



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS  
ORÍGENES DE REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO  
SIMBIÓTICO DE *Rhizobium tropici* CFN299

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

NOÉ BECERRA LOBATO



DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Becerra  
Lobato  
Noé  
56 43 28 25  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
095359382
2. Datos del tutor  
Dr  
Ismael  
Hernández  
Lucas
3. Datos del sinodal 1  
Dr  
Javier  
Izquierdo  
Sánchez
4. Datos del sinodal 2  
Dra  
Laura  
Kawasaki  
Watanabe
5. Datos del sinodal 3  
M en C  
Alfonso José  
Vilchis  
Peluyera
6. Datos del sinodal 4  
M en C  
María de los Angeles  
Aguilar  
Santamaría
7. Datos del trabajo escrito  
Caracterización Funcional de los Orígenes de Replicación del Plásmido  
Simbiótico de *Rhizobium tropici* CFN299  
p64  
2009

## **Agradecimientos**

A mi tutor, el Dr. Ismael Hernández Lucas por todo el apoyo y la confianza que tuvo en mi.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y por sus valiosos consejos y recomendaciones.

A mis amigos y compañeros del laboratorio por hacer un lugar de respeto y agradable para trabajar. En especial a Ismael, Aurora, Augusto y a Tono por su amistad, ayuda técnica, apoyo y consejos recibidos.

A la Química María Luisa Arias Mendoza por el apoyo que tuve durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Javier Izquierdo por sus sugerencias para este trabajo.

Al Dr. Jesús Caballero por sus valiosos consejos.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero por muchos conocimientos transmitidos.

A la M. en C. María de los Ángeles Aguilar Santamaría por ser una excelente profesora y recibir siempre consejos muy valiosos de su parte.

A Deyanira y a Nancy por su amistad y contribuciones que me ayudaron a realizar parte de este trabajo.

A mis amigos y a las personas que me quieren porque de alguna forma siempre están conmigo incondicionalmente.

A mi madre,  
Por todo lo que he aprendido de ella, por su ejemplo, su comprensión y apoyo incondicional, por estar siempre conmigo.

A mis hermanos,  
Alfredo, Myriam y Maricruz por su compañía, amistad y apoyo, además de lo que me han enseñado cada uno de ellos.

A mi tía Adelina,  
Que siempre ha estado pendiente de mí.

# INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1. Fijación biológica del nitrógeno.....	4
1.2. Interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	4
1.3. Plásmidos en <i>Rhizobium</i> .....	7
1.4. Orígenes de replicación en plásmidos de <i>Rhizobium</i> .....	8
1.4.1. Orígenes de replicación de la familia <i>repABC</i> en <i>Rhizobium</i> .....	8
1.4.1.1. Sistema de partición en replicones <i>repABC</i> .....	10
1.4.1.2. RepC en plásmidos <i>repABC</i> .....	12
1.4.1.3. Regulación de plásmidos <i>repABC</i> .....	12
1.4.2. Orígenes de replicación de la familia <i>repC</i> en <i>Rhizobium</i> .....	15
1.4.3. Orígenes de replicación de la familia <i>repAC</i> en <i>Rhizobium</i> .....	16
1.5. <i>Rhizobium tropici</i> .....	17
1.6. Estructura genómica de <i>R. tropici</i> CFN299.....	18
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>19</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1. Cepas y plásmidos utilizados.....	22
4.2. Medios y condiciones de cultivo.....	23
4.3. Transformación bacteriana.....	23
4.4. Conjugación bacteriana.....	23
4.5. Purificación de DNA.....	23
4.6. Southern blot.....	24
4.7. Amplificación por PCR y clonación.....	24
4.8. Perfil de plásmidos.....	24
4.9. Secuenciación.....	24
4.10. Análisis de Secuencias.....	25

<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>V. I. Caracterización del gen <i>repC</i></b> .....	<b>26</b>
5.1.1. Aislamiento del replicador tipo <i>repC</i> .....	26
5.1.2. Clonación de la secuencia amplificada <i>repC</i> en el plásmido pCR2.1.....	27
5.1.3. Clonación del gen <i>repC</i> en el plásmido pUX19.....	27
5.1.4. Transferencia de A780 (pUX19- <i>repC</i> ) a <i>A. tumefaciens</i> .....	29
5.1.5. Clonación <i>in vivo</i> del gen <i>repC</i> .....	29
5.1.6. Obtención y análisis de la secuencia del gen <i>repC</i> .....	31
5.1.7. Transferencia del gen <i>repC</i> completo a <i>A. tumefaciens</i> .....	32
<b>V. II. Caracterización del operón <i>repABC</i></b> .....	<b>33</b>
5.2.1. Aislamiento de <i>repBC</i> .....	33
5.2.2. Clonación de <i>repBC</i> en el plásmido pUX19.....	33
5.2.3. Transferencia de A610 (pUX19- <i>repBC</i> ) a <i>A. tumefaciens</i> .....	34
5.2.4. Detección del operón <i>repABC</i> por Southern blot.....	34
5.2.5. Obtención y clonación del operón <i>repABC</i> .....	35
5.2.6. Recuperación del plásmido (pUX19- <i>repABC</i> ) de <i>A. tumefaciens</i> .....	36
5.2.7. Región mínima replicable del operón <i>repABC</i> .....	36
5.2.8. Obtención y análisis de la secuencia del operón <i>repABC</i> .....	38
5.2.9. Secuencia del operón <i>repABC</i> .....	40
<b>V. III. Presencia de <i>repC</i> y <i>repABC</i> en <i>R. tropici</i> CFN299 y CFN299-10</b> .....	<b>41</b>
5.3.1. Transferencia de <i>repC</i> (A789) y <i>repABC</i> (A627) a <i>R. tropici</i> CFN299 y CFN299-10.....	41
5.3.2. PCRs de <i>repC</i> y <i>repABC</i> de las cepas CFN299 y CFN299-10.....	41
5.3.3. Detección de los replicadores de las cepas CFN299 y CFN299-10 por Southern blot.....	43
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
6.1. Gen <i>repC</i> .....	44
6.2. Operón <i>repABC</i> .....	48
<b>VII. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>VIII. APÉNDICE</b> .....	<b>52</b>
8.1 Medios de cultivo.....	52
8.2 Protocolos.....	53
<b>IX. REFERENCIAS</b> .....	<b>59</b>

## RESUMEN

El género *Rhizobium* establece asociaciones simbióticas con plantas leguminosas, las bacterias infectan las raíces e inducen en ellas nódulos fijadores de nitrógeno. Este proceso permite la fijación biológica del nitrógeno la cual es de gran importancia para los ecosistemas y para la agricultura debido a que representa la mayor fuente de abastecimiento de nitrógeno.

La bacteria *R. tropici* CFN299 habitante del suelo, es capaz de establecer relaciones simbióticas con múltiples leguminosas, posee una estructura genómica conformada por un cromosoma aproximado de 3000 kb, un megaplásmido de 1500 kb, un plásmido simbiótico (pSym) de 600 kb y 2 plasmidos de menor tamaño; (pB) de 240 kb y (pA) de 180 kb. El pSym posee una alta densidad de genes involucrados en la vida libre y simbiótica de *R. tropici* CFN299. En el presente trabajo se identificaron 2 orígenes de replicación en el pSym de *R. tropici* CFN299, uno perteneciente a la familia *repC* el cual posee una identidad de 63% con el gen *repC* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 y el segundo origen identificado se encuentra formando un operón y pertenece a la familia *repABC*, el gen *repC* de este operón posee una identidad de 76% con el gen *repC* del plásmido pSmeSM11a de *S. meliloti* SM11.

Los 2 orígenes de replicación del pSym de *R. tropici* CFN299 fueron clonados y secuenciados, sin embargo solamente el operón *repABC* fue capaz de replicarse autónomamente en *A. tumefaciens*. La región mínima de replicación del operón *repABC* es de 5.5 kb. Diversas evidencias experimentales, apoyan la hipótesis de que el origen de replicación funcional del plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 corresponde al operón *repABC*.



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Fijación biológica del nitrógeno

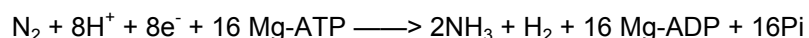
El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias al que se conoce como rizobios inducen en las raíces o en el tallo de las leguminosas la formación de nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio (Wang *et al.*, 2001). El grupo de rizobios taxonómicamente pertenecen al orden Rhizobiales, dividido en cuatro familias y perteneciente a la subdivisión alfa de las proteobacterias (Spaink, 2000). En esta simbiosis, la planta huésped obtiene compuestos nitrogenados por parte del simbionte y la bacteria obtiene por parte de la planta fuentes de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. Esta simbiosis contribuye con una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer en algunos casos sin fertilizantes nitrogenados. Actualmente se reconocen seis géneros dentro del grupo de de los rizobios: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, con un número variable de especies descritas (Wang *et al.*, 2001).

### 1.2. Interacción *Rhizobium*-leguminosa

Las leguminosas muestran una amplia diversidad ecológica y morfológica, existen desde formas herbáceas hasta árboles tropicales. Muchas leguminosas son noduladas por bacterias del género *Rhizobium* las cuales forman colonias que miden 0.5-1.0 x 1.2-3.0 mm. Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas. Son quimio-organotróficas, utilizan una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. En el género *Rhizobium* se incluye gran número de especies entre las que se encuentran: *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. mongolense* y *R. tropici*. Estas nodulan diferentes leguminosas en zonas templadas o tropicales (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996).

Las plantas leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a las bacterias. Entre estos compuestos se encuentran flavonoides y en respuesta a ellos, *Rhizobium* activa una serie de genes implicados en la nodulación. El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. En la superficie de *Rhizobium* se localiza una proteína específica a la adherencia, la ricadesina, la cual es una proteína que se une al calcio y puede actuar captando complejos de calcio. Otras proteínas como las lectinas, también participan en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de los pelos radicales (Wang *et al.*, 2001).

Después de la unión del simbiote, los pelos radicales se enroscan debido a la acción de sustancias específicas secretadas por la bacteria que se conocen como factores Nod. Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360 °. La bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales, y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales produciendo finalmente el nódulo. Las bacterias son liberadas desde el hilo de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. Las bacterias quedan separadas del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora llamada membrana peribacteroidal (MPB). A continuación hay una división continua y sincronizada de las bacterias rodeadas de MPBs. Al cesar la división las bacterias se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas bacteroides. Estos quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos por la MPB. A la estructura que contiene estos grupos de bacteroides rodeados por la MPB se les llama simbiosomas. Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que las células a partir de las que se desarrollaron, y hasta varios miles se encuentran en una sola célula vegetal. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que se han formado los bacteroides, en los cuales se realiza la fijación simbiótica de nitrógeno. En el proceso de fijación de nitrógeno, la enzima nitrogenasa cataliza la reacción (Wang *et al.*, 2001):



La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consiste de dos componentes, la proteína homodimérica que contiene Fe y es codificada por *nifH*, y la proteína

tetramérica que contiene Fe y molibdeno (Mo), codificada por los genes *nifD* y *nifK*. La nitrogenasa de los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, incluyendo la sensibilidad al oxígeno y la capacidad de reducir acetileno y N<sub>2</sub>. La formación de H<sub>2</sub> es parte del mecanismo de la nitrogenasa pero representa una pérdida significativa de energía. En algunas especies de *Rhizobium* existe una hidrogenasa codificada por los genes *hup* que es capaz de reciclar el H<sub>2</sub> formado por la nitrogenasa, que resulta en un uso más eficiente de la energía (Rey *et al.*, 1993). Es por ello, que se ha impulsado la transferencia de los genes *hup* a cepas de *Rhizobium* para la inoculación en el campo (Báscones *et al.*, 2000).

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos: succinato, malato y fumarato. Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP, y tras su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N<sub>2</sub>. El primer producto estable que se obtiene de la fijación de N<sub>2</sub> es el amonio, y varias pruebas indican que la asimilación del amonio para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radiculares lo lleva principalmente la planta (Wang *et al.*, 2001). También se ha reportado que el nitrógeno puede ser transferido a la planta en forma de alanina (Waters *et al.*, 1998).

Durante el proceso de simbiosis la planta también expresa proteínas específicas del nódulo a las que se llama nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina tiene la función de aportar O<sub>2</sub> a los bacteroides y de controlar los niveles de oxígeno. La leghemoglobina se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por bacteroides y es la que confiere el típico color rojo o rosado de los nódulos funcionales (Wang *et al.*, 2001).

La relación procarionte-eucarionte constituye un modelo de estudio para descifrar el funcionamiento bacteriano en vida libre y simbiosis. En *Rhizobium* se encuentran plásmidos en su estructura genómica. Algunos de estos han sido estudiados, por ejemplo, los de las cepas *R. spp.* NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997) y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) han sido completamente secuenciados. La secuencia nucleotídica de estos replicones ha revelado características interesantes entre las que destacan la

presencia de múltiples elementos de inserción, tRNA para la síntesis de arginina así como genes que codifican para las proteínas MinCDE (Finan *et al.*, 2001) involucradas en el proceso de división celular. La presencia de estos genes demuestra que algunos plásmidos de *Rhizobium* son esenciales para la supervivencia de la bacteria.

### 1.3. Plásmidos en *Rhizobium*

Un plásmido es una molécula de DNA extracromosómico circular o lineal que se replica y se transcribe independientemente del DNA cromosómico. Estos replicones han sido encontrados en las tres formas representativas de vida nombradas dominios; *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Woese *et al.*, 1990) y pueden incorporar o liberar genes por recombinación o transposición favoreciendo cambios genéticos en poblaciones de bacterias (Del Solar *et al.*, 1998). En la naturaleza existen una gran cantidad de bacterias que interactúan con células eucariontes, por ejemplo la mayoría de especies de *Agrobacterium* son patógenos para las plantas mientras miembros del género *Rhizobium* fijan nitrógeno en simbiosis con leguminosas. A finales de los años 60 y a principios de los 70 quedó claro que ambos géneros poseen plásmidos de bajo número de copias y que la mayoría de los genes involucrados en las interacciones planta-microbio se encuentran en tales plásmidos (Higashi, 1967; Escobar y Dandekar, 2003).

El género *Rhizobium*, es muy conocido entre las bacterias gram negativas por su enorme cantidad de información genética extracromosomal. Esta información se encuentra en plásmidos que varían en tamaño, desde 150 hasta 1500 kb y son componentes comunes de *Rhizobium*. Gran parte de la información involucrada en simbiosis se encuentra en los plásmidos simbióticos (pSym) que pueden coexistir con otros, llamados plásmidos crípticos (García de los Santos *et al.*, 1996). Los plásmidos pueden comprender hasta una tercera parte del genoma de *Rhizobium* como es el caso de *Rhizobium etli* CFN42 (González *et al.*, 2006).

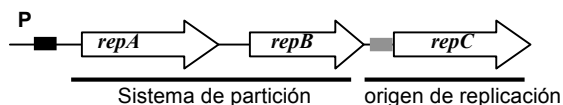
El estudio de los plásmidos en *Rhizobium* ha permitido describir diferentes funciones como son: fijación de nitrógeno, competencia para nodular, genes requeridos para la síntesis de lipopolisacáridos y otros genes catabólicos (Brom *et al.*, 2000). Estudios de genética de poblaciones en *Rhizobium*, basados en características cromosómicas y plasmídicas sugieren que la transferencia horizontal genética ocurre en poblaciones naturales (Schofield *et al.*, 1987).

#### 1.4. Orígenes de replicación en plásmidos de *Rhizobium*

En las bacterias del género *Rhizobium* se han localizado 3 familias de replicadores (*repABC*, *repC* y *repAC*). Un replicador es una región esencial la cual contiene los genes o loci involucrados en la replicación y control del plásmido (Del Solar *et al.*, 1998).

##### 1.4.1. Orígenes de replicación de la familia *repABC* en *Rhizobium*

La familia *repABC* consiste en un operón que se caracteriza por la presencia de 3 genes: *repA*, *repB* y *repC* y por la presencia de un gen que codifica un pequeño RNA antisentido que se transcribe en dirección opuesta al operón, este RNA contra-transcrito (ctRNA) no se traduce y está conservado ampliamente entre los genes *repB* y *repC* (Fig. 1.1) (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Los replicadores *repABC* se encuentran ampliamente distribuidos en las  $\alpha$  proteobacterias.



**Figura 1.1.** Representación de la región de replicación y partición de *repABC*. En flechas se observan los 3 genes que constituyen el operón: *repA*, *repB* y *repC*. P indica la posición de la región promotora del operón, en gris se muestra la secuencia que codifica para el ctRNA.

Este tipo de replicadores se ha encontrado en plásmidos y cromosomas en al menos 19 géneros de  $\alpha$  proteobacterias (Tabla 1.1) (Cevallos *et al.*, 2008). Algunas bacterias poseen varios plásmidos, cada uno conteniendo un operón *repABC*, además se ha encontrado que algunos plásmidos contienen 2 operones *repABC* funcionales. Un ejemplo de esta peculiaridad son *R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* 3841, las cuales contienen 6 plásmidos, todos pertenecientes a la familia *repABC*. Hay 2 replicones en *R. etli* CFN42 y uno en *R. leguminosarum* 3841 contienen 2 operones *repABC*, esto sugiere que diferentes plásmidos con *repABC* pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad (Young *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006). La incompatibilidad ocurre cuando 2 o más plásmidos no pueden coexistir en la misma célula como replicones independientes en ausencia de presiones selectivas o como consecuencia de un sistema de replicación o de partición similar.

Los productos de los genes *repA* y *repB* están involucrados en la partición y regulación de número de copias del plásmido, *repC* es esencial para la replicación y este es considerado como la proteína iniciadora (Bartosik *et al.*, 1998; Ramírez-Romero *et al.*, 2000; Tabata *et al.*, 1989).

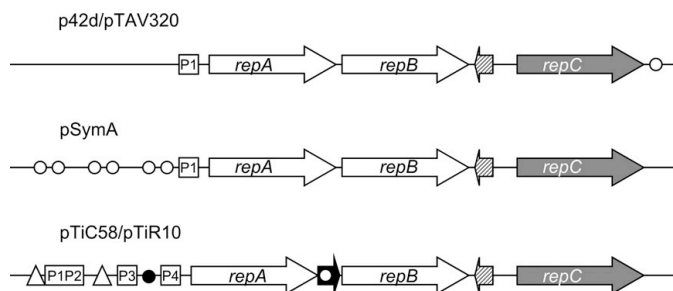
Tabla 1.1. Lista de especies bacterianas que contienen operones *repABC* en sus replicones

Cepa	Replicón	n	tamaño	Referencia	GenBank
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF5	pACRY01	1	203.5 Kb	Sin publicar	NC_009467
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4	pRiA4b	1	nd	Nishiguchi <i>et al.</i> , 1987	X04833
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599	pRi2659	1	185.4 Kb	Mankin <i>et al.</i> , 2007	EU186381
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> MAFF03-01724	pRi1724	1	217.5 Kb	Moriguchi <i>et al.</i> , 2001	NC_002575
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	ChrL*1	1	2.07 Mb	Goodner <i>et al.</i> , 2001	NC_003305
	pATC58	1	542.7 Kb		NC_003064
	pTiC58	1	214.2 Kb		NC_003065
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pTiB6S3	1	nd	Tabata <i>et al.</i> , 1989	M24529
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> R10	pTiR10	1	194.1 Kb	Zhu <i>et al.</i> , 2000	AF242881
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> MAFF301001	pTi-SAKURA	1	206.4 Kb	Suzuki <i>et al.</i> , 1998	NC_002147
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	pBBta01	1	228.8 Kb	Giraud <i>et al.</i> , 2007	NC_009475
<i>Brucella abortus</i> bv 1 str 9-941	ChrII	1	1.16 Mb	Halling <i>et al.</i> , 2005	NC_006933
<i>Brucella melitensis</i> bv abortus 2308	ChrII	1	1.15 Mb	Chain <i>et al.</i> , 2005	NC_007624
<i>Brucella melitensis</i> 16 M	ChrII	1	1.17 Mb	Del Vecchio <i>et al.</i> , 2002	NC_003318
<i>Brucella suis</i> 1330	ChrII	1	1.2 Mb	Paulsen <i>et al.</i> , 2002	NC_004311
<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840	ChrII	1	1.16 Mb	Sin publicar	NC_009504
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	p1	2	343.9 Kb	Sin publicar	NC_008242
	p2	1	131.2 Kb		NC_008243
	p3	1	47.5 Kb		NC_008244
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	pMLa	1	351.9 Kb	Kaneko <i>et al.</i> , 2000	NC_002679
	pMLb	1	208.3 Kb		NC_002682
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	p1	1	294.8 Kb	Sin publicar	NC_007959
	p2	1	188.3 Kb		NC_007961
	p3	1	121.4 Kb		NC_007961
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597	Obat HTCC2597a	1	nd	Sin publicar	NZ_AAAM001000009
	Obat HTCC2597b	1	nd		NZ_AAAM001000007
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	ChrII	1	1.89 Mb	Sin publicar	NC_009668
	pOANT01	1	170.3 Kb		NC_009669
	pOANT02	1	101.4 Kb		NC_009670
	pOANT03	2	93.5 Kb		NC_009671
<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	pHCG3	1	133 Kb	Fuhrmann <i>et al.</i> , 2003	NC_005873
<i>Paracoccus versutus</i> UW1	pTAV320	1	nd	Bartosik <i>et al.</i> , 1998	U60522
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	p42a	2	194.2 Kb	González <i>et al.</i> , 2006	NC_007762
	p42b	1	184.3 Kb		NC_007763
	p42c	1	250.9 Kb		NC_007764
	p42d	1	371.2 Kb	González <i>et al.</i> , 2003	NC_004041
	p42e	1	505.3 Kb	González <i>et al.</i> , 2006	NC_007765
	p42f	2	642.5 Kb		NC_007766
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> 3841	pRL7	2	151.5 Kb	Young <i>et al.</i> , 2006	NC_008382
	pRL8	1	147.4 Kb		NC_008383
	pRL9	1	352.7 Kb		NC_008379
	pRL10	1	488.1 Kb		NC_008381
	pRL11	1	684.2 Kb		NC_008384
	pRL12	1	870 Kb		NC_008378
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	pNGR234a	1	536.1 Kb	Freiberg <i>et al.</i> , 1997	NC_000914
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1.	pB	1	114.1 Kb	Sin publicar	NC_007488
	pD	1	100.8 Kb		NC_007490
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM	RnulSM	1	nd	Sin publicar	NZ_AAALY01000005
<i>Roseovarius</i> sp. 217	Ros217a	1	nd	Sin publicar	NZ_AAAMV01000007
	Ros217b	1	nd		NZ_AAAMV01000021
	Ros217c	1	nd		NZ_AAAMV01000023
<i>Roseovarius</i> sp. HTCC2601	Ros HTCC2601a	1	nd	Sin publicar	NZ_AATQ01000004
	Ros HTCC2601b	1	nd		NZ_AATQ01000009
	Ros HTCC2601c	1	nd		NZ_AATQ01000027
<i>Roseovarius</i> sp. TM1035	RosTM1035	1	nd	Sin publicar	NZ_ABCL01000010
<i>Ruegeria</i> sp. PR1b	pSD25	1	148.6 Kb	Zhong <i>et al.</i> , 2003	NC_004574
<i>Sagittula stellata</i> E-37	SsteE37	1	nd	Sin publicar	NZ_AAAYA01000007
<i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11	pSymA	1	nd	Stiens	Pers. Comm.
	pSymB	1	nd		
	pSmeSM11a	1	144.1 Kb	Stiens <i>et al.</i> , 2006	DQ145546
	pSmeSM11b	2	181.2 Kb	Stiens <i>et al.</i> , 2007	EF066650
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	pSymA	1	1.35 Mb	Barnett <i>et al.</i> , 2001	NC_003037
	pSymB	1	168.3 Kb	Finan <i>et al.</i> , 2001	NC_003078
<i>Sinorhizobium meliloti</i> MBA9	pMBA9a	1	nd	Watson y Heys, 2006	AY914873
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	pSMED01	1	1.5 Mb	Sin publicar	NC_009620
	pSMED02	1	1.24 Mb		NC_009621
	pSMED03	1	219.3 Kb		NC_009622
<i>Stappia aggregata</i> AM 12614	Sta IAM12614a	1	nd	Sin publicar	NZ_AAUW01000020
	Sta IAM12614b	1	nd		NZ_AAUW01000021
<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1	Sulfit NAS141a	1	nd	Sin publicar	NZ_AALZ01000014
	Sulfit NAS141b	1	nd		NZ_AALZ01000012
	Sulfit NAS141c	1	nd		NZ_AALZ01000013
	Sulfit NAS141d	1	nd		NZ_AALZ01000015
	Sulfit NAS141e	1	nd		NZ_AALZ01000011
<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	SulfitEE36	1	nd	Sin publicar	NZ_AAALV01000012
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	pXAUT01	1	316.1 Kb	Sin publicar	NC_009717

n= número de operones *repABC* en cada replicón

nd= tamaño de replicón no determinado

Entre los operones *repABC* hay algunas diferencias como las que involucran elementos de regulación transcripcional, diferencias relacionadas al número y posición de sitios *parS* y la presencia de minigenes que codifican péptidos dentro del operón *repABC*. Estas diferencias pueden observarse en la Fig. 1.2 (Cevallos *et al.*, 2008).



