781.

Lanka, E. y Wilkins, B.M. (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 141-169.

Larkin, C., Datta, S., Harley, M.J., Anderson, B.J., Ebie, A., Hargreaves, V. y Schildbach, J.F. (2005) Inter- and intramolecular determinants of the specificity of single-stranded DNA binding and cleavage by the F factor relaxase. *Structure.* **13**: 1533- 1544.

Lawley, T.D., Gordon, G.S., Wright, A. y Taylor, D.E. (2002) Bacterial conjugative transfer: visualization of successful mating pairs and plasmid establishment in live *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**: 947-956.

Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J. y Frost, L.S. (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**: 1-15.

Lee, M.H., Kosuk, N., Bailey, J., Traxler, B. y Manoil, C. (1999) Analysis of F factor TraD membrane topology by use of gene fusions and trypsin-sensitive insertions. *J. Bacteriol.* **181**: 6108-6113.

Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **119**: 1072-1074.

Lessl, M., Pansegrau, W. y Lanka, E. (1992) Relationship of DNA-transfer Systems: essentials transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 6099-6100.

Lewis, M. (2005) The lac repressor. *C. R. Biol.* **328**: 521-548.

Li, P.L., Everhart, M.D. y Farrand, S.K. (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. *J. Bacteriol.* **180**: 6164-6172.

Lin, T.L., Lee, C.Z. Hsieh, P.F., Tsai, S.F. y Wang, J.T. (2008) Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1- associated genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol.* **190**: 515-526.

Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P. y Downie, J.A. (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* **37**: 81-97.

Llosa, M., Bolland, S. y de la Cruz, F. (1994) Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J. Mol. Biol.* **235**: 448-464.

Llosa, M., Bolland, S., Grandoso, G. y de la Cruz, F. (1994) Conjugation-independent, site-specific recombination at the *oriT* of the IncW plasmid R388 mediated by TrwC. *J. Bacteriol.* **176**: 3210-3217.

Llosa, M., Gomix-Rüth, F. X., Coll, M. y de la Cruz, F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* **45**: 1-8.

Llosa, M. y de la Cruz, F. (2005) Bacterial conjugation: a potencial tool for genomic engineering. *Res. Microbiol.* **156**: 1-6.

Llosa, M., Roy, C. y Dehio, C. (2009) Bacterial type IV secretion Systems in human disease. *Mol. Microbiol.* **73**: 141-151.

Lorenz, M.G. y Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563- 602.

Lorkiewicz, Z. (1997) Nodulation genes in the *Rhizobium*- plant signal exchange. *Acta Biochim. Pol.* **44**: 1-12.

Lupwayi, N.Z., Olsen, P.E., Sande, E.S., Keyser, H.H., Collins, M.M., Singleton, P.W. y Rice, W.A. (2000) Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research.* **65**: 259- 270.

Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. y Ausubel, F.M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* **149**:114-122.

Marketon, M.M. y González, J.E. (2002) Identification of two quorum-sensing Systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**: 3466-3475.

Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Rückert, C., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. y Weidner, S. (2011) Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* **155**: 11-19.

Margaret, I., Crespo-Rivas, Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Cubo, M.T., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Murdoch, P.S., Rodríguez-Carvajal, M.A., Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Sanjuán, J., Soto, M.J. y Vinardell, J.M. (2012) *Sinorhizobium fredii* HH103 rkp-3 genes are required for K-antigen polysaccharide biosynthesis, affect lipopolysaccharide structure and are essential for infection of legumes forming determinate nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**: 825-838.

Martínez-Romero, E. (2000) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In *The Prokaryotes: an Electronic Resource for Microbiological Community*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-12.

Masters, M. (1996) Generalized transduction. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 2421-2441. Edited by F.C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Mazodier, P. y Davies, J. (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 147-171.

McAnulla, C., Edwards, A., Sanchez-Contreras, M., Sawers, R.G. y Downie, J.A. (2007) Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Microbiology* **153**: 2074-2082.

McCullen, C.A. y Binns, A.N. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **22**: 101-127.

McFall, S.M., Chugani, S.A. y Chakrabarty, A.M. (1998) Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene* **223**: 257-267.

Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. (1993) Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4- Their possible use in the construction of cloning vectors for Rhizobia. *Arch. Microbiol.* **160**: 477-485.

Merryweather, A., Barth, P.T. y Wilkins, B.M. (1986) Role and specificity of plasmid RP4-encoded DNA primase in bacterial conjugation. *J. Bacteriol.* **167**: 12-17.

Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Karlas, A., Haimovich, B., Backert, S. y Meyer, T.F. (2007) The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol.* **9**: 1148-1161.

Moncalián, G., Cabezón, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F. y Valpuesta, J.M., *et al* (1999) Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J. Biol. Chem.* **274**: 36117-36124.

Muller-Dieckmann, H.J., Grantz, A.A. y Kim, S.H. (1999) The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1. *Structure.* **7**: 1547-1556.

Nagai, H. y Roy, C.R. (2003) Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol.* **5**: 373-383.

Nandasena, K.G., O'hara, G.W., Tiwori, R.P. y Howieson, J.G. (2006) Rapid *in situ* evolution of nodulating strains for *Biserrulla pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7365-7367.

Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Sezmis, E. y Howieson, J.G. (2007) In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environ. Microbiol.* **9**: 2496-2511.

Nishiguchi, R., Takanami, M. y Oka, A. (1987) Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid-pRiA4B. *Mol. Gen. Genet.* **206** : 1-8.

Nogales, J., Muñoz, S., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2009) Genetic characterization of oligopeptide uptake Systems in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**: 177-187.

Nomura, N., Masai, H., Inuzuka, M., Miyazaki, C., Ohtsubo, E., Itoh, T., Sasamoto, S., Matsui, M., Ishizaki, R. y Arai, K. (1991) Identification of eleven single-strand initiation sequences (ssi) for priming of DNA replication in the F, R6K, R100 and Cole2 plasmids. *Gene* **108**: 15-22.

Nunez, B. y de la Cruz, F. (2001) Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Mol. Microbiol.* **39**: 1088-1099.

Oger, P., Kim, K.S., Sackett, R.L., Piper, K.R. y Farrand, S.K. (1998) Octopine-type Ti plasmid code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of traR, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol. Microbiol.* **27**: 277-288.

Oresnik, I.J., Liu, S.L., Yost, C.K. y Hynes, M.F. (2000) Megaplasmid pRme2011 of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* **182**: 3582-3586.

Panicker, M.M. y Minkley, E.G. (1992) Purification and properties of the F sex factor TraD protein, an inner membrane conjugal transfer protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 12761-12766.

Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B. y Lanka, E. (1993) Sitespecific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 11538-11542.

Pansegrau, W. y Lanka, E. (1996) Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing. Independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (TraI) of IncP alpha plasmid RP4. *J. Biol. Chem.* **271**: 13068-13076.

Pellock, B.J., Cheng, H.P. y Walker, G.C. (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* **182**: 4310-4318.

Pérez-Mendoza, D., Sepúlveda, E., Pando, V., Muñoz, S., Nogales, J., Olivares, J., Soto, M.J., Herrera-Cervera, J.A., Romero, D., Brom, S. y Sanjuán J. (2005) Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J. Bacteriol.* **187**: 7341-7350.

Pérez-Mendoza, D., Lucas, M., Muñoz, S., Herrera-Cervera, J.A., Olivares, J., de la Cruz, F. y Sanjuan, J. (2006) The relaxase of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid shows *nic* site *cis*-acting preferente. *J. Bacteriol.* **188**: 7488-7499.

Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.

Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. y Robaglia, C. (2003) Tales from the underground : molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environ.* **26**: 189-199.

Piper, K.R., Beck Von Bodman, S., Hwang, I. y Farrand, S.K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1077-1089.

Piper, K.R. y Farrand, S.K. (2000) Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J. Bacteriol.* **182**: 1080-1088.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. y Neuvians, T.P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**: 509-515.

Prentki, P. y Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**:303-313.

Quandt J, Clark RG, Venter AP, Clark SR, Twelker S. y Hynes MF. (2004) Modified RP4 and Tn5-Mob derivatives for facilitated manipulation of large plasmids in Gram-negative bacteria. *Plasmid* **52**: 1-12.

Quinto, C., De la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., De Lourdes Girard, M., Calva, E., Palacios, R. (1985) Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 1170-1174.

Rambow-Larsen, A.A. y Weiss, A.A. (2004) Temporal expression of pertussis toxin and Ptl secretion proteins by *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **186**: 43-50.

Ramírez Bahena, M. H. (2006) Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de *Rhizobium* que establecen simbiosis con trébol en España. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral.

Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Stuart, G.S., Lamont, I.L. y Ronson, C.W. (2006) Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase *intS*, a

novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol.* **62**: 723-734.

Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Jambari, N., Ortori, C.A., Heeb, S., Williams, P., Barrett, D.A., Lamont, I.L. y Ronson, C.W. (2009) A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expresión of two conserved hypothetical genes. *Mol. Microbiol.* **76**: 1141-1155.

Ramsay, J.P., Major, A.S., Komarovskiy, V.M., Sullivan, J.T., Dy, R.L., Hynes, M.F., Salmond, G.P. y Ronson, C.W. (2013) A widely conserved molecular switch controls quorum sensing and symbiosis island transfer in *Mesorhizobium loti* through expression of a novel antiactivator. *Mol. Microbiol.* **87**: 1-13.

Rao, J.R., Fenton, M. y Jarvis, B.D.W. (1994) Symbiotic plasmid transfer in *Rhizobium leguminosarum* Biovar Trifolii and competition between the inoculant strain Icmp2163 and transconjugant soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 339-351.

Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Worsley, P.S., Dilworth, M.J., Glenn, A.R. y Howieson, J.G. (1999) Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. *Microbiology* **145**: 1307-1316.

Reinmann, C. y Haas, D. (1993) Mobilization of chromosomes and nonconjugative plasmids by cointegrative mechanisms. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, NY, pp. 137-188.

Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* **277**: 12507-12515.

Robertsen, B.K., Aman, P., Darvill, A.G., Mcneil, M. y Albersheim, P. (1981) The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium-Leguminosarum* and *Rhizobium-Trifolii*. *Plant Physiol.* **67**: 389-400.

Rodríguez, R.L. y Tait, R.C. (1983) *Recombinant DNA techniques*. Addison-Wesley Publishing.

Romero, D. y Brom, S. (2004) The symbiotic plasmid of the *Rhizobiaceae*. In *Plasmid biology*. Funnell, B.E., Phillips, G.J. (eds). Washington: ASM Press, pp. 271-290.

Rosenberg, C. y Huguet, T. (1984) The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor-induction. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 533-536.

Roth E, Jeon K. y Stacey G. (1988) Homology in endosymbiotic systems: the term 'symbiosome'. In: *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. Palcios, R., Verma, D.P.S. (eds.) ADS Press, St. Paul, pp 220-225.

Rüberg, S., Tian, Z.X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S. y Becker, A. (2003) Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* **106**: 255-68.

Saeki, K. (2011) Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-*rhizobium* model systems. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:1327-1339.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (eds) (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanjuan, J. y 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. y Olivares, J. (1991) NifA-NtrA regulatory system activates transcription of *nfe*, a gene locus involved in nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* **155**: 543-548.

Sanjuán, J., Herrera-Cervera, J.A., Sanjuán-Pinilla, J.M., Muñoz, S., Nogales, J. y Olivares, J. (2000) *Horizontal gene transfer in rhizobia: ecological implications*. In: Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity, F. Pedrosa *et al.*, (eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 593-594.

Santini, J.M. y Stanisch, V.A. (1998) Both the *fipA* gene of pKM101 and the *pifC* gene of F inhibit conjugal transfer of RP1 by an effect on *traG*. *J. Bacteriol.* **180**: 4093-4101.

Sastre, J.I., Cabezón, E. y de la Cruz, F. (1998) The carboxyl terminus of protein TraD adds specificity and efficiency to F-plasmid conjugative transfer. *J. Bacteriol.* **180**: 6039-6042.

Saurin, W., Hofnung, M. y Dassa, E. (1999) Getting in or out : early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* **48**: 22-41.

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

Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.

Schmid, M.C., Schulein, R., Dehio, M., Denecker, G., Carena, I., y Dehio, C. (2004) The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **52**: 81-92.

Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. y Watson, J.M. (1987) Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmid in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2942-2947.

Schröder, G., Krause, S., Zechner, E.L., Traxler, B., Yeo, H.J., Lurz, R. *et al.* (2002) TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J. Bacteriol.* **184**: 2767-2779.

Schubert, S., Dufke, S., Sorsa, J. Y Heesemann, J. (2004) A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* **51**: 837-848.

Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C. *et al.* (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 856-861.