**Figura 1.2.** Las flechas blancas representan genes *repA* y *repB* que codifican proteínas involucradas en la partición y regulación transcripcional negativa del operón. Los círculos blancos muestran los sitios *parS*. El círculo negro muestra la caja *vir*. Las flechas sombreadas en la región río arriba de *repC* indican la posición del gen que codifica para el ctRNA y adyacente a estos en dirección opuesta se muestra la posición de los genes *repC* que codifican proteínas para replicación. La flecha negra representa el gen *repD*. Los cuadros muestran la posición de los promotores y los triángulos la posición de cajas *tra*. Tomado de M. A. Cevallos *et al.* 2008.

#### 1.4.1.1. Sistema de partición en replicones *repABC*

El sistema de partición frecuentemente se encuentra en módulos o cassettes, los cuales consisten típicamente de 2 proteínas (ParA y ParB), y un sitio de partición (*parS*) parecido a los centrómeros. La secuencia *parS* es específica en cada especie y es incompatible con otros plásmidos con un sitio idéntico o similar (Funnell, 2005). La proteína ParB se une a la secuencia *parS* y a la proteína ParA. En el sistema de partición de algunos plásmidos como el P1, ParA, ParB y *parS* corresponden a una ATPasa, una proteína de unión al centrómero y al sitio centrómero-partición respectivamente (Funnell, 2005). En general, el sistema de partición de plásmidos puede ser dividido en 2 familias, basándose en la homología de la secuencia de su ATPasa (Gerdes *et al.*, 2000).

El primer paso en la partición es la formación de un complejo en la secuencia *parS*. La proteína ParB al unirse a *parS* crea una estructura que segrega las copias de plásmidos a las células hijas. Las proteínas IHF también se unen a este sitio para formar parte de la estructura. El complejo de ParB e IHF con *parS* es llamado complejo de partición. El complejo formado es mediado por ParA que es una ATPasa oscilante que es capaz de formar estructuras helicoidales, esta ATPasa posiciona al plásmido en el centro del nucleóide de la bacteria, posteriormente separa y segrega a los plásmidos a las

células hijas (Ebersbach y Gerdes, 2004). Las evidencias bioquímicas y genéticas en cepas silvestres y en las mutantes ParA demuestran que la energía de unión e hidrólisis del ATP es necesaria en ParA para interactuar productivamente con ParB en el complejo de partición (Bouet y Funnell, 1999). También existe el sistema ParM del plasmido R1, en el cual la ATPasa (ParM) parecida a actina es codificada por *par*, locus que también codifica ParR y el sitio *parC* parecido al centromero en el cual se une ParR (Jensen *et al.*, 1998). De los 2 sistemas (ParA y ParM) *repAB* es similar a ParA.

Los replicones *repABC* tienen un número muy bajo de copias por lo que requieren un mecanismo eficiente de segregación para asegurar su propagación estable. RepA y RepB son parte de la maquinaria de segregación (Ramírez-Romero *et al.*, 2000). Los productos de los genes *repA* y *repB* del pSym de *R. etli* están involucrados en la partición del pSym y en la regulación del número de copias del plásmido (Cevallos *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que las proteínas RepA y RepB, y la secuencia *parS* son determinantes para la segregación en los plásmidos: pTiB6S3 de *A. tumefaciens*, pTAV320 de *Paracoccus versutus*, pCFN42d de *R. etli* y pSymA de *S. meliloti*. Los análisis genéticos y moleculares muestran que inserciones, mutaciones o deleciones en *repA* o *repB* disminuyen la estabilidad de los plásmidos (Tabata *et al.*, 1989; Bartosik *et al.*, 1998; Ramírez-Romero *et al.*, 2000). Los loci *parS* de los plásmidos mencionados anteriormente han sido identificados. Su secuencia consenso consiste de una o más copias palindrómicas de 16 pb (**GTTNNCNGCNGNNAAC**) y cumplen con 3 requisitos: primero, son esenciales para la estabilidad de los plásmidos; segundo, son sitios de unión para RepB y finalmente son incompatibles con su respectivo plásmido parental (Bartosik *et al.*, 1998; Soberón *et al.*, 2004).

El número de sitios *par* presentes en el locus *parS* de replicones *repABC* varía ampliamente. Algunos plásmidos como el pCFN42d contienen solo una secuencia consenso *par*, mientras algunos plásmidos como el pSymA de *S. meliloti* contienen 6 (Bartosik *et al.*, 2001; Soberón *et al.*, 2004). Sin embargo sólo una secuencia consenso es necesaria para una adecuada partición del plásmido.



#### 1.4.1.2. RepC en plásmidos *repABC*

La proteína RepC, codificada por el operón *repABC* tiene un papel limitante para la replicación. Las mutaciones, deleciones e inserciones en este gen anulan la capacidad de replicación de los plásmidos (Tabata *et al.*, 1989; Ramírez-Romero *et al.*, 2000). La secuencia RepC no tiene homología con otra función asignada. La mayoría de los genes *repC* están presentes en los operones *repABC*, y en todos los casos que han sido clonados esos operones, replican el plásmido en el que han clonado dentro de la bacteria parental, siendo vectores no replicables para la cepa en donde se introducen (Bartosik *et al.*, 1998; Turner y Young, 1995; Cevallos *et al.*, 2002).

La primera evidencia de que *repC* es la región mínima esencial y suficiente para la replicación fue obtenida de la inserción del gen *repC* del plásmido pTAV320 de *P. versutus* en un vector suicida bajo el control de un promotor, se obtuvieron transconjugantes de *P. versutus* (Bartosik *et al.*, 1998), esto indica que el gen *repC* es esencial para la replicación.

#### 1.4.1.3. Regulación de los plásmidos *repABC*

Los operones *repABC* poseen mecanismos de regulación para asegurar la producción y cantidad apropiada de la proteína iniciadora y de los productos de la partición para una replicación estable y para segregar los plásmidos recién replicados dentro de las células hijas. Este sistema incluye mecanismos de regulación transcripcionales y post-transcripcionales. Algunos son comunes en casi todos los plásmidos de la familia *repABC* mientras que otros sólo se encuentran en pocos miembros de la familia. La replicación de los plásmidos por *repABC* es influenciada por mecanismos de regulación positiva y negativa, *repA* o *repA* con *repB* son represores de la transcripción del operón (Pappas y Winans, 2003; Ramírez-Romero *et al.*, 2001). El gen entre *repB* y *repC* que codifica para un ctRNA actúa como un regulador post-transcripcional negativo de la expresión del gen *repC*, pero también es requerido para la replicación del plásmido (Venkova-Canova *et al.*, 2004). El número de copias de algunos plásmidos *repABC* es regulado positivamente por un mecanismo de respuesta en coro mediado por TraR y su autoinductor asociado (Li y Farrand, 2000).

Algunos replicadores *repABC* se transcriben de un operón *traI-trb* que se localiza en la región río arriba de *repABC* y otros no tienen genes en común con *traI-trb*. Un ejemplo de este tipo de operones se localiza en el plásmido pTiC58 de *Agrobacterium* el

cual tiene una sofisticada regulación. Su número de copias puede ser influido positiva y negativamente por factores externos que incluyen sistemas de respuesta en coro y factores liberados por el hospedero. En contraste los que no se relacionan con un operón *traI-trb* como el plásmido pCFN42d de *R. etli* parecen tener un mecanismo más simple de regulación.

Los plásmidos Ti de *Agrobacterium* modulan su número de copias y su transferencia conjugativa en respuesta a su densidad de población y por la presencia de señales químicas generadas por la planta hospedera. Los operones *repABC* de los plásmidos pTi, involucrados en la segregación y partición del plásmido, se transcriben en dirección opuesta de los genes *traI-trb*. La región intergénica entre estos 2 genes cuenta con 4 promotores y secuencias involucradas en su regulación transcripcional (Fig. 1.2) (Pappas y Winans, 2003; Li y Farrand, 2000). La actividad de los promotores P1, P2 y P3, y la transcripción del operón *traI-trb* es influenciada positivamente por TraR, homólogo a LuxR y tiene un papel central en el sistema de regulación por respuesta en coro en *Agrobacterium*. El dímero TraR ejerce su efecto en presencia de *N*-3oxooctanoyl-L-homoserina lactona (3-O-C<sub>8</sub>-AHL), un autoinductor sintetizado por TraI, y este involucra su unión a las cajas *tra* II y III (Fig. 1.2). La adición exógena de (3-O-C<sub>8</sub>-AHL) activa los promotores P1, P2 y P3 y produce un aumento en el número de copias del plásmido, probablemente aumentando la concentración intracelular de RepC, la proteína iniciadora. Este incremento en el número de copias del plásmido ha sido asociado con un aumento en la tumorigénesis (Pappas y Winans, 2003).

Otros genes reguladores que contribuyen al control del número de copias de los plásmidos son los sensores transmembranales como la cinasa VirA y su regulador responsable VirG que constituyen un sistema de 2 componentes que coordinan la expresión de los genes Ti *vir* y modulan la actividad transcripcional del operón *repABC*, positiva y negativamente. En un medio extracelular ácido, VirA puede detectar varios factores, incluyendo compuestos fenólicos y algunos monosacáridos liberados por la planta hospedera (Zhu *et al.*, 2000). Fosfo-VirG, la forma activa de la proteína se une a la secuencia de DNA llamada caja *vir*. La adición de acetosiringona, un componente fenólico usado como inductor, provoca un incremento en el número de copias de los plásmidos pTi58 y pTiR10, este efecto se anula en mutantes carentes de *virA* o *virG*. En el plásmido pTiR10 se identifica una caja *vir* entre los promotores P3 y P4 y la adición de

acetosiringona aumenta sólo la actividad del promotor P4 (Cho y Winans, 2005) que es capaz de mantener la replicación en ausencia del autoinductor y de los factores liberados por el hospedero (Pappas y Winans, 2003). *Agrobacterium* en vida libre contiene una copia del plásmido Ti por cromosoma y esta copia aumenta por un incremento en su población provocando un mecanismo de respuesta en coro y también aumenta por factores liberados por la planta hospedera.

Se ha observado que 2 pSym de *Rhizobium* (pRL1JI y pNGR234a) tienen semejanzas con los plásmidos Ti, ambos contienen un operón *traI-trb* adyacente a *repABC* que es transcrito en dirección contraria. El plásmido pRL1JI responde al mecanismo de respuesta en coro, mientras que el plásmido pNGR234a responde a factores liberados por el hospedero. En el plásmido pNGR234a la adición de daidzeína, un flavonoide que induce los genes *nod* en esta cepa también induce la transcripción de su operón *repABC*. Este mecanismo se desconoce aún, ya que la región promotora de *repABC* no contiene cajas *nod*, sitios al cual NodD, se une al DNA (Perret *et al.*, 1999).

No todos los plásmidos contienen un operón *traI-trb* o son regulados por el mecanismo de respuesta en coro. El pSym de *R. etli* (pCFN42d) contiene un pseudogen *traI* en la región río arriba del operón *repABC*, pero carece de genes *trb*. Los análisis genéticos y moleculares muestran que este operón contiene sólo un promotor en la región río arriba de *repA* y es activado por SigA, el factor sigma de expresión constitutiva de *Rhizobium* (Ramírez-Romero *et al.*, 2001). Esto sugiere que en la transcripción de *repABC* de pCFN42d el promotor no es influenciado por señales externas.

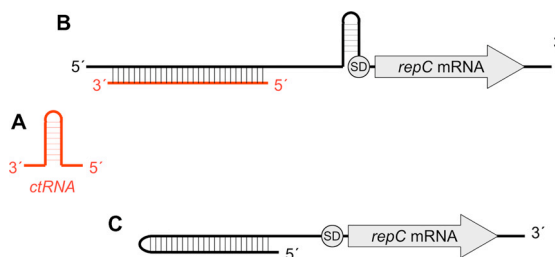
Detallados análisis de pCFN42d y pTiR10 revelan que RepA y RepB son reguladores negativos de la transcripción del operón *repABC*, RepA se une a una región operadora a pocas bases río abajo de *repABC*, estimulada por RepB. RepA, una ATPasa débil, se une a la región operadora en presencia de ATP o ADP. El centro de la región operadora consiste de una secuencia de un palíndromo imperfecto, deleciones en esta región da como resultado una expresión constitutiva. (Ramírez-Romero *et al.*, 2001).

Una característica universal de los operones *repABC* es la presencia de una secuencia intergénica entre los genes *repB* y *repC*, la cual provoca incompatibilidad con su plásmido parental (Ramírez-Romero *et al.*, 2000) y tiene una alta similitud con regiones

que codifican para un ctRNA. Los promotores para los genes que codifican los RNAs antisentido son conservados en secuencia y tienen similitudes con la secuencia consenso del promotor  $\sigma 70$  de *E. coli* (Venkanova-Canova *et al.*, 2004). La secuencia consenso del promotor ctRNA es TTGACAGTGATTTCGTGGAAATGTGATTCT en la que se observa subrayadas las regiones -10 y -35.

La estructura secundaria predicha del ctRNA es un tallo asa con una cola rica en uracilo en la terminación 3' pareciéndose a los terminadores transcripcionales independientes de Rho. Las regiones intergénicas entre *repB* y *repC* que contienen mutaciones que anulan la actividad promotora del gen que codifica para el ctRNA, son incapaces de ejercer incompatibilidad con su plásmido parental. Se cree que el ctRNA podría estar modulando los niveles de RepC y por lo tanto el número de copias de los plásmidos. Chai y Winans (2005) describe un modelo en el que propone que el mRNA de *repABC* tiene 2 estructuras secundarias alternativas, en las cuales el ctRNA está unido, o no unido con su secuencia complementaria. En ausencia del ctRNA la sección del mRNA de *repABC* que incluye la región intergénica entre *repB* y *repC* forma una estructura en forma de tallo asa, donde solamente el codón de inicio de *repC* y la secuencia predicha del sitio de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno) quedan en la cadena sencilla (Fig. 1.3 C). En esta conformación la traducción de *repC* es permitida. En la secuencia del mRNA de *repABC* cuando se encuentra presente el ctRNA se forma un tallo asa en la región río arriba de *repC* cerca del codón de inicio ocluyendo el Shine-Dalgarno (Fig. 1.3 A), de este modo se suprime la traducción de *repC*.

**Figura 1.3.** **A)** estructura secundaria del ctRNA. **B)** Heterodúplex de mRNA ctRNA-*repABC*, la secuencia del Shine-Dalgarno es ocluida por la estructura del tallo asa, atenuando la traducción de *repC*. **C)** En ausencia del ctRNA, el mRNA de *repABC* adopta estructura alternativa en la cual la secuencia del Shine-Dalgarno es totalmente accesible al ribosoma. Tomado de M. A. Cevallos *et al.* 2008.



#### 1.4.2. Orígenes de replicación de la familia *repC* en *Rhizobium*

La segunda familia de replicadores son los *repC*. Estos están relacionados evolutivamente con los replicadores de la familia *repABC*. El gen *repC* codifica la proteína iniciadora, pero en contraste con la organización *repABC* no se encuentran asociados con los genes *repA* y *repB* (Mercado-Blanco y Olivares, 1994). El primer miembro de esta familia fue aislado de

pRmeGR4a que es un plásmido críptico auto-transferible de *S. meliloti* GR4, y después se observó que este plásmido se encuentra en poblaciones naturales de *S. meliloti*, *Sinorhizobium fredii* y *R. tropici* (Burgos *et al.*, 1996; Mercado-Blanco y Olivares, 1993; Villadas *et al.*, 1995). De esta familia de replicadores se ha estudiado poco acerca de sus mecanismos de regulación.

Se ha demostrado, que en el plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* se localiza un gen en la región río arriba de la secuencia *repC* que codifica para un ctRNA. Este tiene un papel fundamental como un regulador negativo de la expresión del gen *repC* y es un sitio de incompatibilidad para este plásmido. Esta región nombrada *incI* (Izquierdo *et al.*, 2005), tiene similitud con los genes que codifican para los ctRNAs localizados entre *repB* y *repC* de los replicadores de la familia *repABC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004) y es responsable de incompatibilidad.

En el plásmido pRmeGR4a la región mínima replicable consiste de 2 genes, uno que codifica para la proteína RepC y el otro para un ctRNA que sólo interactúa con *repC* ya que no modula los productos codificados en el plásmido, además de que tiene una estructura parecida a un tallo asa, por lo que actúa como un terminador transcripcional independiente de Rho regulando negativamente el promotor de *repC* (Izquierdo *et al.*, 2005).

Las regiones promotoras de los genes que codifican para los ctRNAs de los replicadores *repABC* son parecidas a la región promotora del gen que codifica el ctRNA del gen *repC* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti*. La diferencia entre ambos replicadores consiste en la presencia de un sistema activo de partición codificado por los genes *repA* y *repB* y que además ejercen una regulación negativa de la transcripción del operón.

#### **1.4.3. Orígenes de replicación de la familia *repAC* en *Rhizobium***

La familia *repAC* contiene un sistema de replicación que consiste solamente de *repA* y un gen parecido a *repC*, se ha encontrado al menos en el plásmido pRL7jl de *R. leguminosarum* (Young *et al.*, 2006). El gen *repC* ha sido encontrado en estrecha asociación con *repA*, pero no con *repB* o algún RNA antisentido y estos genes son

capaces de mantener su replicación en *Rhizobium* (Pérez-Segura y Cevallos, datos sin publicar).

### 1.5. *Rhizobium tropici*

Se llamada *tropici* por crecer cerca de y en el trópico, nativa de Brasil y México pero también ha sido aislada de nódulos de *P. vulgaris* de suelos ácidos en Kenya, y en suelos arenosos del suroeste de Francia. Es una bacteria aeróbica, gram-negativa, la cual forma colonias circulares, convexas, semitranslúcidas y usualmente crece de 2 a 4 mm de diámetro durante 2 a 4 días en medio de levadura peptona (PY). Producen ácido en medio de levadura malta (YM). No producen 3-cetolactosa sin embargo crecen en medio mínimo (MM) conteniendo lactosa y son resistentes al ácido nalidíxico (Martínez-Romero *et al.*, 1991).

*Rhizobium tropici*, bacteria con un amplio rango de nodulación, es capaz de sobrevivir en suelos con pH ácido y metales pesados. La cepa *R. tropici* PRF81 se ha usado como inoculante en suelos brasileños (Hungria y Vargas, 2000; Mostasso *et al.*, 2002). Esta cepa no tiene ninguna modificación genética, sin embargo es capaz de mejorar la productividad agrícola en suelos cuyo pH sea <5.0, presenten toxicidad por aluminio, bajo contenido de fósforo, insuficiente agua y altas temperaturas ambientales. *R. tropici* se divide en dos subgrupos (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Subgrupos de *Rhizobium tropici*.

<i>Rhizobium tropici</i>	
Subgrupo A CFN299	Subgrupo B CIAT 899
Crecimiento 30°C	Crecimiento 30 a 40°C
Colonias en YM blancas opacas	Colonias en YM translúcidas
No móvil en agar 0.3%	Móvil en agar 0.3%
Requiere Ca <sup>+</sup> en PY	No requiere Ca <sup>+</sup> en PY
Susceptibles a antibióticos y metales pesados	Resistente a Ni, Pb, Co, Cu, Ag y Cr
Resistente al ácido nalidíxico	Resistente a cloranfenicol, carbenicilina, espectinomicina y rifampicina
No produce clorosis	Produce clorosis

*R. tropici* establece asociaciones simbióticas con múltiples leguminosas (Hernández-Lucas *et al.*, 1995b.) (Tabla 1.3), posee una gran versatilidad metabólica para la utilización de diferentes fuentes de carbono tanto en vida libre como en simbiosis.

Tabla 1.3. Rango de hospedaje de *Rhizobium tropici* capaces de nodular frijol

	Características de nódulos formados con:		
	<i>R. tropici</i>		
	CIAT899	UMR1173	CFN299
<i>Albizia lebbek</i>	N + F	N + F	N + F
<i>Cajanus cajan</i>	N	N	N
<i>Canavalia ansiformis</i>	N	N	N
<i>Clianthus formosus</i>	F	N	F
<i>Crotalaria sericia</i>	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	0	0	0
<i>Desmanthus illinoensis</i>	F	0	F
<i>Desmosium canadense</i>	F	0	F
<i>Flemingia congesta</i>	0	0	0
<i>Gliricidia maculata</i>	F	F	F
<i>Glycine max</i>	N	N	N
<i>Indigofera tinctoria</i>	N <sup>s</sup>	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F
<i>Leucaena leucocephala</i>	F	F	F
<i>Lotus corniculatus</i>	F	0	F
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F
<i>Phaseolus angularis</i>	N <sup>s</sup>	N <sup>s</sup>	N <sup>s</sup> + F
<i>Phaseolus vulgaris</i>	F	F	F
<i>Sesbania exaltata</i>	F	0	F
<i>Tephrosia vogelii</i>	N	N	N
<i>Vigna umbellata</i>	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F
<i>Vigna unguiculata</i>	N + F	N + F	N + F
<i>Vigna vexillata</i>	N <sup>s</sup> + F	N <sup>s</sup> + F	F

N<sup>s</sup>, nódulos carentes de leghemoglobina y conteniendo adicionalmente células senescentes oscurcidasTomado de Hernández-Lucas *et al.* 1995b.

N, nódulos carentes de leghemoglobina

F, nódulos con leghemoglobina

0, sin nódulos

## 1.6. Estructura genómica de *R. tropici* CFN299

La estructura genómica de *R. tropici* CFN299 se encuentra constituida por un cromosoma de aproximadamente 3000 kb, un megaplásmido de 1500 kb, un plásmido simbiótico (pSym) de 600 kb y dos plásmidos: el plásmido A (pA) de 180 y el plásmido B (pB) de 240 kb (Geniaux *et al.*, 1995). Se ha observado que *exoF* se encuentra en el megaplásmido, en el pA se localizan genes para el transporte de compuestos exudados por la raíz del frijol (Rosenblueth *et al.*, 1998) y el pB parece estar relacionado con la competitividad de la bacteria (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990). Para ampliar los conocimientos sobre el pSym de *R. tropici* CFN299 se ha desarrollado un sistema de clonación en vivo para aislar plásmidos de *Rhizobium* en *E. coli*. Con esta estrategia se logró clonar fragmentos (300-550 kb) del pSym de *R. tropici* CFN299 (Hernández-Lucas *et al.*, 2002). Los fragmentos clonados se encuentran sobrelapados y cubren la mayor parte de este replicón. También se ha secuenciado parcialmente un fragmento de 300 kb del pSym de *R. tropici* CFN299. El análisis de secuencia revela que este plásmido contiene una alta densidad de genes codificables entre los que se encuentran genes de nodulación, fijación de nitrógeno, transferencia, replicación, quimiotaxis, metabolismo primario, reguladores, transportadores así como un número discreto de secuencias de inserción.

## II. ANTECEDENTES

La estructura genómica de *R. tropici* CFN299 presenta un plásmido simbiótico de 600 kb. En estudios previos se ha analizado el papel de algunos de sus genes, entre los cuales algunos codifican para enzimas de rutas metabólicas tales como la citrato sintasa (Hernández-Lucas *et al.*, 1995a) y la isocitrato liasa, enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y en el ciclo de glioxilato. Las mutantes en el gen de citrato sintasa afectan el proceso simbiótico, sin embargo, las mutantes en los genes del ciclo del glioxilato no afectan el desarrollo de la relación entre *R. tropici* CFN299 y la leguminosa (Ramírez-Trujillo *et al.*, 2007).

Se ha establecido que el pSym de *R. tropici* CFN299 al ser transferido a otras bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* (que no cuenta con el plásmido Ti que le confiere la patogenicidad) adquiere la habilidad de nodular y fijar nitrógeno; sin embargo dicha habilidad es muy baja, 10 al 25 % por planta comparado con la cepa donadora *R. tropici* CFN299 (Martínez-Romero *et al.*, 1987). Otra bacteria a la cual se le transfirió este plásmido simbiótico es *Ensifer adherens* (actualmente conocido como *Sinorhizobium adherens*) la cual adquirió las mismas características de simbiote mutualista con una fijación biológica de nitrógeno baja con respecto a *R. tropici* CFN299 (Rogel *et al.*, 2001). Si el pSym es transferido a patógenos como *Brucella melitensis* esta bacteria es capaz de inducir esporádicamente pseudonódulos incapaces de fijar nitrógeno. Otra de las características del pSym es que no se ha podido curar, de las 600 kb que lo constituyen sólo se han podido deletar 300 kb las cuales comprenden los genes para nodular y fijar nitrógeno. Mavingui y colaboradores (1997), señalan que 30 kb del pSym de *R. tropici* CFN299 intervienen no solo en la capacidad de nodular *M. atropurpureum*, sino que le otorga a la bacteria una mayor competitividad en comparación a la cepa silvestre. Cabe señalar que el aumento de número de copias de este fragmento es suficiente para hacer más eficiente a la bacteria en nodulación. Por todo lo anterior, el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 no sólo tiene un papel determinante en la relación simbiótica con las leguminosas, sino que tiene características únicas que otros plásmidos simbióticos no poseen.

El presente trabajo tiene como interés identificar cuál es el replicador básico del pSym de *R. tropici* CFN299, ya que estudios realizados previamente indican que posee un gen del tipo *repC* (Burgos *et al.*, 1996), pero al secuenciar parcialmente un fragmento de 390 kb del pSym (Hernández-Lucas *et al.*, 2002) se identificaron secuencias que indican la presencia de 2 replicadores, uno del tipo *repABC* y otro de



tipo *repC*. Para resolver nuestra pregunta se aislaron ambos replicadores, se clonaron y se evaluó su funcionalidad en *A. tumefaciens*.

### III. OBJETIVOS

- Aislar el origen de replicación básico del plásmido simbiótico (pSym) de *Rhizobium tropici* CFN299.
- Aislar, clonar y secuenciar los orígenes de replicación, (operón *repABC* y el gen *repC*) del pSym de la cepa *R. tropici* CFN299.
- Determinar la funcionalidad de cada uno de los replicadores.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas y plásmidos utilizados

Las cepas y los plásmidos empleados en este trabajo se enlistan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia
<b>Cepas</b>		
<i>R. tropici</i>		
CFN299	Cepa Silvestre (Nal <sup>r</sup> )	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991
CFN299-10	CFN299 Δ pSym	Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990
RH271	<i>R. tropici</i> CFN299 + A780 integrado en pSym	Este trabajo
<i>A. tumefaciens</i>		
GMI 9023	C-8 curada de plásmidos nativos (Rif <sup>r</sup> )	Rosenberg y Huguet, 1984
<i>E. coli</i>		
DH5α	F <sup>+</sup> Φ80d/lacZΔM15endA1 recA1	Gibco BRL
HB101	hdsR17(r <sub>k</sub> -m <sub>k</sub> ) thi-1supE44λ gyrA96 SupE44hdsS20 (r <sub>b</sub> <sup>-</sup> m <sub>b</sub> <sup>-</sup> ) recA13 ara-14 proA2lacY1galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1	Gibco BRL
<b>Plásmidos</b>		
pCR2.1	Vector de clonación para productos de PCR, Km <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pRK 2013	Replicón ColE1 con región de transferencia RK2 Km <sup>r</sup> Nm <sup>r</sup>	Figurski y Helinski, 1979
pUX19	Derivativo de pUK21 con oriT de pSUP202. Km <sup>r</sup> Vector suicida para <i>A. tumefaciens</i> y <i>R. tropici</i>	Lies y Roberts*
pBAC A303	390 kb pSym <i>R. tropici</i> CFN299 en pBAC Cm <sup>r</sup> sp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2002
A610	pUX19 con fragmento <i>Sall</i> y <i>HindIII</i> de 1807 pb conteniendo <i>repC</i> y <i>repB</i> incompleto, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
A627	pUX19 con fragmento <i>BamHI</i> de 7 kb conteniendo operón <i>repABC</i> , derivativo de pBAC A303 Km <sup>r</sup>	Este trabajo
A763	pCR2.1 con PCR de 2591 pb conteniendo el gen <i>repC</i> sin codón de paro Km <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
A766	pUX19 con fragmento <i>Pst</i> I- <i>BamHI</i> de 6 kb conteniendo <i>repABC</i> sin 368 pb iniciales de <i>repA</i> , derivativo de pBAC A303 Km <sup>r</sup>	Este trabajo
A780	pUX19 con 2591 pb, conteniendo <i>repC</i> sin codón de paro, derivativo de A763, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
A789	pUX19 conteniendo gen <i>repC</i> completo, clonado in vivo, derivativo de RH271 Km <sup>r</sup>	Este trabajo
A802	pUX19 con fragmento <i>BamHI</i> - <i>MluI</i> de 5.5 kb conteniendo el operón <i>repABC</i> , derivativo de pBAC A303 Km <sup>r</sup>	Este trabajo

\* Datos sin publicar

## 4.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *R. tropici* CFN299 fueron crecidas en medio PY (Noel *et. al.*, 1984) a 30 °C, las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* en medio LB (Sambrook *et. al.*, 1989) a 37 °C. Para medios sólidos se agregó 15 g de agar por litro. Cuando fue necesario los medios fueron suplementados con antibióticos (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Antibióticos utilizados para la selección de cepas

Antibiótico	Solución concentrada (mg/mL)	solvente	Concentración para <i>E. coli.</i> (µg/mL)	Concentración para <i>R. tropici.</i> (µg/mL)	Concentración para <i>A. tumefaciens.</i> (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	100	H <sub>2</sub> O	100		
Gentamicina (Gm)	30	H <sub>2</sub> O	20	20	
Estreptomicina (sm)	50	H <sub>2</sub> O	25	50	
Espectinomicina (Sp)	50	H <sub>2</sub> O	25	50	
Ácido nalidixico (Nal)	30	NaOH 0.1M	20	20	
Tetraciclina (Tc)	10	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH al 50%	10	10	
Rifampicina (Rif)	10	CH <sub>3</sub> OH	10		50
Kanamicina (Km)	50	H <sub>2</sub> O	40	40	

## 4.3. Transformación bacteriana

Las construcciones obtenidas (vectores con genes clonados) se transformaron en células competentes *E. coli* DH5α y *E. coli* HB101 (Gibco BRL) (ver apéndice II).

## 4.4. Conjugación bacteriana

Para los experimentos de conjugación se utilizó como ayudador el plásmido pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979) y *A. tumefaciens* GMI 9023 (Rosenberg y Huguet, 1984) como receptora de los replicadores. Como control positivo se utilizó el gen *repC* del plásmido pRmeGR4a clonado en pUX19 y como control negativo el plásmido pUX19 (ver apéndice II).

## 4.5. Purificación de DNA

El DNA total (cromosómico y plasmídico) de las cepas se aisló mediante un estuche comercial (Amersham Biosciences, GenomicPrep cells and tissue DNA isolation) y los plásmidos fueron purificados con un estuche High pure plasmid isolation (Roche Applied Science, Germany).

#### 4.6. Southern blot

Para la hibridación, los DNAs fueron purificados y digeridos con enzimas de restricción, después fueron transferidos de geles de agarosa a membranas de nylon. Las sondas fueron marcadas con  $^{32}\text{P}$ . El experimento se realizó bajo condiciones de alta estringencia (Southern, 1975; Sambrook *et al.* 1989) (ver apéndice II).

#### 4.7. Amplificación por PCR y clonación

Los oligonucleótidos usados en este trabajo se diseñaron usando el programa OLIGO 2.1 y fueron sintetizados por la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM (tabla 4.3.). Para las reacciones de PCR se utilizó el estuche GeneAmp XL PCR (Roche Applied Biosystems) y se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Roche Applied Biosystems). Como vectores de clonación se utilizaron los plásmidos pUX19 (Lies y Roberts, datos sin publicar) y pCR 2.1 (invitrogen) para clonar los PCRs.

**Tabla 4.3** Oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia	Tm
<i>repABC</i>		
Upper Primer REP1	[5'-GCG GAA AAT TAC ATC TCG ATC A-3']	62°C
Lower Primer REP2	[5'-TAG AGG CAA TTA GGG TAC GTG G-3']	66°C
Lower Primer REPABC4	[5'-AAT GGC TGG GCA GTT GTA GAA T-3']	64°C
<i>repC</i>		
Upper Primer REP4	[5'-AGC AAA TGA AAA ATA TCG TGT A-3']	56°C
Lower Primer REP5	[5'-ATC CGC CAG ACC GAA GAC CGA G-3']	72°C
Upper Primer REPC7	[5'-TTC TGG AAA AAG CAA ATC GG-3']	56°C

#### 4.8. Perfil de plásmidos

Para visualizar los plásmidos de alto peso molecular se realizaron geles de agarosa modificados de Eckhardt (Hynes y McGregor, 1990).

#### 4.9. Secuenciación

Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador automático (Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18), utilizando los oligonucleótidos universal y reverso (m13/pUC -40 FORWARD 5'-GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA-3' y m13/pUC REVERSE 5'-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3').

#### **4.10. Análisis de Secuencias**

Las secuencias se analizaron con el programa BLAST del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

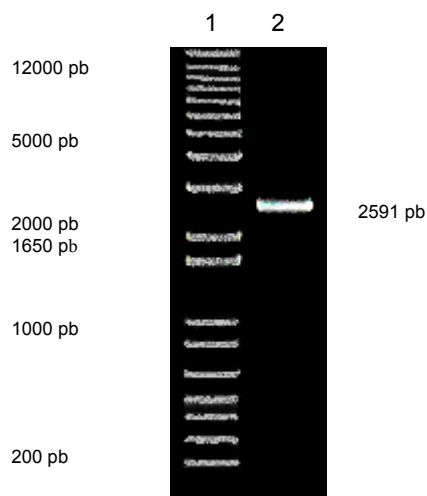
## V. RESULTADOS

Los experimentos previos revelan que el pSym de *R. tropici* CFN299 posee un replicador *repC* (Burgos *et al.*, 1996); sin embargo, los resultados en nuestro laboratorio revelan la presencia de 2 replicadores, uno *repC* y otro *repABC*. Es de nuestro interés determinar la funcionalidad de cada uno de estos replicadores; para establecer cuál es el replicador funcional en el pSym de *R. tropici* CFN299 por lo que se aislaron y evaluaron ambos replicadores.

### V. I. Caracterización del gen *repC*

#### 5.1.1. Aislamiento del replicador tipo *repC*

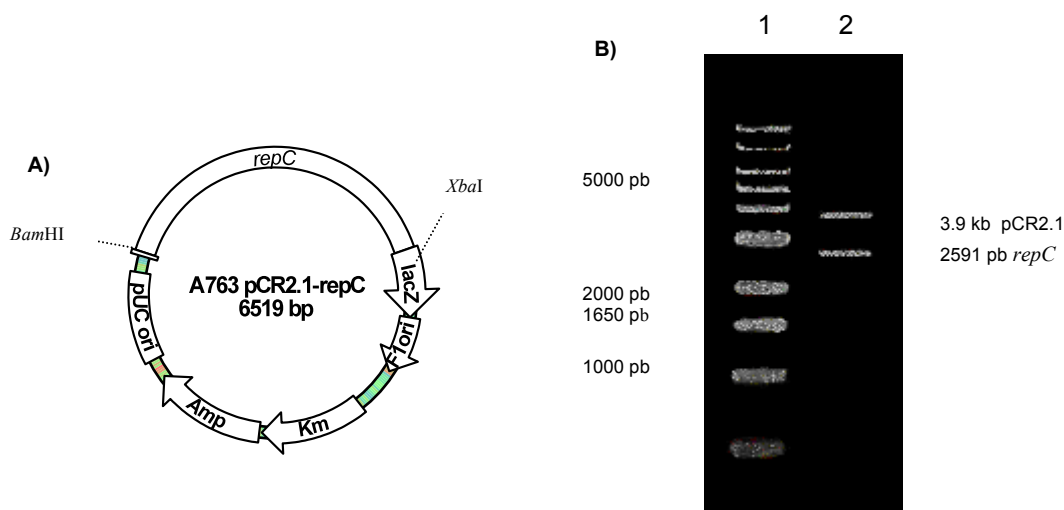
El análisis de secuencia de un fragmento de 390 kb del pSym de *R. tropici* CFN299 reveló la presencia de un fragmento de DNA, homólogo al gen *repC* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* (Mercado-Blanco y Olivares, 1994; Izquierdo *et al.*, 2005). Basándose en la secuencia analizada de *R. tropici* CFN299 se diseñaron oligonucleótidos y se amplificó parte del gen *repC* de esta cepa por PCR, usando como templado DNA del pBAC de la cepa A303 (390 kb del pSym de *R. tropici* CFN299) y los oligonucleótidos REP4 y REP5. Se obtuvo un fragmento de 2591 pares de bases (pb) (Fig. 5.1).



**Figura 5.1.** Gel de agarosa mostrando la amplificación por PCR del gen *repC* del pSym de *R. tropici* CFN299, usando como templado DNA del plásmido A303. Se usaron los oligonucleótidos REP4 y REP5. Carril 1 se observa el marcador de DNA 1Kb plus DNA ladder y carril 2 muestra el tamaño del replicador amplificado de un tamaño aproximado de 2591 pb. El tamaño aproximado se obtuvo mediante un análisis de secuencia

### 5.1.2. Clonación de la secuencia amplificada *repC* en el plásmido pCR 2.1

El plásmido pCR 2.1 tiene resistencia a kanamicina (Km) y Ampicilina (Amp) con selección positiva (*lacZ*), esto permite la generación de clonas blancas y azules. Cuando se interrumpe el gen *lacZ* como resultado se obtienen clonas blancas que sugiere la integración en el plásmido del gen de interés. Se utilizó este plásmido debido a que no se requieren sitios de restricción específicos para clonar fragmentos sino que el vector posee extremos de timina, los cuales se unieron a los extremos de adenina del PCR *repC* que fueron sintetizados por acción de la Taq polimerasa. Se seleccionaron las clonas blancas las cuales interrumpieron el gen *lacZ*. Así se obtuvo la construcción A763 (pCR 2.1- *repC*). (Fig. 5.2 A). Se hicieron digestiones con enzimas de restricción de la construcción para verificar que *repC* estuviera clonado (Fig. 5.2 B).



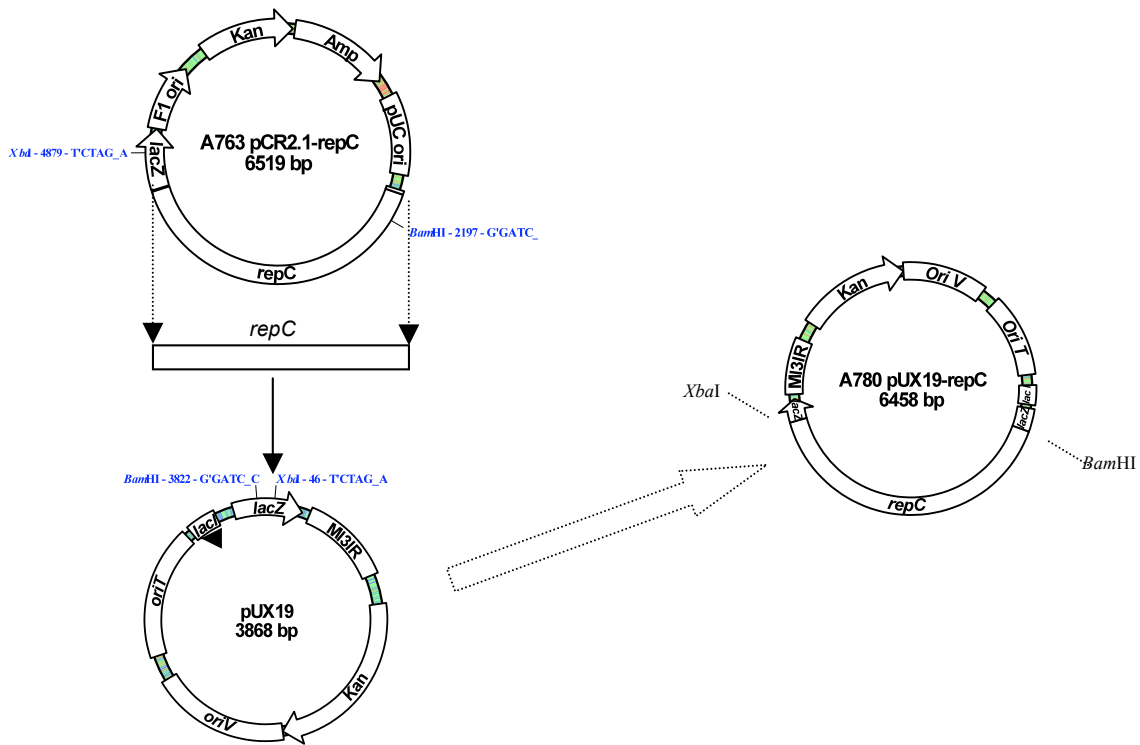
**Figura 5.2.** A) Construcción A763, obtenida a partir del PCR *repC* clonado en el plásmido pCR 2.1. B) Gel de agarosa mostrando en el carril 1 marcador 1Kb plus DNA ladder, carril 2, digestión de A763 con *Bam*HI y *Xba*I, se observan 2 fragmentos, uno del plásmido pCR 2.1 de 3.9 kb y otro del *repC* de 2591.