- Schultze, M. y Kondorosi, A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 33-57.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R. y Martínez-Romero, E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 426-433.
- Segovia, L., Young, J.P. y Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 374-377.
- Sepúlveda, E., Pérez-Mendoza, D., Ramírez-Romero, M.A., Soto, M.J., López-Lara, I.M., Geiger, O. Sanjuán, J., Brom, S. y Romero, D. (2008) Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **190**: 4189-4197.
- Serna, A., Espinosa, E., Camacho, E.M. y Casadesús, J. (2010) Regulation of bacterial conjugation in microaerobiosis by host-encoded functions ArcAB and *sdhABCD*. *Genetics* **184**: 947-958.
- Sharypova, L.A., Chataigné, G., Fraysse, N., Becker, A. y Poinot, V. (2006) Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the rkpZ-modified K polysaccharide from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Glycobiology* **16**: 1181-1193.
- Shrivastava, S. y Mande, S.S. (2008) Identification and functional characterization of gene components of type VI secretion system in bacterial genomes. *PloS ONE* **3**: e2955.
- Simms, E.L. y Bever, J.D. (1998) Evolutionary dynamics of rhizopine within spatially structured *rhizobium* populations. *Proc. R. Soc. Lond (biol)*. **265**: 1713- 1719.
- Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Skerker, J. M. y Shapiro, L. (2000) Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* **19**: 3223.
- Smets, B.F. y Barkay, T. (2005) Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 675-678.
- Smith, K.P. y Goodman, R.M. (1999) Host Variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 473-491.
- Sorensen, S.J., Bailey, M., Lars H. Hansen, L.H., Kroer, N. y Wuertz, S. (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 700-710.
- Soto, M.J., Zorzano, A., Mercado-Blanco, J., Lepek, V., Olivares, J. y Toro, N. (1993) Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness gene *nfe*. *J. Mol. Biol.* **229**: 570-576.
- Soto, M.J., Zorzano, A., García-Rodríguez, F.M., Mercado-Blanco, J., López-Lara, I.M., Olivares, J. y Toro, N. (1994) Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency *nfe* gene homolog of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 703-707.

Soto, M.J., Sanjuán, J. y Olivares, J. (2006) Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**: 3167- 74.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Steen, J.A., Trudi, L., Bannam, T.L., Teng, W. L., Devenish, R.J. y Rood, J.I. (2009) The putative coupling protein TcpA interacts with other pCW3- encoded proteins to form an essential part of the conjugation complex. *J. Bacteriol.* **191**: 2926-2933.

Stern, J.C. y Schildbach, J.F. (2001) DNA recognition by F factor TraI36: highly sequence-specific binding of single-stranded DNA. *Biochemistry* **40**: 11586-11595.

Stock, A.M. y Mowbray, S.L. (1995) Bacterial chemotaxis: a field in motion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**: 744-51.

Stock, A.M., Robinson, V.L. y Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215.

Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B. y Ronson, C.W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 8985-8989.

Sullivan, J.T. y Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 5145-5149.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., De Bruijn, F.J. y Ronson, C.W. (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* **184**: 3086-3095.

Swiderska, A., Berndtson, A.K., Cha, M.R., Li, L., Beaudoin 3<sup>rd</sup>, G.M., Zhu, J. y Fuqua, C. (2001) Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. Interactions with the TraM anti-activator. *J. Biol. Chem.* **276**: 49449-49458.

Tanaka, K., Rogi, T., Hiasa, H., Miao, D.M., Honda, Y., Nomura, N., Sakai, H. y Komano, T. (1994) Comparative analysis of functional and structural features in the primase-dependent priming signals, G sites, from phages and plasmids. *J. Bacteriol.* **176**: 3606-3613.

Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F. y Cabezon, E. (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 8156-8161.

Tato, I., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F. y Cabezon, E. (2007) The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by proteína TrwA. *Implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors.* *J. Biol. Chem.* **282**: 25569-25576.

Teng, W.L., Bannam, T.L., Parsons, J.A. y Rood, J.I. (2008) Functional characterization and localization of the TcpH conjugation protein from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **190**: 5075-5086.

Thomas, C.M. y Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and Barriers to Horizontal Gene Transfer Between Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 711-721.

Thompson, J.N. (1994) *The Coevolutionary Process* (University of Chicago Press, Chicago), p. 387.

Timmers, A.C., Soupene, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P. y Truchet, G. (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 1204- 1213.

Toro, N. y Olivares, J. (1986) Characterization of a large plasmid of *Rhizobium-meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 331-335.

Toussaint, A., Merlin, C., Monchy, S., Benotmane, M.A., Leplae, R., Mergeay, M. y Springael, D. (2003) The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn4371, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4837-4845.

Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V. y 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.

Tsvetkova, K., Marvaud, J.C. y Lambert, T. (2010) Analysis of the mobilization functions of the vancomycin resistance transposon Tn1549, a member of a new family of conjugative elements. *J. Bacteriol.* **192**:702-713.

Van de Sande, V. y Bisseling, T. (1997) Signalling in symbiotic root nodule formation. *Essays Biochem.* **32**: 127-142.

Vanini, A., Volpari, C. y Di Marco, S. (2004) Crystal structure of the quorum-sensing protein TraM and its interaction with the transcriptional regulator TraR. *J. Biol. Chem.* **279**: 24291-24296.

Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J. y Hooykaas, P.J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**: 979-82.

Verma, A. y Burns, D.L. (2007) Requirements for assembly of PtlH with the pertussis toxin transporter apparatus of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **75**: 2297-2306.

Viprey, V., Perret, X. y Broughton, W. J. (2000) Host-plant invasion by rhizobia. *Subcell. Biochem.* **33**: 437.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. y Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951.

Wang, L., Helmann, J.D. y Winans, S.C. (1992) The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell.* **69**: 659-667.

Wang, E.T., van Berkum, P., Sui, X.H., Beyene, D., Chen, W.X. y Martínez-Romero, E. (1999) Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 51-65.

Waters, V.L. y Guiney, D.G. (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol. Microbiol.* **9**: 1123- 1130.

Weisberg, R.A. (1996) Specialized transduction. In: Neidhardt, F.H.C. (Ed.), *E. Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington DC.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B. y Thomashow, L.S. (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 309-348.

White, C.E. y Winans, S.C. (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **362**: 1135-1148.

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. y Salmond, G.P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365-404.

Widmer, F., Shaffer, B. T., Porteous, L. A. y Seidler, R. J. (1999) Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl. Env. Microbiol.* **65**: 374-380.

Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J. K. y Downie, J. A. (2002) N-acylhomoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **184**: 4510-4545.

Willians, D.R., Motallebi-Veshareh, M. y Thomas, C.M. (1993) Multifunctional repressor KorB can block transcription by preventing isomerization of RNA polymerase-promoter complexes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1141-1148.

Wisniewski-Dye, F., Jones, J., Chhabra, S. R. y Downie, J. A. (2002) *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **184**:1597–1606.

Wolanin, P.M., Thomason, P.A. y Stock, J.B. (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**: reviews3013.1–3013.8.

Wolanin, P.M., Webre, D.J. y Stock, J.B. (2003) Mechanism of phosphatase activity in the chemotaxis response regulator CheY. *Biochemistry* **42**: 14075-14082.

Wong, K., Finan, T.M. y Golding, G.B. (2002) Dinucleotide compositional analysis of *Sinorhizobium meliloti* using the genome signature: distinguishing chromosomes and plasmids. *Funct. Integr. Genomics* **2**: 274-81.

Wood, D.W. *et al.* (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2317-2323.

Yun, H, Lim, S., Cho, B.K. y Kim, B.G. (2004) Omega- Amino acid: pyruvate transaminase from *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2: a new catalyst for kinetic resolution of beta-amino acids and amines. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2529-2534.

Zeaiter, Z., Cohen, D., Musch, A., Bagnoli, F., Covacci, A. y Stein, M. (2008) Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol.* **10**: 781-794.

Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S. M. y Steward, G.F. (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Env. Microbiol.* **5**: 539-554.

Zhang, X., Dennis, P., Ehrenberg, M. Bremer, H. (2002) Kinetic properties of *rrn* promoters in *Escherichia coli*. *Biochimie* **84**: 981-96.

Zhu, J. y Winans, S.C. (1998) Activity of the quorum-sensing regulator TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is inhibited by a truncated, dominant defective TraR-like protein. *Mol. Microbiol.* **27**: 289-297.

Zhu, J. y Winans, S.C. (1999) Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 4832-4837.

Zhu J. y Winans, S.C. (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 1507-1512.

Zupan, J.R., Ward, D. y Zambryski, P. (1998) Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr. Op. Microbiol.* **1**: 649-655.

Zupan, J.R., Hackworth, C.A., Aguilar, J., Ward, D. y Zambryski, P. (2007) VirB1\* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **189**: 6551-6563.







**Universidad de Granada**  
**Programa Oficial de Doctorado en Biología**  
**Fundamental y de Sistemas**