### 5.1.3. Clonación del gen *repC* en el plásmido pUX19

El vector pUX19 es derivado de pUK21 (Viera y Messing, 1991), con un replicador *oriV* (origen de replicación) derivado del plásmido pMB1 y un *oriT* (origen de transferencia conjugativa) de pSUP202 (Simon *et al.*, 1983). Como marcador de selección posee resistencia a Km y selección positiva (*lacZ*), plásmido construido por Lies y Roberts (Datos sin publicar). Es un vector incapaz de replicarse en *A. tumefaciens* y *R. tropici*, por esta razón se utilizó pUX19 para clonar los replicadores del pSym, ya que al ser transferido a *A. tumefaciens* sólo tendremos replicación del plásmido si el origen de replicación es funcional.

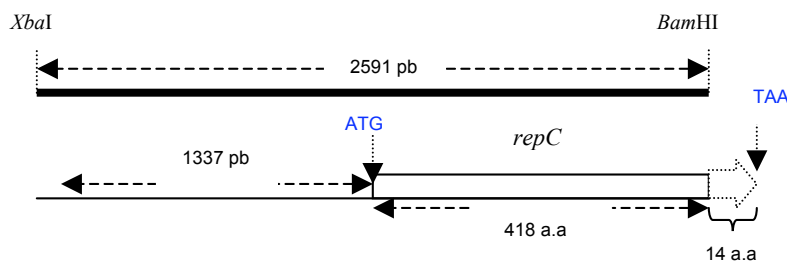


La secuencia *repC* contenida en la construcción A763 (pCR 2.1-*repC*) se clonó en el plásmido pUX19. Se obtuvo la construcción A780 (pUX19-*repC*) (Fig. 5.3) que se transformó a DH5 $\alpha$  para posteriormente realizar cruzas con *A. tumefaciens*.



**Figura 5.3.** La construcción A763 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I separando así *repC*, que se ligó en el vector de clonación pUX19 digerido también con *Bam*HI y *Xba*I, obteniendo la construcción A780 pUX19-*repC* con un tamaño aproximado de 6458 pb.

El análisis de secuencia de la clona A780 reveló la presencia de 2591 pb del DNA del pSym de *R. tropici* CFN299, el cual codifica para el gen *repC*. Sin embargo esta construcción no posee los 14 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de *repC* (Fig. 5.4).



**Figura 5.4.** Fragmento *Xba*I-*Bam*HI clonado en pUX19 para obtener la construcción A780. La secuencia *repC* clonada codifica para 418 aminoácidos, en gris se muestran los 14 aminoácidos faltantes, se esquematiza el codón de inicio (ATG) y término (TAA) además de 1337 pb del promotor probable.

#### 5.1.4. Transferencia de A780 (pUX19-*repC*) a *A. tumefaciens*

El plásmido de la cepa A780 en *E. coli* DH5 $\alpha$  (cepa donadora) se transfirió a *A. tumefaciens* (cepa receptora) en presencia de pRK2013 como ayudador. Este experimento se realizó para verificar si la secuencia *repC* clonada es capaz de replicarse autónomamente. No se obtuvieron transconjugantes, por lo tanto la secuencia *repC* que codifica para 418 aminoácidos de 432 del gen *repC* no se replica en *A. tumefaciens*.

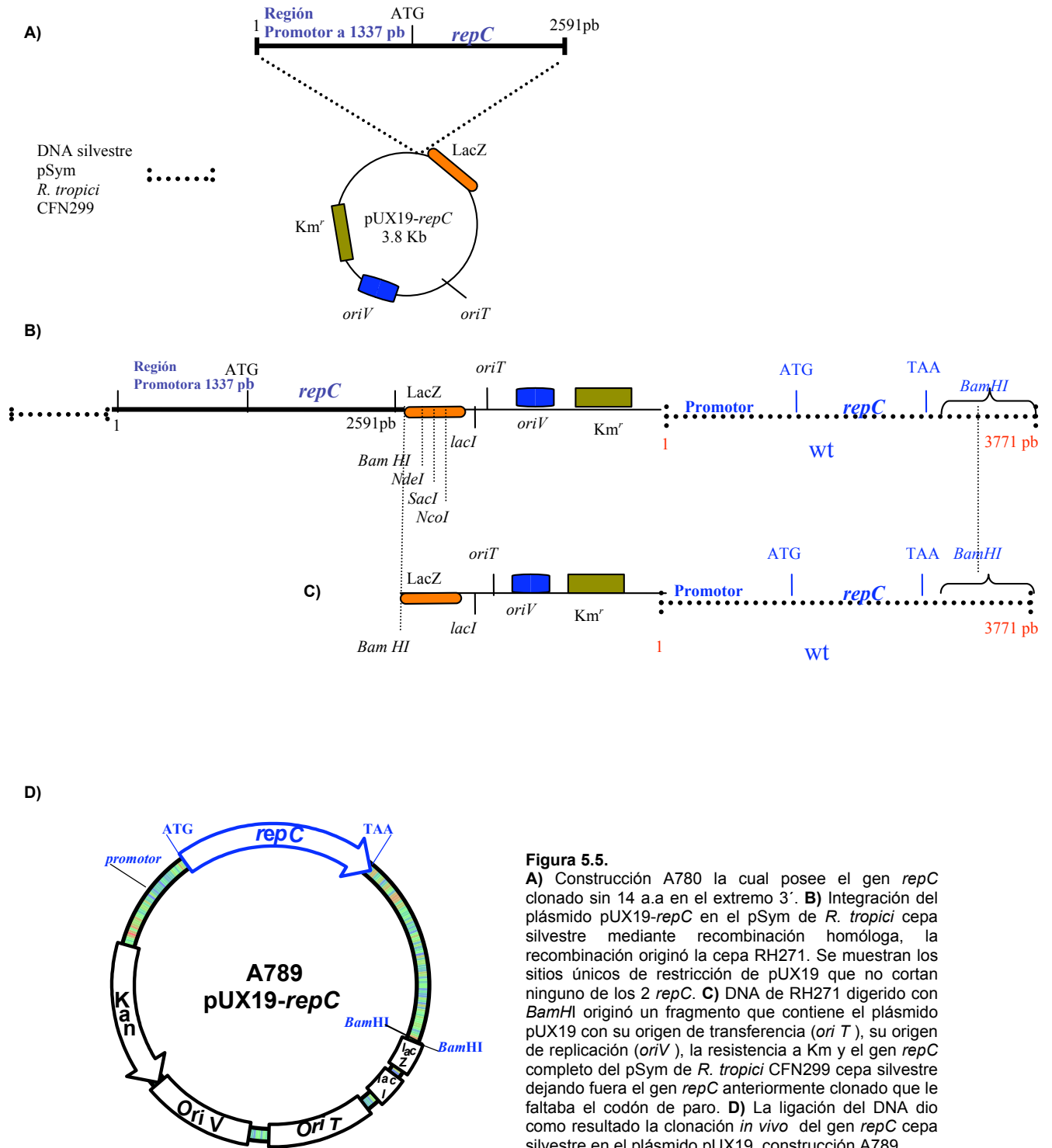
#### 5.1.5. Clonación en vivo del gen *repC*

Debido al resultado anterior, en el cual se muestra que *repC* es incapaz de replicarse en *A. tumefaciens*, decidimos obtener el gen *repC* completo, desde la región promotora hasta el codón de paro y así probar su funcionalidad. Para tal experimento se purificó el plásmido de la cepa A780 contenido en *E. coli* DH5 $\alpha$  y se transformó a *E. coli* HB101 para obtener la cepa sensible a ácido nalidixico y resistente a Km. Esta cepa se conjugó con *R. tropici* CFN299 mediante el ayudador pRK2013. A las transconjugantes obtenidas RH271 (*R. tropici* CFN299+pUX19-*repC* integrado en el pSym) resistentes a ácido nalidixico y Km se les purificó el DNA.

Teóricamente el plásmido pUX19-*repC* recombinó en el pSym de *R. tropici* CFN299 (Fig. 5.5 A y B), un análisis de restricción de pUX19-*repC* reveló 4 sitios únicos de restricción, *Bam*HI, *Nde*I, *Sac*I y *Nco*I (Fig. 5.5 B), por lo que supusimos que el gen *repC* del pSym de *R. tropici* cepa silvestre, tampoco podría ser cortado por ninguna de las 4 enzimas antes mencionadas.

Para obtener el gen *repC* de *R. tropici* CFN299 cepa silvestre se digirió el DNA total de la cepa RH271 (*R. tropici* CFN299 + pUX19-*repC* integrado en el pSym) con la enzima *Bam*HI (Fig. 5.5 C), posteriormente se religó y se transformó en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ ; se obtuvieron 12 colonias positivas resistentes a Km. El análisis de restricción de una de estas clonas reveló que se clonó *in vivo* el gen *repC* completo del pSym de *R. tropici* CFN299 cepa silvestre en un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 10 kb, este fragmento incluye el plásmido pUX19 junto con el gen *repC*, cepa A789 (Fig. 5.5 D). Se obtuvo la secuencia del gen *repC* mediante la secuenciación de esta clona y con las secuencias parciales anteriormente obtenidas (Fig. 5.6).

En el siguiente esquema se representa la metodología para la obtención del gen *repC* in vivo:



**Figura 5.5.**

**A)** Construcción A780 la cual posee el gen *repC* clonado sin 14 a.a en el extremo 3'. **B)** Integración del plásmido pUX19-*repC* en el pSym de *R. tropici* cepa silvestre mediante recombinación homóloga, la recombinación originó la cepa RH271. Se muestran los sitios únicos de restricción de pUX19 que no cortan ninguno de los 2 *repC*. **C)** DNA de RH271 digerido con *BamHI* originó un fragmento que contiene el plásmido pUX19 con su origen de transferencia (*oriT*), su origen de replicación (*oriV*), la resistencia a *Km<sup>r</sup>* y el gen *repC* completo del pSym de *R. tropici* CFN299 cepa silvestre dejando fuera el gen *repC* anteriormente clonado que le faltaba el codón de paro. **D)** La ligación del DNA cepa como resultado la clonación *in vivo* del gen *repC* cepa silvestre en el plásmido pUX19, construcción A789.

### 5.1.6. Obtención y análisis de la secuencia del gen *repC*

La clona A789 fue secuenciada y junto con la secuencia del contig obtenido anteriormente, se obtuvo una secuencia sobrelapada con el gen *repC* completo (Fig. 5.6).

```

1  AGATCGGCTC CTCCAGATCG TGTTTTTTTG AGGTCACAAG TCGGGACGGG CGATCGGGTT ATCCAGCGCT CTCACGCGT TACGCTTACT
91  GAAAATTGCA TACTCAGCTC AAAAAATGAG TCGACTGACA TAATGCTTTC CATTTTTTTG CCGAAAAAAC GCAAAATATA TTTGGCTCAC
181 CTTCAAGCGT TCTCACTAAA GGTATCCTAT GAAATACCGA CTCGATTCAA CTGATTTTCAG TACAAATCCT TAGAATTTC A GCGACCCGG
271 AAAGTGTFCC AGATTGCGAA ACACGTGCCA AATCGGCGCG TACGGCAAT TACAACGCC TATGAGAACA GCATATTGCG TCGCGCCGCC
361 GCTATCTATG GTTGGTATCA CAGCTCTCCC TTCTCCCTCA TCTCTGTGGG CACGAGATCG CTTCAATAG GAGGCTAAG CAAATGAAAA
451 ATATCGTGT ACGTGTAGAG TCGGATACCG CCCGTTTTGG GCGCGTTGAG CTTCAGGATG GAAGCATTGC TCCGATCTAT GACTTGATTG
541 GTAGCAGGCT AATCGAGATG ATCCGCTTTG ACGATATGCA CTCGCTGTTC GTAGATGAAG AAGCGTTGCG TGATGGGCTA ACCGCTTTTA
631 CAATCTTTGA TGGCTGTCCA AAGCCTCTGG CCGGAAAAAT TGTCTTTGTG GGAGCGGACT GCGGACAACC TTATCGTGCC CCATTGATCA
721 CGATTGCGGA TCGGCGGCA CGCTTCCGAT GTTGC CGGCC GGTGCTCGAT CCAATCTTTG CCACGGCCGG CGATATGAC CCAAGGGTTC
811 TTTAGTGTGC CGGGGCACTG GCAAGCTTGC AAGTCCGCAT TGAATCGTGC TCTCCCGTGC TCGAAGAGAG CGAAATCGC GGTTTGATAC
901 AATAAATCCG ACCGCGACGC TCGCGAAAAG TCGCGCGGGC ATGGCGGCAA AAGCTTAGT ATTTCGGTTT AACTCACTCA CTCATTGTC
991 AGCGGGCAAC CCCTTAATGA ATTTGCTGCG GTGGCGCTGC CGCTAAATAG GCTGGCAGAT CTCAGGGAAC TCCGGAAAA CCGCGCACCG
1081 TTTGCAGTGC TGAGATGGCG ATCCAACGCA CCTCGGGTAA TCATTGCTCC AGGAGATCAG ATCTCAAAC CCAAATGAG GGGATGGAT
1171 TTAGCTGCGA CACGACGCG ACAATCCTCC GCCTCTTTG GATAGCCCCC GGGTCGATGA TGACCAGCTG GGAAGCGGG CTGTGCGTAT
1261 TCATCCAGCC ATCCACGTTT CGCACGCTGA TCCTCAACGT CAAGTACGGG AGGAGCATTG CGTTTTCGGT CAAGCGTAT TGGCTCCATG
1351 TCCGAGCATC GGCCAATTTG AGAATTTTGT CCGTAAGGCG AACCAATTT GATCGGTCA AACGATATCG AAATGGCATT TAGACTTTCA
1441 AAACAATTA TAAATCAAT GCGTTAGTTT AGTCACTATC CCGCTGCGAC CTCAAGTAGC AGCTCAAAT CGTACATATC TTAGCCAAAA
1531 TTAGATTTGT GGGATATGCT TTTGCGTAT CGACCCAAA CATCCCGACG CGTGCCTCGG GTCTGAAATG GAGAGAAAA ACCGCCAGA
1621 AAGAAAAA CCGCTCCCGA AGCAATCCGG AAGCGGGTCT GTAAGAGAA TAAATAGCCA AAACCTTTGT CGCAGACCTC TCCTTCCCTT
1711 TCAA AAAAA ACATCACTTT GGTGAACGGC GGAGCTTTGC CTGGTCCCGA ACGGAGACGA GGACATGGAA GATATGACCA CCTGCCAAGC
M E D M T T C Q R

1801 GCGGCTCGGC CGTAAGATA CGCCCCAAG GGCTGAATTC CGGCGCTGGG CAAAATCGGC AGAAATCGGA ATGGTGAGC GTGCCAATT
P V G R K I T P Q R A E F R R W A K S A E I G M V T R A Q L

1891 GGCTGTGCTT GCTCAAAATC TGACCTGCAC AGGCCTGATA AATGGAACGG AAAGCCATCT GTTGCTAATA TTGATCAACA CCGCCCCCGC
A V L A Q N L T C T G L I N G T E S H L L L I L I N T A P A

1981 CGATACTTTC GATACGTGCG GCGGGCCAAT CGTGTTCAAA TCGAACCGAC AATTGGCATT TGAGGTGCGG CGTTCGGCCG GCGGGTCTAG
D T F D T S G R P I V F K S N R Q L A F E V G R S A G R V S

2071 TCGAATGCTT TCCAAGCTTT TCGATCTGGG TTTGATCAGC ATGCGAGACA GTGGAACTA TAAGCGATAT CCCGTCAGAA ACAGCGATGG
R M L S K L F D L G L I T M Q D S G N Y K R Y P V R N S D G

2161 CGTCATAACG GATGGATCG GGTGCGATCT TCGAATATTG GTCCGCGAT ATGGCGAGCT TACTCGCCTC GTAAGAGACA TCCGAGCGGA
V I T D G C G V D L R I L V L R Y G E L T R L V K D I R A E E

2251 GAAGAGGGCG ACCGAAGCTG CCTTGCAGC GTACCGAGGC GCCTTGCACA ATATCCGTTG TGCCCTCGCT GCTGTGCTGT ATGTAAGTGC
K R A T E A A L R R Y R G A L R N I R C A L A A V A D V S A

2341 AACAATCGCC CAACGCATTG CCGACCGGGT CGAGCGCATC AGCAATATA TCGGAATTGC TGCCAAAGCA TCCAACCGGA TGCTGCTGCG
T M R Q R I A D R V E R I S N Y I G I A A K A S N R M L R R

2431 TCGACTGTCT CTCTTGAAT GGTCTATGGA CCGACTGATG CGGCTTGACC CGCGACCTCA AGACCAACTC GCGCAGGGA AAACGACATG
A T V L L E W S M D R L M R L D P R P Q D Q L G A G K T T C

2521 CGTGCTGTCT GAAAACGACA TGCAGAAACA GACTACACCT CCTTATCAAT CAAAACGTAG TAGTAATGTT CGAGAGGGTT CGGCTCATGT
V P V E N D M Q K Q T T P P Y Q S K R S S N V R E G S A H V

2611 CCGACAATAC AGTTTTCAA AAGCCAGCCG CGCCAGCAGC TCGGCTTTTG AAGAAACCGC GACCCTTTGG CGAGGCTCAG TCAGCGAGCG
G Q Y S F P K A S A A S S S A F E E T A T L W R G S V S E R

2701 AGAACPCTCAG CCGCAGGCTC TAATCGCGCT TAAGDAGTGC TTAGGGGCGG CCCC GGCCCT CGCGGAGCTT GGATCGACTC CKAAGSCTT
E P Q R Q A L I A L I R A A P A L A E L G C T C P A G F A

2791 CCAGGATGTT GTTCCGCTGA CTCGATGCT GTGCCGCTTC GTCGGGATCT CAGAGGATGC CCGCCGTGGC GCGCTGGAG CAATGGCGGA
Q E F V R L T P M L C R F V G I S E D A R R G A V E A M G E

2881 ACAGCAAGCA GCGGTGGCGG TGGCAGTTAT TCTGAAAAA GCAAAATCGC AGGAGGTCAG TTCGCCCCGC GGATATCTGC GCGCAATGGC
Q Q A A V A V A V I L E K A N R Q E V S S P G G Y L R A M A

2971 CGAGCGCGCA GCGCGGGCA GATTGTATCT TACCCTGCTG GTCTTCGGTC TGGCGGCTCG CCGCGACCTT GAGCAAAGCA CTCGAATGGC
E R A A A G R L Y L T R S V F G L A A R R D L E Q S T R M A

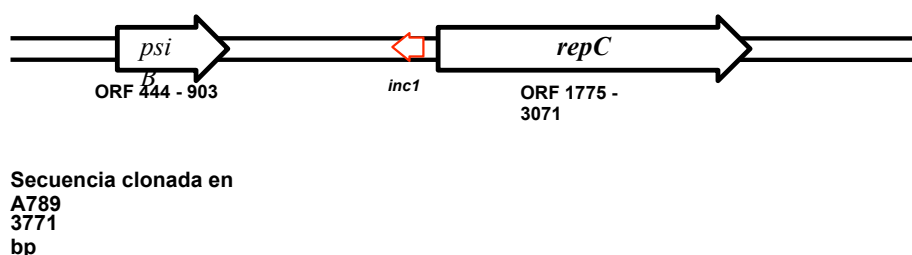
3061 CCGGCAAACT TAACTGGTGG GTCACGCTCT TAAGCGGTGC AGCGTTCTAG TCGACACTGT TCATGCGCCA CGATCAAGT GAGCGACGAT
G Q T *

3151 GTCGCGCAT CCGGTGACCG ACCGAAAAAC GAGTGAGTGT GAGGTCCAGG ATTCTATAGT TGTGGCGCTG GTTCTTTTAA AAAGATGATC
3241 ATGAAAACCA CTTTCCGGCG AGATCGCGGT GAAGACCGAC GCTTTCGGTT GCCCGAGTGC CTACCAGACA GCCAAGCTTA CCTGCGATTG
3331 ATGTCTCATT AGCTCCCGTT ATCTTGAGGC ACCATACGCT TCACGACCGC AACGAGATCG CCGCTTTGCTC CGCTCGGAG GGTTCGATA
3421 ATTCGGTCCA GAGTGAGACG ATCCTCGGCT TCCTCAGGCG TCGCCCCCA AAGATGGGGC GCCCTTCAA AGAGCATATC TATGGGCATA
3511 AAGCCGAGAA TTTACACAG ATGGATCATT CCGGTGACCG TCATCCTTGA AAACGCCCGC TCGTAACTGC CGTACACGGG TGTGCGACAG
3601 ACCGAGCATT GCGCAAGAT CCGCGCGAGC GAGGCCCTCG GCCTCGCGCG TTTTTTTTAA AAATGCGCTG GATCAGTCTC TCATATCTC
3691 CTAGCGTCCG AACTTTCCCG TCAAAACCGG GCTTGGCGTA GATCGGCTTG TCGACTCCG GATCGGTGGG TATCTACAG G

```

Figura 5.6. Secuencia nucleotídica de 3771 pb la cual incluye *repC*, en rojo se muestra el codón de inicio y el codón de paro. La secuencia sombreada corresponde al gen que codifica para un ctrNA.

La secuencia obtenida de 3771 pb se comparó en el genBank, utilizando el programa blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se identificó el gen *repC* de *R. tropici* CFN299 el cual posee una identidad del 63% a nivel de aminoácidos con el origen de replicación *repC* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 (Burgos *et al.* 1996). Se localizó un ORF que corresponde a un gen *psiB* el cual tiene una identidad del 69% con el de *R. etli* CIAT652. También se identificó una región intergénica (*inc1*) como la localizada en el plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* (Izquierdo *et al.*, 2005) (Fig. 5.7).



**Figura 5.7.** Mapa físico de la secuencia obtenida, se muestra un gen *psiB* en un ORF de la base 444 a la 903, posteriormente se muestra la probable región promotora de *repC* entre 903 y 1774 pb, entre esta secuencia en rojo se muestra el gen que codifica para el ctRNA. Finalmente se muestra el gen *repC* en la secuencia de 1775 a 3071.

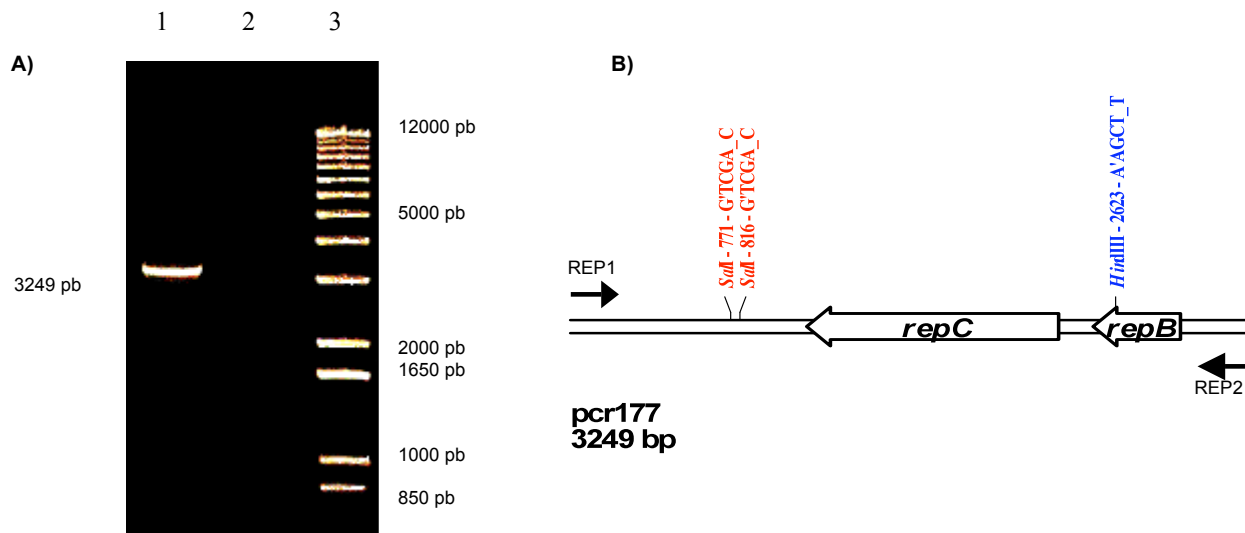
### 5.1.7. Transferencia del gen *repC* completo a *A. tumefaciens*

Al obtener la región regulatoria, así como la proteína RepC completa (A789) se transfirió a *A. tumefaciens* en presencia de pRK2013 para verificar la funcionalidad del gen *repC*. No se obtuvieron transconjugantes *repC*, del pSym de *R. tropici* CFN299 no se replica en *A. tumefaciens*.

## V. II. Caracterización del operón *repABC*

### 5.2.1. Aislamiento de *repBC*

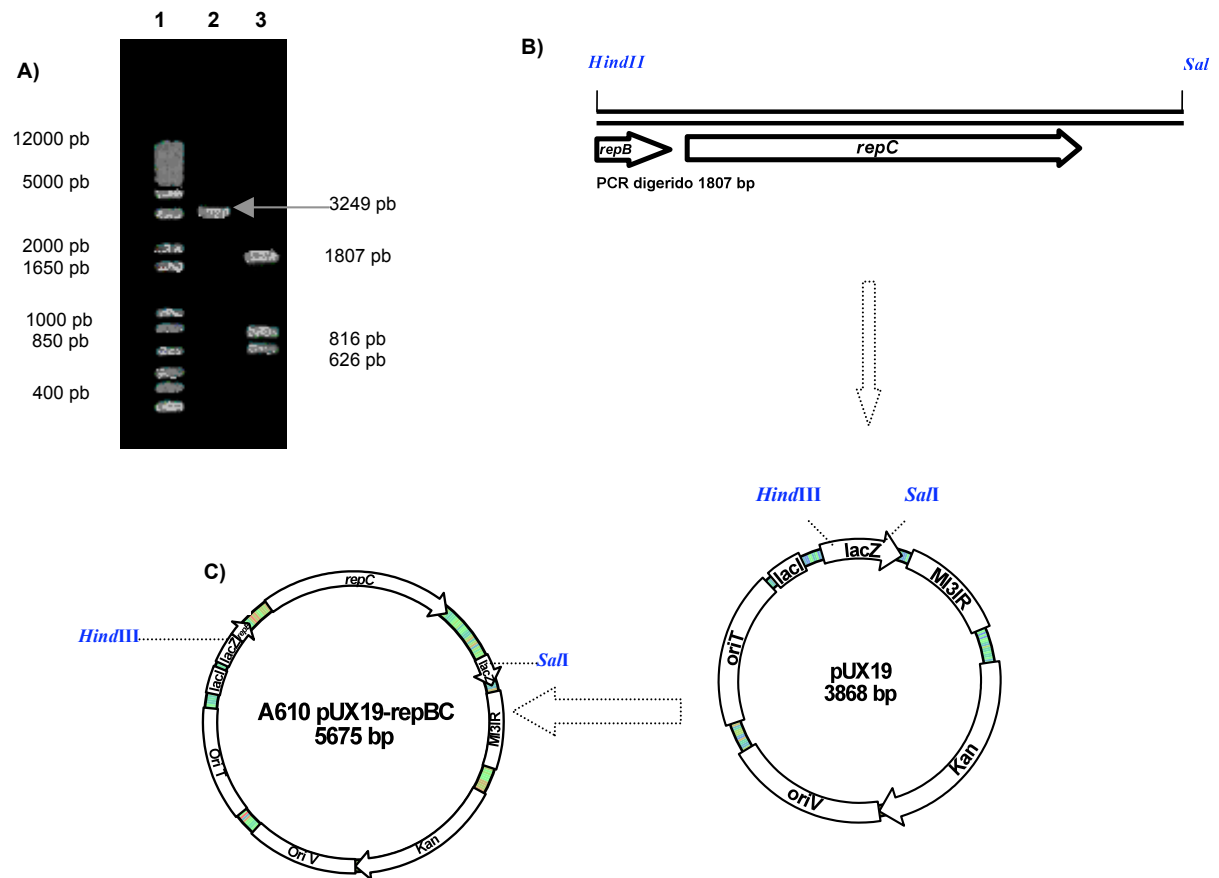
El análisis de secuencia de un fragmento de 390 kb del pSym de *R. tropici* CFN299, contig 177 (Hernández-Lucas *et al* 2002), revela la presencia de un fragmento de DNA (3450 pb) el cual contiene 2 ORFs con homología a los genes *repB* y *repC* de otros plásmidos que contienen un operón *repABC*. Tomando en cuenta que *repB* y *repC* se encuentran contiguos se diseñaron los oligonucleótidos REP1 y REP2 (tabla 4.3). Se amplificó su secuencia nucleotídica por PCR, utilizando como templado DNA del pBAC de la cepa A303 y se obtuvo un fragmento de 3249 pb (Fig. 5.8).



**Figura 5.8. A)** Gel de agarosa mostrando en carril 1 el tamaño del producto de PCR *repBC* (3249 pb), carril 2 muestra control negativo (reacción para PCR sin templado) y carril 3 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. **B)** Mapa físico del PCR, se muestra que el fragmento amplificado contiene los genes *repB* y *repC* con los sitios de restricción *SalI* y *HindIII*.

### 5.2.2. Clonación de *repBC* en el plásmido pUX19

El producto de PCR de 3249 pb se digirió con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*, se obtuvo un fragmento de 1807 pb (Fig. 5.9 A), que contiene parte del gen *repB* y el gen *repC* completo. Este fragmento se clonó en el plásmido pUX19 (Fig. 5.9 B). El plásmido obtenido (construcción pUX19-*repBC*) al cual le falta un fragmento de *repB* se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$  obteniendo así la construcción A610 (Fig. 5.9 C).



**Figura 5.9.** **A)** Gel de agarosa mostrando en carril 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder, carril 2 se muestra el producto del PCR de *repBC* (3249 pb) y en carril 3 se observa el mismo producto digerido con las enzimas *Sal I* y *Hind III*, se obtuvieron 3 fragmentos de aproximadamente 1807, de 816 y de 626 pb. **B)** Se muestra la forma en que fue clonado el producto de PCR digerido con *Sal I* y *Hind III* en el plásmido pUX19, **C)** construcción A610.

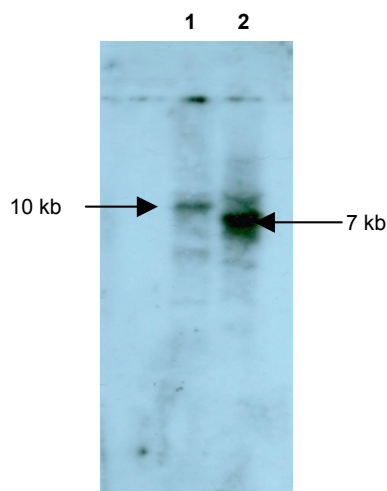
### 5.2.3. Transferencia de A610 (pUX19-*repBC*) a *A. tumefaciens*

Se transfirió A610 a *A. tumefaciens* utilizando como ayudador el plásmido pRK2013. No se obtuvieron transconjugantes, esto indica que *repBC* no se replica autónomamente.

### 5.2.4. Detección del operón *repABC* por Southern blot

Tomando en cuenta el resultado en el cual la construcción A610 es incapaz de replicarse en *A. tumefaciens* decidimos obtener los 3 genes completos: *repA*, *repB* y *repC*. Para localizar en el pSym el operón *repABC* se realizó un análisis de restricción del contig 177 que contiene la secuencia de los genes *repC* y *repB*. El análisis reveló que la secuencia no posee sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *PstI*. Debido a lo anterior se realizó

un Southern blot, utilizando el producto de PCR *repBC* de 3249 pb (Fig. 5.8) como sonda para hibridar con el DNA del pBAC de la cepa A303, digerido con *Bam*HI y *Pst*I. Los resultados del Southern blot, mostraron que la sonda *repBC* hibridó en un fragmento *Pst*I de aproximadamente 10 kb y en una banda *Bam*HI de 7 kb aproximadamente (Fig. 5.10).



**Figura 5.10.** Hibridación de DNA del pBAC A303 digerido con *Bam*HI y *Pst*I, utilizando PCR *repBC* como sonda. Carril 1, muestra un fragmento de 10 kb del DNA digerido con *Pst*I. Carril 2, muestra 7 kb del DNA digerido con *Bam*HI. En ambos fragmentos se localiza el operón *repABC*.

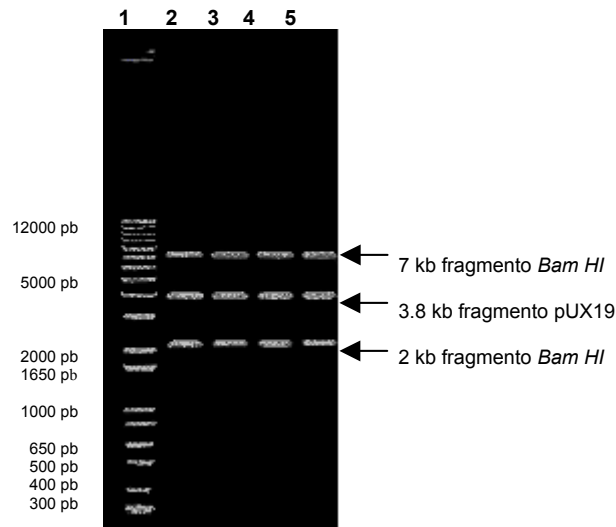
### 5.2.5. Obtención y clonación del operón *repABC*

En el experimento anterior, la banda *Bam*HI de 7 kb del Southern blot nos indica que el operón posiblemente no es cortado por la enzima *Bam*HI y se ubica dentro de este tamaño. Tomando en cuenta este resultado se hicieron restricciones del pBAC de la cepa A303 con la enzima *Bam*HI, los fragmentos obtenidos se ligaron en el plásmido pUX19 digerido con *Bam*HI, estas ligaciones se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se obtuvieron 500 clonas positivas *lacZ* con las cuales se hicieron 5 grupos de 100 clonas cada uno, los grupos de las clonas se crecieron en medio líquido para realizar 5 cruzas a *A. tumefaciens*, utilizando como ayudador el plásmido pRK2013. De las 5 cruzas, solo en 3 se obtuvieron transconjugantes en placas de medio selectivo, siendo en total 43 transconjugantes en la dilución  $10^{-3}$ , esto equivalente a  $4.3 \times 10^4$ , teniendo en promedio  $1.43 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra original en cada una de las 3 cruzas. Al obtener transconjugantes es debido a que obtuvimos el replicador *repABC* funcional clonado en pUX19 en un fragmento *Bam*HI de 7 kb. Para verificar si las clonas obtuvieron el plásmido se tomaron 30 transconjugantes con las que se realizó un experimento tipo Eckhardt. El experimento mostró que *A. tumefaciens* adquirió un plásmido, lo cual significa que el operón *repABC* se replica autónomamente.



### 5.2.6. Recuperación del plásmido (pUX19-*repABC*) de *A. tumefaciens*

Para obtener de *A. tumefaciens* el plásmido pUX19 con el operón *repABC* clonado, se conjugó esta cepa a *E. coli*. Se obtuvieron 138 transconjugantes resistentes a Km lo que indica que tenemos pUX19 con *repABC*. Se tomaron 4 transconjugantes, se les purificó el plásmido y se digirieron con *Bam*HI. En los 4 plásmidos se identificó el fragmento esperado *Bam*HI de 7 kb conteniendo el operón *repABC*. También se identificó otro fragmento *Bam*HI clonado de aproximadamente 2 kb (Fig. 5.11). Se tomó uno de estos plásmidos y se le secuenció el fragmento clonado para asegurarnos que tuviera el operón *repABC*, el plásmido resultó positivo y se le nombró A627 (pUX19-*repABC* en fragmento *Bam*HI de 7 kb) (Fig. 5.14 A).

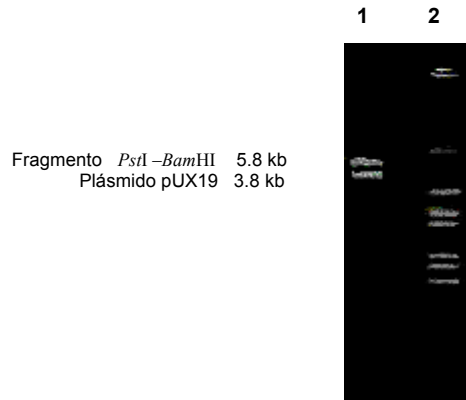


**Figura 5.11.** Gel de agarosa mostrando digestión de 4 plásmidos recuperados de *A. tumefaciens* con la enzima *Bam*HI. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder, carriles del 2 al 5 se observa el fragmento aproximado de 7 kb que contiene *repABC*. En las 4 digestiones aparece el plásmido pux19 (3.8 kb). En todas las digestiones se observó otro fragmento *Bam*HI clonado de 2 kb.

### 5.2.7. Región mínima replicable del operón *repABC*

Para obtener la región mínima replicable se realizaron 2 experimentos con el plásmido de la cepa A627.

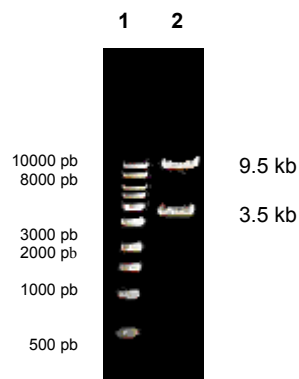
En el primer experimento se digirió la construcción A627 con *Pst*I y *Bam*HI ya que mediante análisis de secuencia se observó que ambas enzimas generan un fragmento aproximado de 5.8 Kb, el cual contiene el gen *repA* interrumpido por *Pst*I en la región río arriba y los genes *repB* y *repC* completos (Fig. 5.14 B). Este fragmento con extremos *Pst*I-*Bam*HI se clonó en pUX19. Posteriormente el plásmido obtenido se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$ , se purificó y se obtuvo la construcción A766 la cual se verificó por restricción (Fig. 5.12).



**Figura 5.12.** Gel de agarosa que muestra en carril 1 la digestión del plásmido A627 con las enzimas *PstI-BamHI*, se muestra el fragmento aproximado de 5.8 kb del operón y el fragmento de 3.8 kb que corresponde al plásmido pUX19.

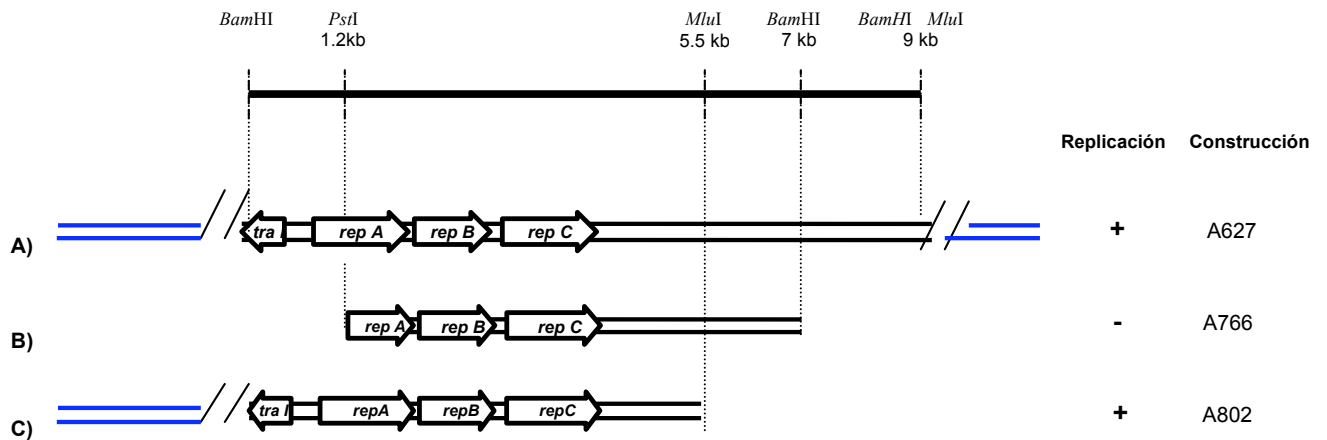
Al obtener la construcción A766, se analizó si *repABC* con *repA* interrumpido por *PstI* es funcional, por lo que se conjugó a *A. tumefaciens* utilizando como ayudador el plásmido pRK2013. No se obtuvieron transconjugantes, el fragmento *PstI-BamHI* (Fig. 5.14 B) clonado en pUX19 no se replica en *A. tumefaciens*.

Tomando en cuenta el resultado anterior, se realizó un segundo experimento para obtener el operón completo en el que se utilizó *MluI*. Al analizar la construcción A627 se observó que esta enzima no interrumpe ningún gen del operón *repABC* (Fig. 5.14 C). Al digerir se obtuvieron 2 fragmentos *MluI*, uno aproximado de 3.5 kb de la región río abajo del operón sin afectarlo y el otro aproximadamente de 9.5 kb que contiene al plásmido pUX19 y al operón *repABC* completo. Al religar la digestión solamente se ligó el fragmento de 9.5 kb perdiéndose el fragmento *MluI* de 3.5 kb. Se obtuvo así el operón *repABC* clonado en el plásmido pUX19 que se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente se purificó obteniéndose la construcción A802 que fue evaluada por restricción (Fig. 5.13). El análisis de secuencia de la construcción reveló que el operón se encuentra en un fragmento *BamHI-MluI* de aproximadamente de 5.5 kb.



**Figura 5.13.** Gel de agarosa mostrando en carril 1 marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder, carril 2 digestión del plásmido A627 con la enzima *MluI*, se obtienen 2 fragmentos *MluI*, uno de 3.5 kb y otro de 9.5 kb aproximadamente que contiene el plásmido pUX19 junto con el operón *repABC* completo.

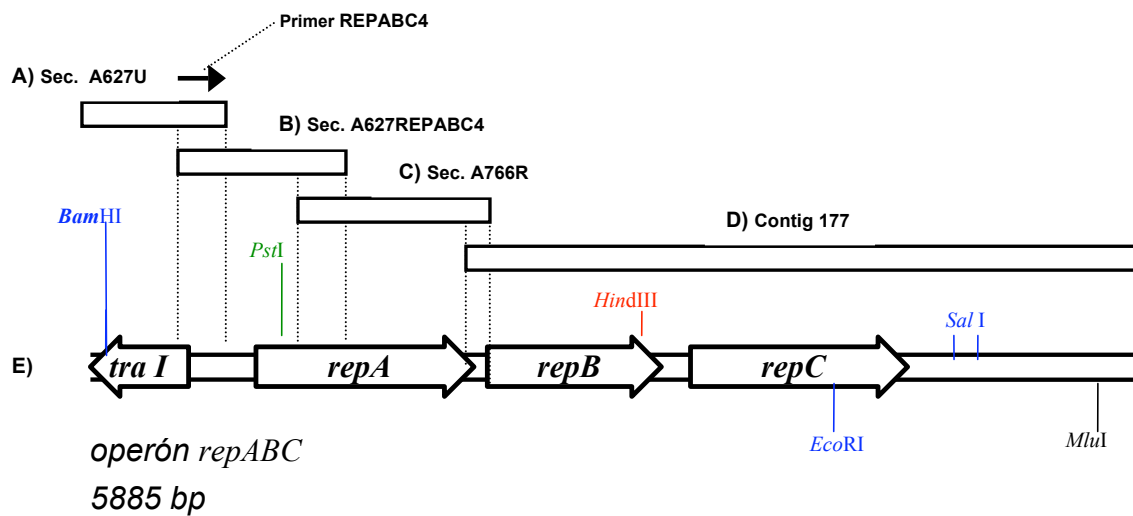
Se transfirió la construcción A802 a *A. tumefaciens* utilizando como ayudador el plásmido pRK2013, se obtuvieron transconjugantes en placas de medio selectivo, teniendo  $3.8 \times 10^4$  (UFC) por mililitro de muestra original. Se obtuvo una región mínima replicable del operón *repABC* en un fragmento *Bam*HI-*Mlu*I de 5.5 kb clonado en pUX19, el operón *repABC* se replica autónomamente y es funcional en el pSym de *R. tropici* CFN299.



**Figura 5.14.** A) Construcción A627, se observa el operón *repABC* en un fragmento *Bam*HI de 7kb, adyacente a él, también hay otro fragmento *Bam*HI de 2kb, en azul secuencia de pUX19. B) Construcción A766 originada al digerir A627 con *Pst*I y *Bam*HI, se obtiene un fragmento aproximado de 5.8 kb, *repA* es interrumpido por *Pst*I. C) Construcción A802 originada al digerir A627 con *Mlu*I, al religar se obtiene un fragmento clonado de 5.5 kb el cual contiene el operón *repABC* completo.

### 5.2.8. Obtención y análisis de la secuencia del operón *repABC*

La construcción A802 se secuenció mediante oligos sobrelapados. En total se secuenciaron 5885 pb. La secuencia obtenida se comparó en el genBank utilizando el programa blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se observó una identidad con *repA* de *R. etli* CFN42 de 76%, con *repB* de *R. etli* CFN42 de 74% y con *repC* del plásmido pSmeSM11a de *Sinorhizobium meliloti* SM11 de 76%. Además adyacente a *repA* pero en dirección opuesta, se identificó una secuencia parcial del gen *traI*, con una identidad de 64% con el de *A. tumefaciens* y de 63% con el de *Sinorhizobium meliloti* (Fig. 5.15).



**Figura 5.15.** 4 secuencias parciales (**A**, **B**, **C** y **D**), correspondientes al operón *repABC* se superpusieron para obtener la secuencia completa del operón *repABC* del pSym de *R. tropici* CFN299. **E**) El fragmento clonado en pUX19 abarca del sitio *Bam*HI al sitio *Mlu*I de la secuencia.

5.2.9. Secuencia del operón *repABC*

```

1   ACGGCCGNTG ANTTGTAATA CGACTCACTA TAGGGCGAAT TGGGGATCGA TCCACTAGTT CTAGAGCGGC CGCCACGGGC ATATCGGATC CGCTCGAATC
101 GAAGATCGGT CACCGTGACG AGCTCCGNGT ACCCATTTGC GATGCACCAT TCGATGATGC CTGCGAACAT GGTCAAAGTG GCCTCGTGGG CGAGGCGCTCC
201 TCCGCCGAAGA TCGACCAAGG TTGTGTCCAC GC AAAAACGG GAGCTTTGCA TCNFACTTGG ATGGGCGTTT AGGTGTCCAT GC GTTAGCAG TGACGAAAAG
301 ACATGGGTCA CCATCGTCGG ACCCATGGCC GGCANGAGTC TAGGCGATCT TGCCACACGA GCGTGTCCG ATACGGCCGAG TATGTAAGTC GGCTGGAGAG
401 CGTCCGAAGAC GTCCGCTTCC CGGCCGTCAA GAACACCGAC CTCCCAACCC AACCGATTTC AAAACACTTG AGCTCNAAGT CNATGATGTG CTTCGAGAAG
501 GTGCTGTGCA GGAAGCCCAT GTCTGGTCGA TATCGCAACA ACCTTCATAC TGATCTCCGT CNCTTANATT TATCGACAAA GATCAGCAGC GATTANAATG
601 GCTGGGCAGT TGTAGAATCC TCAGGGATTT TGGTGAAGTC CGCGCGGTTT TGGGCGACAA CGCGGTGATC TGATCTCCGCG TGTATTCCCG TTAGTTGTAG
701 GAATCACCAG TGAACAATA TGCAACGAAC GTTGTGACTC GGAGCGGTAA CAGATTGGAT TTGCAAGGGA AATACAGATG GCGGCGTTAA CCATAGTCA
801 AGGGGCGTCC CGGCTATTAA CAGTTTATTA GCGCCATTTT CCTTGCCGCG CCGCGAGAAT CCGACATAAT AACGGTTCAG TGGCAATATC GGGCCGAAAA
901 CCGTTATCTG AAGATTFTCT GACAATGAAC GCTAATTGCA TGGCTTCGCT TAAGATGCCG ATGCACTTTG AAGATCAAAAT CCTAGAACAG GGTGATTGTA
1001 TCTCGAAAAA GCTGCACCTA CTTAGCGTAC AACGATTCCT GCCCAACCGG AAAAAGACAT TCGAAGCTT CTCCGCTGGCG GAGGTCCGGA CCTATGTCCG
1101 CGTATCCGAG AGCACAATTA AAAAGCTGCA TCTGGACGGA AAGGGCCCTT CCCTCAAAC ATCGTCTCTCC GGTGCTCCGT CCTACACCGC CGAACAGATG
1201 TTGGAAGTGC GTCAATATCT GGGATACGGA CGGTGATGCC GACAACCGCA TGTATGTTC CCACCCGGCG CGGGCGTGA AAAGCTGACT CGAGGTGCTT
1301 GCTGTAGTCA ACTTCAAAGG GGGCTCGGGG AAAACCCAGA CGCCCGCGCA TTTAGCGCAG TACCTGGCAT TGACGGGGCA TCGCGTCTCT CCCTGAGACC
1401 TCGACCCCTCA AGCATCCCTT TCGTCTCTCG ACCGCTTCCA ACCGGAGCTC GATCAGATCG CGTCCATCTA TGTATGCCATT TCGGTATGAT GTGCGAGAAA
1501 GCGGATCTCG GAGATCATCC AGACCACTAA TTTTCTCGGA TTGGACATTC TCCCTGCAAA CCTCGATTTC CAGGAGTATG AATATGACAC CGCGCTTGGC
1601 ATGTCTGATA AGTCTTTCTAA TGAAGGCAAA ACGTTTTTCA CCGCATATG CCGGGCTTTG GCTGAGGTCC GCTATGCTGT TGTATGCTGC TCGTCCGACT
1701 GTCCACCCGA GCTCGGATAT TTGACGCTGA CCGCACTGAC CCGACTTACA AGTGTTTTGA TAACAACTCA TCCCGCAGAT GCTCCAGCTG ATGTGATGTTG
1801 GGTCACTTCC TTCTGATGCT TGGTGAATC CTA AAAACCC GATCCGTGCC GAGTGTGCGG GAAGTGAACC TCTCTCGTGA CAGATATGTT ATTTACGGCT
1901 TACGAGCCGA CCGATGTTCC GCAAGCCAG ATGGTCCGCT TTATGTOCAC GATGTTCAAC GAGTTCATAC TAAAGARCCA GATGTGTAAG TCGACGGCGG
2001 TTTTCAGATC CGGAATTACC AAGCAAACCT TGTACGAAGT CGATCGGCA TCCATGAATA GAGGCAGTA TGACCGTGGC ATGGAATCGT TGGATGCGAT
2101 GAATGCTGAA ATTGCCGGCC TCGTTCACGA GTCATGGGGA CCGTGAATTC TCAGCTGACA AAAACGAACG TTTTATGCGG AAAACGAACG AGCTAACCGC
2201 TGCTCGGAGC AAATGAGATG GCACGGAAAA ATCTGCTCGA GGGACTTGCT GACCTGCATG AAGATAGCGG CACGGCACCT GCATATCCAA TCGAGGGCGC
2301 AGGCAATCT CTGCTGCGTT CGCTGGAACA GCTGGCAAG GATGCTGACA AATATCTCGA AGGCGAGGCA ATTATCGAAC TTTATCCGCG ACAATGTGA
2401 GGCTCTCTCG TAAAGATCGA GATATCAGAC GACGACGGCG AGTATCAAGA TCTGCTAGAG GCAATTAGGG TATCGTGGCG AAGATACCGC TATTTCTGTT
2501 GCGCGAGGTT TCGACTCAAA CAAGGTCGTA TGGTCTTTAT CAGGTTGTCT TGCCGCAAG GACGGAAGG CGACGAAGGG ACCCTCGCAG GAAAGTCCGG GGTATTGTCA
2601 AGGCAATCGA CGACCGTTC CATGTCATT CTAAGGCGCA GAAAATTC CCGCCGCGCA ATCTCTCTT TATCGAAAGG CCGTTATTTT CCAAGCCGCT
2701 GGATGATCTT GGTACCGGC GAGAGGTGAT TTCTTTGCA TTGTCGGCA ATCGCGCTT GGTCTCGAAG ATGATGACGG TGGCAGAGCG CATCTCGGTT
2801 AACGTCAATG AAAAATCCG GGTGTGGCTC GAGCGGCTG GATAGAGTCT TCACTTCTAG TCGGAAAAAT CGCCAAATG CGCCAAATGTTG
2901 CAGAAGTTTT GAGCACGGAC GGCTTCGAGC CATTGCCGTC GATGAACGC TTTTCTCTC TGTACAAGGC GCTCAACAGA ACAGCGCGGC CGGTGAGGAA
3001 GCGGAGGTTT TCGACTCAAA AGGCGAAGTG GACAGCCCGG GACAAAGGCG AATCAAGAA ATCGGGCAAG CTTTCTCGCT CTTCTGTAAG CTCTGTAAG
3101 GCGAAGAAAT GTCGCCGTTT CCGAGAATAT CTTTCCCGCA ATTTGGATGC GCTCTACGAG CAATCTCTGA AGGAGGGAAG CAAGAGGACA TGAAGCTCCG
3201 AAGAAAAAAG CGCCCAAAAC GACCAAGTCG TGGAAAGCCT TCTCGTATTC CCTAAGCAAG ATTGAGAATC GCATTTCCAC GAAAGTCCGT
3301 AACCGTCGAT TTGCGGGGCG GATCTCTTTT GCCTCAATTA AGGTGAGAGA AAAAATGCGC ATTGGAAGTG TGACGACGCC CTTCGGCGGG CGGCCGATAT
M Q I G S V T T P F G R R P I S

3401 CGCTTGCCCA GGTAAAGAGG CAAATGAAAA CGGCTGAGAT CGGCCAGGTT AAGACGCGCC ACAAAATGGAA GATCTTTCCG GATGACCGE AGGCCAGGGC
L A Q V R G K Q M K T A E M R P G K T A D K W K I F R D A S E A R R A

3501 AGTGCTCGCG ATTACAGACC GCGCCCTTGC CGTTCCTGAT GCGCTCTTGA CCTTCTATCC CGACAATGAG CTTTCGGAAG AGCGCGGCCCT GGTGGTGTTC
V L G I Q D R A L A V L D A L L T F Y P D N E L S E E R G L V V F

3601 CCATCAAAATG AACAGCTTTC CGTTCGAGCG CATGTTATTG CTGGCAGCAC ATTCGCGCCG CACCTTGTCT CACTCGTCGA TGCTGGACTG ATCCAGCGCA
P S N E Q L S V R A H G I A G T T L R R H L A A L V D A G L I Q R K

3701 AAGACAGTGC TAATGGCAA CGATAGCACC GAAAGACAAA TGGCGCGCAG ITCGAAGATG CGTTCGGCTT CAGCCTCGCG CCGCTGCTTG CTCGCCGCGA
D S A N G K R Y A R K D N G G Q A E D A F G F S L A P L L A R A E

3801 AGAGCTTTCG CAGCTCGCAC AGCAGATAGC AGCCGAGCGC CGGCACCTTC GCAGCGCCAA GGAAGCACTG ACGATCTGCC GTCGTGACTG TCGTAAGCTG
E L A Q L A Q Q I A A E R R H F R S A K E A L T I C R R D V R K L

3901 CTGACGCGTG CGATAGAAGA GGGCGTCTCT GCGGATTTGG AAAAGCTGGA GGGCTACTAC GTGCAGTGC TCGCAGGCAT CCCCCTGCC CCAACCTCA
L T A A I E E G A S G D W E K L E G Y Y V Q L L A G I P R S P T L K

4001 AAGATATTTA ATCCGTCCTC GACGAAATGC GAATGTTGCG TGAAGAGATC ATCAACCAAC TGAATTTTCA GGAAGATTCT CAAAACAAG ATACCAATGA
D I E S V L D D E M R M L R E E I I N Q L E F Q E D S Q K T D T N D

4101 TGTCCAAATG GGACRVCACA TACAGAATTC AAAACCCGAA TCCAGNAATG AATTTGAACC TCGCTCTGAA ACAGAGCAGG GGGCGAAATC GAACCCAGAC
V Q I Q N S G R H I Q N S K P E S S N E F E P R S E T E Q G A K S N P D

4201 ATTTGGCGAA TGGCAGAGCC GATAAAGGTT TTTCCACTGG GAATGGTCTT GCAGGCGCTG CTTGAGATTT CGAATTACGG GCCGGGCGGG GCGGTTCGGGA
I G R M R E P I K A F P L G M V L Q A C P E I S N Y G P G G A V G S

4301 GTTGGCGCGA TCTCATGTCA GCGCGGTGG TCGTGCATGC GATGCTGGCC GTCAGTCCGA GTGCCTACCA GAATGCCTGT GAGGCACCTG GTGCCGAGAA
W R D L M S A A V V V R S M L A V S P S A Y Q N A C E A L G A E N

4401 TGCTGCGGCC GTGATGACCCT GCATCTTCGA AAGGGCAGGG CACATCAACA ATGCGGGCGG TTATTTGCGT GACCTCACCC GCAAGKAG ACGCGGAGAG
A A A V M A C I L E R A G H I N N A G G A Y L R D L T R K A E R G E

4501 TTTTCACTTG GCGCATGTT GATGGCGCTG ATCGGAACGA ATGGTTCGCG AGGCCGGAGA GCATCATGAG CTGCAAAAAG CTGATGCTGT TTGGAGACCG
F S L G P M L M A L M R T N G S P G R R A S *

4601 CAGCAAGGTG AGATCTGGC TTGTGGTCTC CCGAGTATCG CCGATAAGCT ATCAATCTAA AGTGGGGTGC CTGAAAACAG CATATTCGAA GGGCCGTAAC
4701 CTCGGATGCA AAGAGCTGTG TAGCCTTCTG AACGAAATCA TCCGGACATC CGCGCCGGCG GAACAACGGC GCTGGAGACG CTGCTTTCCG CCGCGGGGTT
4801 CGCGGAGTGG TTTATTGATC GCAAGTTACG ATCGGCTGCT TGTGCGCTGT CAGTTGTAA GCCTGTACGG CGATCCACCG TTTTGTGCAC ATCCCTACAT
4901 TTGACCGCGC GAACCCAAAG ATATCCAGCG TCGACAGCTC TTTTACCCTG AACTCGGACA ACAGCCGAAG AACTCGTGT TCGAAATTCAT CAATGCGAAT
5001 GTAGCTGGCC ATAAACATAG GAGTCTTGCT ATTTGACCAA GATGGGTTT GAGGGCTATG CTAGTCTCAT AGACGTTCCG TTAGACCTGT TGACACCTGT
5101 CGACCGGGCC AAGAGATTGG CGCTGCGGCC TTTGGCACAG CCGGAGATCT CGCAATTTAA GAGCAGGTGG CCGCGAGGGC CTTTGTGACC CTTGTCGGCC
5201 GCTCCGGTCA ATTGGCCTCA GAGCGTCTG ACGTHTTCCG GCGGCTTCTC CGATCTGAC CGATCTGAC CAGATCTGTA GAAACCGAC TGTCCCTCTC
5301 TGAGATAATC GCCATATTGC AGGGCGGTGA CATGCACGAA AACCTGCGCT CCTCCGCTTT CCGCGTGTAT GAAACCAAG CCTTTATCGC CGTTGAAGAA
5401 CTTAAOCTTG CCAGTTGGCA TAACAATCCT CGTGTCTTCG CAGTITAGG AGCAAACTAA CGACCAAGCA CAGCAGAAT CAAAGCCAGT TCGTTCGGC
5501 GAGTATGTC GCGCTTTTTC GATAGAGTGG ACGAAAGGCC GTGCGCAGC GCTTTTCT ATCACTCTGG CTCCGGCAGC TTTAAGGTTT AACCGGTATG
5601 TCGCGCTTCA CGCTGCGGTT TCATTGCCCC CTCTCTCCAC ATATCATGAA GGTCTCGATT CCGCGTGTCC CCGGAAGCCC CTGCTGATCA GATGTAATTT
5701 TCGCGCTTCA GCGCCCTCA ATCCCTTCG GGAACATGAA GGAGATCGCC TTGGCGATTG TTGAATGTTG TTGAACCTGG CCGGCAACCG TTCATAGAAC
5801 TTTGCTTTCG GGATATAAAA CGCAACCGCC GTGAGAGTGC TCTGCTCGCC ATCGAAGATG GTTTCGAAGA AGAAGGGCGA AGTTG

```

Figura 5.16. Fragmento que se obtuvo mediante secuencias superpuestas, el cual contiene al operón *repABC* y adyacente a éste, la secuencia 1 a 927 una secuencia parcial del gen *traI*. En gris se muestra el gen *repA*, en azul el gen *repB* y en negritas el gen *repC* con su secuencia de aminoácidos, en rojo se muestran los codones de inicio y término. La secuencia sombreada codifica para un cTRNA. Secuencia subrayada indica posible sitio de partición (*parS*).

### V. III. Presencia de *repC* y *repABC* en *R. tropici* CFN299 y CFN299-10

#### 5.3.1. Transferencia de *repC* (A789) y *repABC* (A627) a *R. tropici* CFN299 y CFN299-10

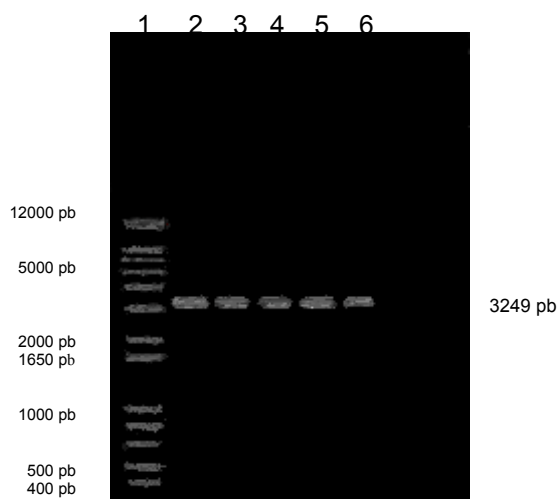
Para estos experimentos se realizaron conjugaciones en las que se transfirieron las construcciones A627 (pUX19-*repABC*) y A789 (pUX19-*repC*) a *R. tropici* CFN299 y *R. tropici* CFN299-10 mediante el ayudador 2013. La cepa CFN299-10 tiene una deleción en el pSym (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990) y se utilizó para saber si en la parte deletada se perdió uno de los 2 replicadores. Los resultados fueron los siguientes: en la transferencia de A627 a *R. tropici* CFN299 se obtuvieron  $16.4 \times 10^4$  UFC por mililitro de muestra original, de A627 a *R. tropici* CFN299-10 se obtuvieron  $11.4 \times 10^4$  UFC por mililitro. En la transferencia de A789 a *R. tropici* CFN299 se obtuvieron  $3.9 \times 10^4$  UFC por mililitro, mientras que de A789 a *R. tropici* CFN299-10 no se obtuvo ninguna transconjugante.

Mediante geles tipo Eckhard se mostró que el operón *repABC* contenido en la construcción A627 con resistencia a Km recombinó en el genoma de *R. tropici* CFN299 y *R. tropici* CFN299-10, esto indica que *repABC* se encuentra en las 2 cepas. El gen *repC* contenido en la construcción A789 recombinó sólo en *R. tropici* CFN299 y no en CFN299-10 por lo que en esta cepa no existe una secuencia *repC* homóloga para recombinar, lo cual significa que no tiene el gen *repC*. Con este experimento, se demuestra que en el pSym deletado de *R. tropici* CFN299-10 únicamente se encuentra el replicador *repABC* y que este replica autonomamente al pSym. Cuando se transfirieron las construcciones A627 y A789 a *R. tropici* CFN299 no se logro curar la cepa del pSym mediante incompatibilidad de los replicadores. En otros trabajos tampoco se ha logrado curar a *R. tropici* CFN299 del pSym, sólo se ha logrado deletar una parte del pSym obteniendo la cepa *R. tropici* CFN299-10 (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990).

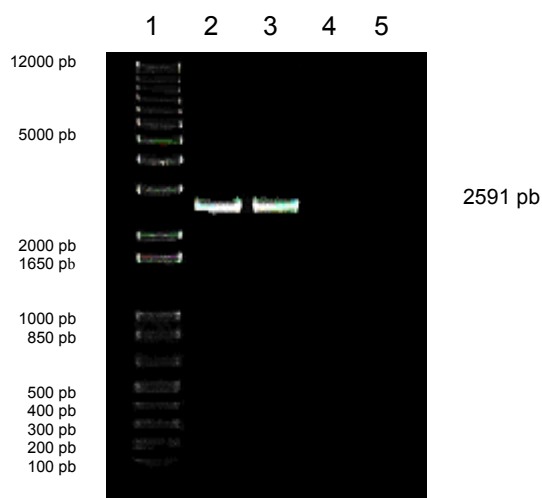
#### 5.3.2. PCRs de *repC* y *repABC* de las cepas CFN299 y CFN299-10

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se amplificaron los replicadores de CFN299 y CFN299-10 para asegurarnos que en la parte deletada del pSym de *R. tropici* CFN299-10 sólo existe *repABC*, se obtuvieron los siguientes resultados:

Sólo con el DNA de *R. tropici* CFN299 se obtuvieron amplificaciones de los 2 replicadores, *repABC* y *repC* del pSym (Figs. 5.17 y 5.18). Con el DNA de *R. tropici* CFN299-10 no se amplificó la secuencia correspondiente al gen *repC*, sólo se amplificó *repABC* (Fig. 5.18).



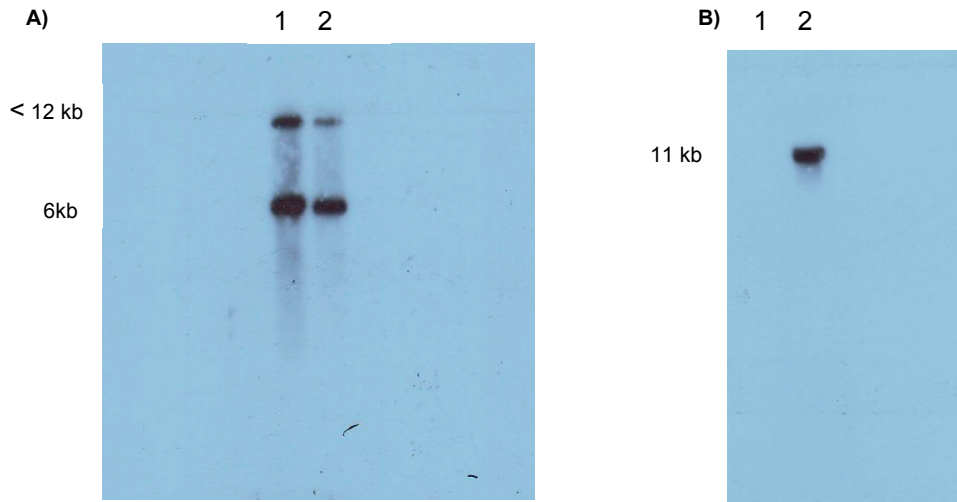
**Figura 5.17.** Gel de agarosa con muestras de PCRs de *repABC* usando como templado DNA de las cepas de *R. tropici* CFN299 y CFN299-10, y los oligonucleótidos REP1 y REP2 los cuales amplifican *repBC*. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. Carril 2 control positivo. Carril 3 y 4, con DNA de la cepa CFN299 como templado se amplifica *repBC*. Carril 5 y 6, también se amplifica *repBC* con DNA la cepa CFN299-10.



**Figura 5.18.** Gel de agarosa con muestras de PCRs del gen *repC* usando como templado DNA de las cepas de *R. tropici* CFN299 y CFN299-10. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. Carril 2 y 3, con DNA de la cepa CFN299 como templado se amplifica el gen *repC*. Carril 4 y 5, no se amplifica el gen *repC* con DNA de la cepa CFN299-10.

### 5.3.3. Detección de los replicadores de las cepas CFN299 y CFN299-10 por Southern blot

Para tener más certeza en los resultados obtenidos en las conjugaciones y por PCR, se realizó un experimento tipo Southern blot para localizar los replicadores de *R. tropici* CFN299 y *R. tropici* CFN299-10 (Fig. 5.19). Nuevamente se encontró el operón *repABC* en ambas cepas y el gen *repC* sólo en *R. tropici* CFN299. Este experimento confirma que el replicador funcional en el pSym de *R. tropici* CFN299 es el operón *repABC*.



**Figura 5.19.** Southern blot. **A)** Carril 1, DNA total de *R. tropici* CFN299-10 y carril 2, DNA total de *R. tropici* CFN299 digeridos con *EcoRI*, como sonda se utilizó A610 (*repBC*) digerido con *EcoRI-HindIII*, *repABC* se encuentra en las 2 cepas. Se muestran 2 bandas por que el operón es cortado por *EcoRI*. **B)** Carril 1 DNA CFN299-10 y carril 2 DNA CFN299, digeridos con *BamHI*, utilizando como sonda A780 (*repC*) digerido con *EcoRI*, sólo hay señal en la cepa CFN299 lo que indica que el gen *repC* no se localiza en la cepa CFN299-10.



## VI. DISCUSIÓN

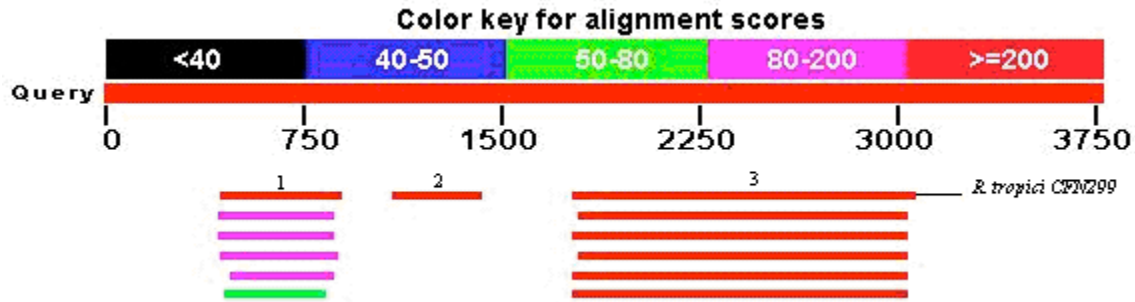
### 6.1. Gen *repC*

El pSym de *R. tropici* CFN299 contiene 2 replicadores diferentes, uno pertenece a la familia *repC* y el otro a la familia *repABC*. También se ha encontrado que algunos plásmidos contienen 2 replicadores *repABC* funcionales como es el caso del plásmido pCFN42a (Cevallos *et al.*, 2008). El replicador *repC* se localiza también en plásmidos de *S. meliloti* y *S. fredii* (Burgos *et al.*, 1996; Villadas *et al.*, 1995).

En experimentos previos se ha demostrado que el gen *repC* es esencial para la replicación en el plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 (Mercado-Blanco y Olivares, 1994; Izquierdo *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando la construcción A789 conteniendo el gen *repC* desde el codón de inicio hasta el codón de paro, con una posible secuencia promotora completa, se conjuga a *A. tumefaciens* no se produjo ninguna transconjugante, lo cual indica que el gen *repC* posiblemente no replica el pSym de *R. tropici* CFN299. Esto también se demostró cuando no se localizó el gen *repC* en el pSym de *R. tropici* CFN299-10 y sin embargo en esta cepa el pSym se replica mediante el operón *repABC*.

El replicador básico del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 consiste solamente de 2 genes; uno que codifica para la proteína iniciadora RepC y el otro que codifica un pequeño RNA antisentido que se transcribe en dirección opuesta a *repC*. El producto del RNA antisentido, un RNA contra-transcrito (ctRNA) es complementario al transcrito del mRNA de *repC*. El ctRNA tiene una influencia negativa sobre la actividad del promotor del gen *repC* y forma una estructura en forma de tallo asa que funciona como un terminador independiente de *Rho* (Izquierdo *et al.*, 2005). Esta estructura de replicación se localiza también en la región promotora del gen *repC* del pSym de *R. tropici* CFN299.

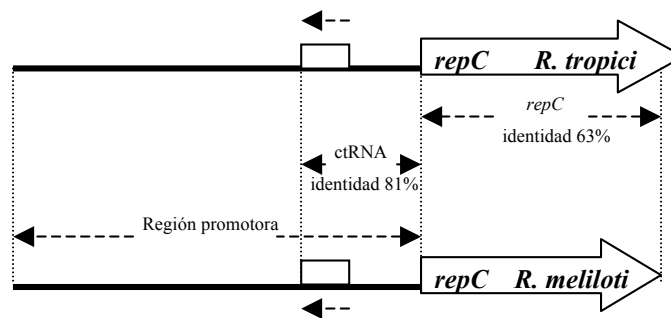
La secuencia aislada del pSym de *R. tropici* CFN299 que contiene el gen *repC* se ubica en un tamaño de 3771 pb. En este tamaño también se localizaron 3 genes más. En dirección 5' a 3' primero se localiza un gen *psiB* que codifica para una proteína PsiB, en la región río abajo de éste, una secuencia aún desconocida de 335 pb (Fig. 6.1) y posteriormente un gen que codifica para un pequeño ctRNA. En la región río debajo de estos 3 genes se localiza la secuencia del gen *repC*. Esta secuencia fue clonada en el plásmido pUX19.



**Figura 6.1.** Se Muestra la secuencia *repC* obtenida de *R. tropici* CFN299 que fue comparada en la base de datos. Las secuencias debajo del número 1 corresponden a un gen *psiB*, la secuencia debajo de 2 a una secuencia desconocida encontrada sólo en *R. tropici* CFN299 y las secuencias debajo del número 3 a un gen *repC*.

La proteína PsiB previene la inducción de la respuesta SOS tras un proceso de conjugación en bacterias receptoras. Dicha acción anti-SOS inhibe la activación de la proteína RecA, la cual a su vez previene la actividad de LexA, por lo que el producto de *psiB* promueve de esta manera la instalación de un replicón en la nueva célula a donde fue transferido. Así el pSym podría ser transferido a otras bacterias.

En el análisis de la secuencia clonada se observa que el grado de identidad en secuencia de aminoácidos de *repC* de *R. tropici* CFN299 con el gen *repC* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 es de 63%. En la región promotora del gen *repC* de *R. tropici* CFN299 se localizó una secuencia que codifica un RNA antisentido y esta secuencia tiene una identidad con el RNA antisentido de *S. meliloti* GR4 del 81%, sin embargo con el resto de la región promotora no existe ninguna identidad entre ambas secuencias (Fig. 6.2).



**Figura 6.2.** Comparación entre genes *repC* de *R. tropici* CFN299 y *R. meliloti*. Los genes que codifican para los ctRNAs se representan en rectángulos, se observa que en la región promotora sólo hay identidad desde el ctRNA hasta el inicio del gen *repC* y ésta es del 81%. Los genes *repC* comparten una similitud del 63% a nivel de aminoácidos.

Al no obtener replicación de la construcción A789 y tomando en cuenta resultados de trabajos previos podemos deducir las posibles causas por las que *repC* no se replica en *A. tumefaciens*:

- a) Posiblemente *psiB* y la región desconocida interfieran en la expresión del gen *repC* y tengan una función de regulación negativa sobre el replicador.
- b) Se regule de otra manera por elementos regulatorios distintos a los presentes en *repC* de *S. meliloti* GR4.
- c) Que el ctRNA funcione de manera diferente a *S. meliloti* GR4.

Para tener una posible respuesta, de por qué *repC* no es funcional se deben responder los puntos anteriores para tener un acercamiento al funcionamiento del replicador.

En el inciso a) sería necesario realizar diversos recortes de la región promotora y analizar su expresión mediante fusiones transcripcionales. Los recortes nos indicarían cuales regiones río arriba de la proteína RepC están involucradas en la represión del replicador *repC*. También sería necesario eliminar específicamente el gen *psiB* y la secuencia sin homología, ya que así se tendría una región como la reportada para *S. meliloti* GR4, en la cual la región mínima replicable está conformada por *repC*, su secuencia promotora y dentro de esta secuencia se localiza el gen que codifica para el ctRNA (Izquierdo *et al.*, 2005).

En el caso b) al realizar una comparación del promotor *repC* de *R. tropici* CFN299 en la base de datos, el mayor grado de identidad fue con el promotor del gen *repC* del plásmido pRmeGR4a, sin embargo la identidad se restringe al gen para el ctRNA de *S. meliloti* (Fig. 6.2). La parte restante del promotor no tiene similitud alguna. Esto indica que la región promotora del gen *repC* *R. tropici* CFN299 no es similar a la del gen *repC* del plásmido pRmeGR4a, por lo que se puede sugerir que se regulan de manera diferente.

Una solución a este problema sería clonarle al gen *repC* de *R. tropici* CFN299 un promotor funcional como el de *S. meliloti* ya que ambos promotores contienen un gen que codifica un ctRNA y se tiene la idea de que sea probablemente requerido para la formación de un complejo de iniciación (Izquierdo *et al.*, 2005), así se tendría una posible respuesta acerca de si el promotor es funcional o no, o quizás la región regulatoria posea más elementos de regulación negativa que *S. meliloti*.

En c) al comparar el gen para el ctRNA que se localiza en la región promotora del gen *repC* de *R. tropici* CFN299 con otros 7 homólogos, 5 pertenecientes a *repABC* y 2 a *repC* se encontró que 1 nucleótido en *repC* de *R. tropici* CFN299 es diferente a los

que se encuentran conservados en las otras 7 secuencias, éste se muestra en rojo (Fig. 6.3).

Esta comparación nos podría indicar que al ser diferente el gen para el ctRNA en un nucleótido conservado en los otros, posiblemente funcione de manera distinta al de pRmeGR4a.

```

1 pRmeGR4b      TTGACAGGGAAGGGAAGGTCGCCGAGAAAGGATCGGCTTATTTATCTACT--TTGACCCCGCTCCGGACTGTTCGGGAGCGGTTTTCTTTTTC-
2 repC tropici TTGACAAGGAAGGAAGGTCGCCGACAAAGGTTGGCTAATTTATCTCT--TACAGACCCGCTCCGGATGCTTCGGGAGCGGTTTTCTTTTTT-
3 pRmeGR4a      TTGACAGGGAAGGGAAGGTCGCCGAGAAAGGATCGGCTTATTTATCTACTCTTTGACCCCGCTCCGGACTGTTCGGGAGCGGTTTTCTTTTTC-
4 repABC tropici TTGACAGGGAATCGGGAAAATCCGATTCCTCAATCTTGGCTTAGGGAATACGAGAGGCTCCACGACTTG-GTCGTTGGGGCTTTTTCTTTTTCGG
5 pRetCFN42d    TTGACAGGGAATCGGGAAAATCCGATTCCTGTTCTTCCTACAGAG-ACAGSA--AGGGCTTCCACGAGGGGACGTTGAGGGAGCTTTTTCTTTTTCGG
6 pSymB         TTGACACTGATTCGCGAAGTGGGATTCCTCTAGTTTCCTACAC-G-AGAGA--AGGGTTCCGGAGCGCTAGTCGTTGGGAGGCTTTTTCTTTTTCC-
7 pTiC58        TTGACTACGATTCCTGGAAAATCCGATTCCTTAGCTGCGAGACTACAGAGA--AGGCTTCCGGAACGCCG--TTTCGGGGCCCTTTTTCTTTTTCGG
8 pSymA         TTGACTGTGATTCCTGGAAAATCCGATTCCTCGATCTTCCATCAAACTCGAGG--AAGGCTTCCAGGCC-TTGTTCGTTGGGGCCCTTTTTCTTTTTCGG
    
```

**Figura 6.3.** Comparación de algunos genes que codifican para un ctRNA de replicadores *repC* y *repABC*. De la secuencia 1 a 3 se observan los pertenecientes a la familia *repC* y de la secuencia 4 a 8 se muestran los pertenecientes a la familia *repABC*. En la secuencia 2 se muestra el gen para el ctRNA de *R. tropici* CFN299 que se localiza en la región río arriba del gen *repC* del pSym, en esta secuencia se muestra en rojo un nucleótido distinto a todos las demás que se conservan completamente. También se muestra en la secuencia 4 el gen para el ctRNA del operón *repABC* del pSym de *R. tropici* CFN299. La secuencias 1 y 3 corresponden a *S. meliloti* GR4, las secuencias 6 y 8 a *S. meliloti*, la 5 a *R. etli* y la 7 a *A. tumefaciens*.

Al haber un nucleótido distinto existiría la probabilidad de que el gen que codifica para el ctRNA pudiera estar mutado en *repC* de *R. tropici* CFN299 y como es esencial para la replicación de *repC* (Izquierdo *et al.*, 2005), posiblemente esta sea una razón por la cual no se replica.

Para saber si el gen que codifica para el ctRNA está mutado puede hacerse un experimento en el que se cambie el nucleótido que se encuentran en las otras 7 secuencias, o clonar la región promotora del gen *repC* de *R. tropici* CFN299 al gen *repC* de *S. meliloti* y observar si este gen que sabemos es funcional se expresa, en el caso contrario sabremos que el ctRNA o el promotor está impidiendo la replicación de *repC* de *R. tropici* CFN299.

Al existir dos moléculas silvestres de ctRNA se observa incompatibilidad sin embargo cuando uno de los dos genes que codifican para el ctRNA se encuentra mutado no existe incompatibilidad (Izquierdo *et al.*, 2005). En *R. tropici* CFN299 no hubo desplazamiento del pSym cuando se transfirió la construcción A789, debido a que el gen que codifica para el ctRNA no se está expresando, razón por la cual A789 recombinó en el pSym.

Como se argumentó anteriormente, puede ser el caso de que la proteína RepC de *R. tropici* CFN299 no sea funcional, pero también podría ser que en ausencia de

*repABC* este origen se replique. Posiblemente *repC* se podría expresar en algún momento de la vida libre o simbiótica de *R. tropici* CFN299.

## 6.2. Operón *repABC*

En este trabajo se identificó y se obtuvo el operón *repABC* que es el replicador básico de *R. tropici* CFN299. El gen *repC* del operón es esencial para la replicación del pSym, sin embargo este gen al clonarlo con una parte del gen *repB* (construcción A610) no replicó el plásmido en el cual fue clonado. También al clonar el operón con el gen *repA* interrumpido en la región río arriba (A766) se obtuvo el mismo resultado. Esto indica que los 3 genes están organizados en un operón y que *repC* no fue capaz de replicarse debido a que no se encontraba el promotor del operón.

El operón funcional *repABC* se obtuvo mediante deleciones producidas por reacciones de digestión en un fragmento mínimo *Bam*HI-*Mlu*I de aproximadamente 5.5 kb. Se han reportado fragmentos replicables mínimos estables desde 4.2 kb como el del plásmido pTiB6S3 (Tabata *et al.*, 1989), 4.3 kb como el del pSym p42 de *R. etli* (Ramírez-Romero *et al.*, 2000) hasta 5 kb como el pRL8J1 de *R. leguminosarum* (Turner y Young, 1995), lo cual indica que se puede obtener un tamaño menor del operón *repABC* de *R. tropici* CFN299.

El operón *repABC* de *R. tropici* CFN299 contiene al igual que los replicadores de la familia *repC* un gen que codifica para un ctRNA localizado entre *repB* y *repC* el cual se conserva en ambas familias y funciona como sitio de incompatibilidad (Fig. 6.2). También en el operón *repABC* de *R. tropici* CFN299 se localizó otro sitio de incompatibilidad llamado *parS*.

Al transferir la construcción A627, la cual contiene al operón completo y funcional a *R. tropici* CFN299, no se provocó ninguna incompatibilidad con el pSym, esto posiblemente se deba a la acción del mecanismo de recombinación de *R. tropici* CFN299 el cual la evita. Otra posibilidad es que el pSym tenga genes esenciales para la vida libre de *R. tropici* CFN299 y no sea posible deletarlo por completo y como se ha mencionado algunos plásmidos de *Rhizobium* son esenciales en la vida libre de bacterias fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, se requiere realizar experimentos en los cuales se inactive el gen *repC* del operón, este experimento nos indicaría además si solamente *repABC* es funcional en el pSym o si bajo estas condiciones el replicador *repC* podría ser funcional.

Cuando se conjugó la construcción A627 a *R. tropici* CFN299 recombinó con el pSym formando un cointegrado estable. Este mismo resultado se ha observado con el plásmido pCFN42d de *R. etli* CFN42 el cual forma un cointegrado cuando se le transfiere una construcción conteniendo el replicón de este plásmido. Sólo se puede ejercer incompatibilidad en 2 condiciones: cuando se introduce la construcción en una cepa de *R. etli* *recA* menos, la cual evita la recombinación y cuando además del replicador básico se incluye en la construcción un sitio de acción (*ris*) un sitio específico para la recombinasa RinQ en la misma orientación del plásmido parental (Quintero *et al.*, 2002). Realizando experimentos, en los cuales se incluyan las 2 condiciones anteriores mencionadas podría obtenerse una cepa de *R. tropici* CFN299 con el pSym curado, y por lo tanto demostrar si el pSym es esencial para la vida libre de la bacteria.

Existe otra razón por la cual se formó un cointegrado de la construcción A627 con su plásmido parental, quizás es debido a que existen genes que tienen influencia en la incompatibilidad y estabilidad del plásmido, y estos no se incluyan en la construcción. Esto se ha observado en los plásmidos pCFN42d y pTi-SAKURA en donde existen elementos genéticos que tienen propiedades para su incompatibilidad y estabilidad, y que no se encuentran dentro del operón (Cevallos *et al.*, 2008).

Actualmente con las secuencias de los genomas de algunos plásmidos depositadas en el GeneBank se puede observar qué genes están cercanos al operón *repABC* y cuáles de ellos se relacionan con un operón *traI-trb*, esto nos permitirá saber que plásmidos están regulados por un mecanismo de respuesta en coro. El operón *repABC* del plásmido Ti de *Agrobacterium* es regulado positivamente por el operón *traI-trb* mediante el mecanismo de respuesta en coro (Li y Farrand, 2000). En el pSym de *R. tropici* CFN299 se encontró un gen *traI* adyacente a *repA* en dirección opuesta con una identidad del 64% con el de *Agrobacterium*, pero mientras no se tenga una región más grande secuenciada donde se localice un gen *trb* no se sabrá si el replicador es regulado por el mecanismo de respuesta en coro o si la secuencia con identidad a *traI* es un pseudogen como es el caso del plásmido pCFN42d que solamente contiene una secuencia con similitud a *traI* pero carece de *trb*. En términos evolutivos, la localización de una parte de la secuencia del operón *traI-trb* cercana al operón *repABC* en algún plásmido significa que estos plásmidos derivan de un mismo ancestro común.

Por otra parte el pSym de *R. tropici* CFN299 podría ser un bireplicón causado por la cointegración de un plásmido entrante con un plásmido residente, pues se ha

reportado que la formación de cointegrados entre plásmidos incompatibles de la familia *Rhizobaceae* es frecuente (Ramírez-Romero *et al.*, 1997) y estos cointegrados son estables. En este caso uno de los 2 replicadores puede cambiar acumulando mutaciones y perder su funcionalidad sin arriesgar otras funciones codificadas en el plásmido (Cevallos *et al.*, 2002).

Los datos obtenidos en el presente trabajo son útiles para el estudio del funcionamiento del pSym de la cepa de *R. tropici* CIAT899 ya que se localizaron genes ortólogos para *repC* y *repABC* en esta cepa.

## VII. CONCLUSIÓN

- Se identificaron 2 orígenes de replicación en el pSym de *R. tropici* CFN299, uno de la familia *repABC* y el otro perteneciente a *repC*.
- Se aislaron, secuenciaron y clonaron ambos replicadores del pSym de *R. tropici* CFN299
- Sólo el replicador de la familia *repABC* fue capaz de replicar autónomamente en *A. tumefaciens*
- Los genes *repA*, *repB* y *repC* se encuentran formando un operón.
- *repC* y *repABC* no producen incompatibilidad con el pSym.



## VIII. APÉNDICE

### 8.1. Medios de cultivo

#### **MEDIO PY** (Noel *et. al.*, 1984)

Peptona de caseína 5 g

Extracto de levadura 3 g

CaCl<sub>2</sub> 1 g

Agar (en medios sólidos) 15 g

H<sub>2</sub>O Para 1 litro

Calcio 1M (1ml/100ml de medio estéril)

#### **MEDIO LB** (Sambrook *et. al.*, 1989)

Peptona de caseína 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Agar (en medios sólidos) 15 g

H<sub>2</sub>O Para 1 litro

## **8.2. Protocolos**

### **PURIFICACIÓN DEL DNA (Amersham biosciences, GenomicPrep cells)**

#### **Lisis celular**

1. Agregar 1 mL de células en suspensión, crecidas toda la noche a un tubo de 1.5 mL.
2. Centrifugar a 14000 rpm 1 min hasta obtener un pellet. Remover el sobrenadante.
3. Adicionar 600 µL de solución para lisar células y pipetear suavemente hasta resuspender.
4. Incubar la muestra a 80 °C por 10 min para lisar las células. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.

#### **Tratamiento RNasa**

5. Adicionar 3 µL de solución RNasa A las células lisadas.
6. Vortexear la muestra.

#### **Precipitación de proteínas**

7. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
8. Adicionar 200 µL de solución para precipitar proteínas.
9. Vortexear a alta velocidad 20 seg para mezclar uniformemente la solución para precipitar proteínas con las células lisadas.
10. Centrifugar a 14000rpm por 10 min.

#### **Precipitación del DNA**

11. Tomar cuidadosamente el sobrenadante que contiene el DNA en un tubo de 1.5 mL que contenga 600 µL de isopropanol al 100%.
12. Vortexear la muestra.
13. Centrifugar a 14000rpm por 10 min, el DNA debe verse como un pequeño pellet blanco.
14. Retirar el sobrenadante y secar el tubo en papel secante. Adicionar 600 µL de etanol al 70%. Invertir el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA.
15. Centrifugar a 14000rpm 10 min. Cuidadosamente retirar el etanol sin desalojar el pellet de DNA.
16. Drenar el tubo en papel secante y secar en savant 15 min.

#### **Hidratación del DNA**

17. Adicionar 50 µL de H<sub>2</sub>O al pellet de DNA para hidratarlo.
18. Calentar a 65 °C por una hora, vortexear para dispersar el DNA y dejar el tubo de DNA hidratando toda la noche a temperatura ambiente.

19. Guardar de 2-8 °C.

### **PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS** (Roche Applied Science, Germany)

1. Centrifugar 1.5 mL de medio líquido con bacterias *E. coli* en tubos eppendorf durante 1 min, retirar el sobrenadante, agregar nuevamente 1.5 mL de medio con bacterias, repetir 3 veces.
2. Resuspender el pellet en 250 µL de solución de suspensión buffer/RNasa y vortexear fuertemente.
3. Adicionar 250 µL de lisis buffer, vortexear 1 vez e incubar 5 min a temperatura ambiente.
4. Adicionar 350 µL de chilled binding buffer, vortexear e incubar los tubos en hielo durante 5 min.
5. Centrifugar 10 min a 14000rpm.
6. Insertar un tubo High Pure Filter dentro de un tubo colector por muestra.
7. Transferir el sobrenadante sobre el tubo con filtro.
8. Centrifugar 1 min a 14000rpm.
9. Desconectar el tubo con filtro y desechar el líquido filtrado, conectar de nuevo el tubo.
10. Adicionar 700 µL de Wash buffer II y centrifugar a 14000rpm 1 min.
11. Desconectar el tubo con filtro, desechar el líquido filtrado, reconectar, centrifugar 1 min para remover los residuos del Wash buffer II y desechar el líquido filtrado
12. Insertar el tubo con filtro dentro de un tubo eppendorf adicionar 100 µL de H<sub>2</sub>O en el tubo con filtro y centrifugar 1 min a 14000rpm, obteniendo finalmente así los plásmidos en el tubo eppendorf.

### **AMPLIFICACIÓN POR PCR**

Para cada muestra a amplificar por PCR se preparan 2 reacciones

#### **Reacción II**

2.8 µL H<sub>2</sub>O, 6 µL Buffer II, 4 µL dNTPs (0.8mM), 2.2 µL Mg (1.1mM), 2.5 µL de cada oligonucleótido, upper primer y lower primer (10 pmol/µL).

#### **Reacción I**

19 µL H<sub>2</sub>O y 0.5 µL de DNA polimerasa (0.02 unidades/µL).

En un tubo para PCR agregar 2 µL de DNA como templado para un volumen final de

50  $\mu\text{L}$ , adicionar los 28.5  $\mu\text{L}$  de reacción del tubo II y después los 20  $\mu\text{L}$  de reacción del tubo I. Colocar en termociclador sin mezclar las muestras.

### **TRANSFORMACIÓN BACTERIANA**

1. Colocar la ligación en un tubo eppendorf que contiene 100  $\mu\text{L}$  de células competentes, dejar en hielo 45 min.
2. Poner a 42 °C por 2 min.
3. Colocar en hielo por 2 min.
4. Transferir la transformación a un tubo de ensaye con 1 mL de medio LB e incubar a 37 °C por una hora en agitación.
5. Platear 100  $\mu\text{L}$  de la transformación en cajas petri con los antibióticos necesarios para la selección de cada construcción y cepa, IPTG 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y X-gal 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
6. Incubar toda la noche a 37 °C.
7. Seleccionar colonias recombinantes.

### **CONJUGACIÓN BACTERIANA**

1. Crecer las cepas (donadora, ayudadora y receptora) en 5 ml de medio líquido toda la noche a 30°C.
2. Tomar 1.5 mL de cepa receptora y 0.75 mL de las cepa donadora y ayudadora en tubos por separado.
3. Centrifugar los tubos a 14000 rpm durante un minuto y retirar el sobrenadante.
4. Agregar a los tubos 1 mL de NaCl 0.85%, vortexear y resuspender.
5. Centrifugar a 14000 rpm durante un minuto y retirar el sobrenadante.
6. Resuspender en 150  $\mu\text{L}$  de NaCl 0.85%.
7. Tomar 50  $\mu\text{L}$  de la cepa donadora, 50  $\mu\text{L}$  de la cepa ayudadora y 100  $\mu\text{L}$  de la cepa receptora y mezclar en tubos eppendorf (cruzas).
8. Colocar la mezcla en medio LB sólido.
9. Como control crecer en medio LB sólido 50  $\mu\text{L}$  de cada cepa por separado.
10. Incubar todas las cajas con medio sólido a 30° C por 24 horas.
11. De las cruzas crecidas tomarlas con un palillo y colocarlas en 1 mL de NaCl 0.85%
12. Vortexear las cruzas y hacer diluciones de  $10^0$  a  $10^{-3}$ .
13. Platear 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución y controles en cajas con medio líquido y antibioticos.

14. Incubar las cajas a 30° C.

## SOUTHERN BLOT

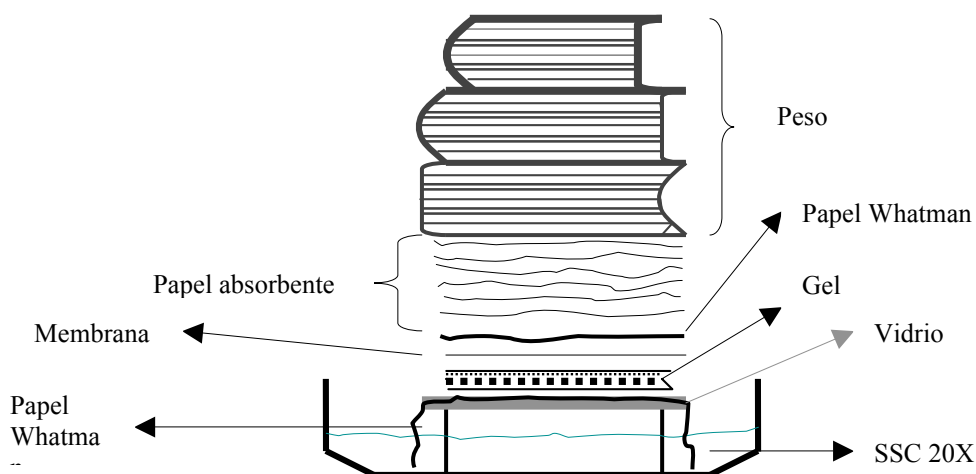
### Obtención del gel

1. Purificar DNA cepa A303.
2. Digerir DNA con enzima de restricción *BamHI*.
3. Correr en gel de agarosa al 0.85% en tris acetatos 1X.
4. Teñir con bromuro de etidio y visualizar en transiluminador de luz UV.

### Depuración del gel

5. Sumergir el gel en HCl 0.25 N (20.8 mL de HCl concentrado en 1 lt de H<sub>2</sub>O) 15 min a temperatura ambiente dos veces.
6. Lavar con H<sub>2</sub>O.
7. Desnaturalizar sumergiendo el gel en una solución 0.5 N de NaOH (20 g en 1 lt de H<sub>2</sub>O) y 1.5 M de NaCl (87.75 g en 1 lt de H<sub>2</sub>O) 45 min a temperatura ambiente.
8. Lavar con H<sub>2</sub>O.
9. Sumergir en SSC 6X por 10 min a temperatura ambiente (SSC 20X: NaCl 175.2 g, citrato de sodio 84.2g, adicionar H<sub>2</sub>O hasta 1 lt).
10. Transferir el DNA digerido del gel a una membrana de nylon. El gel se coloca en un sistema de transferencia como el de la imagen. Transferir durante 24 horas y cambiar frecuentemente el papel absorbente.

### Transferencia de DNA a membrana



11. Marcar los carriles en la membrana de nylon y lavar membrana con SSC 2X

por 10 min.

12. Secar a 65 °C 20 min.
13. Fijar DNA con luz UV 5 min.
14. Prehibridizar membrana con solución de hibridación (Rapad-hyb buffer Amersham Pharmacia Biotech) por lo menos 15 min antes de colocar la sonda marcada con <sup>32</sup>P radioactivo.

### Marcaje radioactivo

1. De la sonda (*repBC*) tomar 5 µL y agregarlos a tubos eppendorf.
2. agregar al tubo 40 µL de EDTA 10:1 pH8.
3. vortexear y centrifugar solo para bajar la muestra.
4. Calentar a 95 °C por 10 min para desnaturalizar la muestra.
5. Enfriar en hielo por 5 min.
6. Centrifugar poco solo para bajar la muestra.
7. Pasar los 45 µL de solución a los tubos de reacción Rediprime (Solución de dATP, dGTP y dTTP, enzima klenow libre de exonucleasa y oligonucleótidos de 6 nucleótidos).
8. Mezclar.
9. Adicionar 5 µL de <sup>32</sup>P y mezclar hasta obtener un color púrpura.
10. Centrifugar.
11. Incubar 2 horas a 37 °C.
12. Adicionar 600 µL de Magic probe (acetato de amonio 2.5 M, DNA de esperma de salmón 0.6 mg/mL, EDTA 20 mM).
13. Adicionar 1 mL de isopropanol al 100%.
14. Mezclar con vortex.
15. Centrifugar 10 min y tirar sobrenadante.
16. Resuspender en 100 µL de NaOH 0.1 M y vortexear mucho.
17. Contar cuentas por minuto en un contador de cuentas radioactivas (probe count).
18. Colocar los 100 µL en un vial con 2 mL de solución para prehibridizar.
19. Adicionar sondas ya marcadas a las membranas prehibridizadas y dejar toda la noche hibridizando.
20. Lavar membrana con solución SSC 2X y SDS 0.1% 10 min, SSC 1X y SDS 0.1% 10 min, SSC 0.5X y SDS 0.1% 10 min, SSC 0.1X y SDS 0.1% 10 min, SSC 0.1X y SDS 0.1% 10 min a 65 °C y finalmente SSC 0.1X sin SDS hasta

eliminar el detergente.

**21.** Secar a 65 °C.

**22.** Exponer membrana a una película Kodak.

**23.** Revelar.

---

---

**IX. REFERENCIAS**

- Barran LR, Ritchot N, Bromfield ES: ***Sinorhizobium meliloti* plasmid pRm1132f replicates by a rolling-circle mechanism.** *J Bacteriol* 2001, **183**:2704–2708.
- Bartosik D, Baj J, Wlodarczyk M: **Molecular and functional analysis of pTAV320, a repABC-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1.** *Microbiology* 1998,**144**:3149–3157.
- Bartosik D, Szymanik M, Wysocka E: **Identification of the partitioning site within the repABC-type replicon of the composite *Paracoccus versutus* plasmid pTAV1.** *J Bacteriol* 2001, **21**:6234–6243.
- Báscones E, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, y Palacios J.M: **Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel *hup* minitransposon.** *App Env Microbiol* 2000, **66**: 4292-4299.
- Bouet JY, Funnell BE: **P1 ParA interacts with the P1 partition complex at *parS* and an ATP-ADP switch controls ParA activities.** *EMBO J* 1999, **18**:1415-1424.
- Brom S, García de los Santos A, Cervantes L, Palacios R, Romero D: **In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons.** *Plasmid* 2000, **44**:34-43.
- Burgos PA, Velázquez E, Toro N: **Identification and distribution of plasmid-Type A replicator region in Rhizobia.** *Mol Plant Microbe Interact* 1996, **9**:843-846.
- Cevallos MA, Porta H, Izquierdo J, Tun-Garrido C, García de los Santos A, Dávila G, Brom S: ***Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the repABC family: a structural and evolutionary analysis.** *Plasmid* 2002, **48**:104–116.
- Cevallos MA, Cervantes-Rivera R, Gutiérrez-Ríos RM: **The *repABC* plasmid family.** *Plasmid* 2008, **60**:19-37.
- Chai Y, Winans SC: **A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid.** *Mol Microbiol* 2005, **56**:1574-1585.
- Cho H, Winans SC: **VirA and VirG activate the Ti plasmid repABC operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:14843–14848.
- Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R: **Replication and Control of circular bacterial plasmids.** *Microbiol and Mol Biol Rev* 1998, **62**:434-464.
- Ebersbach G, Gerdes K: **Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral- shaped structures and positions plasmids at mid-cell.** *Mol Microbiol* 2004, **52**:385-398.



- Escobar MA, Dandekar AM: ***Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease.** *Trends Plant Sci* 2003, **8**:380–386.
- Figurski DH, Helinski DR: **Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, **76**:1648-1652.
- Finan TM, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorhölter FJ, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A, Gouzy J, Golding B, Pühler A: **The complete sequence of the 1683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixin endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:9889-9894.
- Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton J, Rosenthal A, Perret X: **Molecular basis of symbiosis between *R. tropici* and legumes.** *Nature* 1997, **387**:394-401.
- Funnell BE: **Partition-mediated plasmid pairing.** *Plasmid* 2005, **53**:119-125.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola A, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe M, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dréano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thébault P, Vandenbol M, Vorhölter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Chen Yeh K, Batut J: **The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*.** *Science* 2001, **293**:668-672.
- García de los Santos A, Brom S, Romero D: **Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions.** *World J Microbiol Biotechnol* 1996, **12**:119-125.
- Geniaux E, Flores M, Palacios R, Martínez E: **Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes.** *Int J Sist Bacteriol* 1995, **47**:392- 394.
- Gerdes K, Moller-Jensen J, Jensen RB: **Plasmid and cromosome partition: surprises from phylogeny.** *Mol Microbiol* 2000, **37**:455–466.
- González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, Dávila G: **The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **10**:3834-3839.
- González V, Bustos P, Ramírez-Romero MA, Medrano-Soto A, Salgado H, Hernández González I, Hernández-Celis JC, Quintero V, Moreno-Hagelsieb G, Girar L, Rodríguez O, Flores M, Cevallos MA, Collado-Vides J, Romero D, Dávila G: **The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments.** *Genome Biology* 2003, **4**: R 36

- 
- Hernández-Lucas I, Mavingui P, Finan T, Chain P, Martínez-Romero E: **In vivo cloning strategy for *Rhizobium* plasmids.** *Biotechniques* 2002, **33**:728-788.
- Hernández- Lucas I, Pardo MA, Segovia L, Miranda J, Martínez-Romero E: ***Rhizobium tropici* cromosomal citrate synthase gene.** *Appl Environ Microbiol* 1995a, **61**:3992-3997.
- Hernández- Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E, Pueppke SG: **Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L.** *Appl Environ Microbiol* 1995b, **61**:2775-2779.
- Higashi S: **Transfer of clover infectivity of *R. trifolii* to *R. phaseoli* as mediated by an episomic factor.** *J Gen Appl Microbiol* 1967, **13**:391–403.
- Hungria M, Vargas MAT: **Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil.** *Field Crops Res* 2000, **65**:151-164.
- Hynes MF, McGregor NF: **Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*.** *Mol Microbiol* 1990, **4**:567–574.
- Izquierdo J, Venkova-Canova T, Ramírez-Romero MA, Téllez-Sosa J, Hernández- Lucas I, Sanjuán J, Cevallos MA: **An antisense RNA plays a central role in the replication control of a *repC* plasmid.** *Plasmid* 2005, **54**:259–277.
- Jensen RB, Lurz R, Gerdes K: **Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by *parC* of plasmid R1.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:8550-8555.
- Li P, Farrand SK: **The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing system.** *J Bacteriol* 2000, **182**:179–188.
- Khan SA: **Rolling-circle replication of bacterial plasmids.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, **61**:442-455.
- Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J: ***Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity.** *Crit Rev Plant Sci* 1996, **15**:113-140.
- Martínez-Romero E, Palacios R, Sánchez F: **Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids.** *J Bacteriol* 1987, **6**:2828–2834.
- Martínez-Romero E, Rosenblueth M: **Increased bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains.** *App Env Microbiol* 1990, **56**:2384-2388.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA: ***Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp* trees.** *Int J Sist Bacteriol* 1991, **41**:417-426.

- Mavingui P, Flores M, Romero D, Martínez-Romero E, Palacios R: **Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA).** *Nature Biotechnol* 1997, **15**:564-569.
- Mercado-Blanco J, Olivares J: **The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids.** *Plasmid* 1994, **32**:75-79.
- Mercado-Blanco J, Olivares J: **Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4.** *Arch Microbiol* 1993, **160**:477-485.
- Mostasso L, Mostasso FL, Díaz BG, Vargas MAT, Hungria M: **Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the brazilian cerrados.** *Field Crops Res* 2002, **73**:121.
- Noel KD, Sánchez A, Fernández L, Leemans J, Cevallos MA: ***Rhizobium phaseoli* symbiotic mutans with transposon Tn5 insertions.** *J Bacteriol* 1984, **158**:148-155.
- Pappas KM, Winans SC: **The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid *repABC* operon.** *Mol Microbiol* 2003, **49**:441-455.
- Perret X, Freiberg C, Rosenthal A, Broughton WJ, Feilla R: **Highresolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234.** *Mol Microbiol* 1999, **32**:415-425.
- Quintero V, Cevallos MA, Dávila G: **A site-specific recombinase (RinQ) is required to exert incompatibility towards the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*.** *Mol Microbiol* 2002, **46**:1023-1032.
- Ramírez-Romero MA, Bustos P, Girard L, Rodríguez O, Cevallos MA, Dávila G: **Sequense, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*.** *Microbiology* 1997, **143**:2825-2831.
- Ramírez-Romero MA, Soberón N, Pérez-Oseguera A, Téllez-Sosa J, Cevallos MA: **Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid.** *J Bacteriol* 2000, **182**:3117-3124.
- Ramírez-Romero MA, Téllez-Sosa J, Barrios H, Pérez-Oseguera A, Rosas V, Cevallos MA: **RepA negatively autoregulates the transcription of the *repABC* operon of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid basic replicon.** *Mol Microbiol* 2001, **42**:195-204.
- Ramírez-Trujillo JA, Encarnación S, Salazar E, García de los Santos A, Dunn MF, Emerich DW, Calva E, Hernández-Lucas I: **Functional characterization of *Sinorhizobium meliloti* acetate metabolism genes *aceA*, *SMc00767* and *glcB*.** *J Bacteriol* 2007, **189**:5875-5884.

- 
- 
- Rey L, Murillo J, Hernando Y, Hidalgo E, Cabrera E, Imperial J, Ruiz-Argüeso: **Molecular analysis of a microaerobically induced operon required for hydrogenase in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*.** *Mol Microbiol* 1993, **8**:471-481.
- Rogel MA, Hernández-Lucas I, Kuykendall D, Balkwill D, Martínez-Romero E: **Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:3264-3268.
- Rosenberg C, Huguet T: **The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumour induction.** *Mol Gen Genet* 1984, **196**:533-536.
- Rosenblueth M, Hynes F, Martínez-Romero E: ***Rhizobium tropici* *teu* genes involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds.** *Mol Gen Genet* 1998, **258**:587-598.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TA: 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Simon R, Priefer U, Pühler A: **A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.** *Bio/Technology* 1983, **1**:784-791.
- Schofield PR, Gibson AH, Dudman FW, Watson JM: **Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population.** *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**:2942-2947.
- Soberón N, Venkova-Canova T, Ramírez-Romero MA, Tellez-Sosa J, Cevallos MA: **Incompatibility and the partitioning site of the *repABC* basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*.** *Plasmid* 2004, **51**:203-216.
- Southern EM: **Detection of specific sequens among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J Mol Biol* 1975, **98**:503-517.
- Spaink HP: **Root nodulation and infection factors produced by Rhizobial bacteria.** *Annual Rev in Microbiol* 2000, **54**:257-288.
- Tabata S, Hooykaas PJ, Oka A: **Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumorinducing plasmid pTiB6S3.** *J Bacteriol* 1989, **171**:1665-1672.
- Turner SL, Young JPW: **The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8Jl.** *FEMS Microbiol Lett* 1995, **133**:53-58.
- Venkova-Canova T, Soberón NE, Ramírez-Romero MA, Cevallos MA: **Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure.** *Mol Microbiol* 2004, **54**:1431-1444.
- Villadas PJ, Velázquez E, Martínez-Molina E, Toro N: **Identification of nodule-dominant *Rhizobium meliloti* strains carrying pRmeGR4b type plasmid within indigenous soil populations by PCR using primers derived from specific DNA sequences.** *FEMS Microbiol Ecol* 1995,**17**:161-168.

- Viera J, Messing J: **New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins.** *Gene* 1991, **100**:189-194.
- Wang E, Martínez-Romero J, López-Lara I: ***Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas.** (<http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>) 2001.
- Waters JK, Hughes BL, Purcell CL, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW: **Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:12038-12042.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML: **Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**:4576-4579.
- Young JW, Crossman LC, Johnston AWB, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson ARJ, Todd JD, Poole PS, Mauchline TH, East AK, Quail MA, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach A, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S, Parkhill J: **The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components.** *Genome Biol* 2006, **7**:R34.
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC: **The bases of crown gall tumorigenesis.** *J Bacteriol* 2000, **182**:3885–3895.