



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Transferencia conjugativa de plásmidos de rizobios durante la simbiosis y en diversas condiciones ambientales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Luis Alfredo Bañuelos Vazquez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Susana Brom Klanner
Centro de Ciencias Genómicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Instituto de Biotecnología

Dra. Esperanza Martínez Romero
Centro de Ciencias Genómicas

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2019.



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.

El presente trabajo fue realizado en el programa de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Susana Brom Klanner.

Durante el desarrollo del presente trabajo recibí financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario 384814, así como apoyo del proyecto PAPIIT-UNAM IN203515. Así mismo, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo económico brindado durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata-CONICET, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina, Además del financiamiento para asistir a congresos nacionales e internacionales donde se presentó este trabajo.

Agradecimientos

A la Dra. Susana Brom Klanner, gracias por la confianza que deposito en mi de principio a fin, por sus consejos, disponibilidad, apoyo, paciencia, sabiduría. Me siento muy afortunado y privilegiado de haber estado bajo su asesoría. Por que además de ser una excelente tutora encontré a una gran amiga.

Al Dr. David Romero Camarena, gracias por su apoyo incondicional tanto en lo personal como académico, por sus enriquecedores comentarios que llevaron a una mejora para la realización de este proyecto.

A los Drs. Pablo Vinuesa y Alejandro García de los Santos, gracias por sus comentarios en el laboratorio y seminarios de grupo.

A los Drs. Esperanza Martínez y Guadalupe Espín, gracias por ser miembros de mi comité tutor, por sus aportaciones y comentarios a lo largo del presente proyecto.

A los miembros del Jurado Revisor: los Drs Katy Juárez, Gabriela Olmedo, José Luis Puente, Miguel Lara, Jesús Silva, gracias por el tiempo y esfuerzo invertido para leer y corregir el presente escrito.

A los Drs. Gonzalo Torres Tejerizo y Antonio Lagares, y miembros del laboratorio del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata-CONICET, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina, gracias por amabilidad, disponibilidad y consejos durante mi estancia.

A la M en C. Laura Cervantes De la Luz, gracias por tu apoyo técnico para el desarrollo de este trabajo, por tu disponibilidad de enseñar y por tu sincera e incondicional amistad.

A los técnicos académicos del laboratorio del programa de Ingeniería Genómica: M. en C. Araceli Dávalos Rodríguez y al IQ. Javier Rivera Campos, gracias por su apoyo técnico, disponibilidad y consejos para la realización de este trabajo.

A los técnicos académicos Q.F.B. Xóchitl Alvarado-Affantranger, M. en C. Andrés Saralegui Amaro de el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de el Instituto de Biotecnología, UNAM, y a los Drs Alfonso Leija y Georgina Hernández de el programa de Genómica Funcional de Eucariotes, de el Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, gracias por su apoyo tecnico.

A mis amigos y compañeros de laboratoto, Daniel, Julio, Pedro, Antonio, Mariana, Osama, Sofia, Mariana, y los que ya no estan presentes: Fabiola, Osam, Rogelio, gracias a todos ustedes por compatir momentos iniguablables, sus alegrías, enojos, consejos y sobre todo por hacer mas llevaderas esas tardes arduas de trabajo.

A Jose Espiritu Salazar, gracias por toda tu amistad dentro y fuera del centro, por cada consejo y palabras de aliento que me diste a lo largo de estos años, por tu confianza y sinceridad, por compartir aquellas tardes y noches basquetboleras y por abirme las puertas de tu casa, me siento honrado de tener tu amistad. Gracias por todo!!!

Índice

RESUMEN.....	7
ABSTRACT	9
1. Introducción	12
1.1 Importancia de la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)	12
1.2 Organismos fijadores de nitrógeno	13
1.3 Organismos fijadores de nitrógeno de vida libre	13
1.4 Asociaciones no simbióticas	14
1.5 Asociaciones simbióticas e interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa	15
1.6 Genomas de Rizobios	18
1.7 Mecanismo de transferencia de material genético.....	19
1.7.1 Transferencia horizontal de genes	19
1.7.2 Transformación	20
1.7.3 Transducción	21
1.7.4 Conjugación	23
1.8 MECANISMOS DE “QUORUM SENSING”	26
2. Antecedentes	29
2.1 <i>Rhizobium etli</i> CFN42	29
2.2 Transferencia conjugativa en rizosfera	31
2.3 Justificación	32
3. Hipótesis	33
4. Objetivo general.....	34
4.1 Objetivos específicos.....	34
5. Materiales y métodos.....	35
5.1 Condiciones de Cultivo.....	38
5.2 Conjugaciones bacterianas.....	38
5.3 Desinfección y germinación de semillas.....	39
5.3.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Negro Jamapa.....	39
5.3.2 <i>Zea mays</i> (Maíz morado).....	40
5.3.3 <i>Medicago sativa</i> (Alfalfa).....	40

5.4 Ensayo de plantas.....	40
5.5 Análisis de Microscopía	41
5.6 Análisis por citometría de flujo	42
5.7 Construcciones de plásmidos y cepas usados en este estudio	43
5.7.1 Construcción de las cepas CFN42-1, CFN42-2, CFN42-3, CFNX669-1, CFNX669-2 y CFNX669-3	43
5.7.2 Construcción de las cepas CFNX559-1 y CFNX559-2	43
5.7.3 Construcción de la cepa CFNX559-3.....	44
5.7.4 Construcción de las cepas CFNX559-4 y CFNX559-5	45
5.7.5 Construcción de la cepa CFN42/Ch::RFP/pRet42d::GFP-Sp/pRet42a ⁻	45
6. RESULTADOS.....	46
6.1 NÓDULOS DE PLANTAS LEGUMINOSAS SON NICHOS APROPIADOS PARA LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE PLÁSMIDOS DE RIZOBIOS Y NO SOLO PARA LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO BACTERIANA.	47
6.1.1 pRet42a realiza la transferencia conjugativa en la rizosfera y en nódulos de plantas de frijol.....	48
6.1.2 Expresión de las fusiones <i>ptral</i> ::GFP y <i>ptrA</i> ::GFP indican que la maquinaria de conjugación esta activa dentro de los nódulos.....	53
6.1.3 Inhibición de la conjugación en la superficie de la planta no impide la aparición de transconjugantes en el nódulo.....	55
6.1.4 Expresión de <i>tral</i> bajo el control del promotor de <i>nifH</i> permite la transferencia de pRet42a en nódulos	61
6.1.5 Expresión de <i>traM</i> bajo el promotor de <i>nifH</i> reduce la transferencia de pRet42a en nódulos	63
6.1.6 Discusión.....	65
6.1.7 Perspectivas.....	69
6.2 LA RIZOSFERA DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> ESTIMULA LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE PRET42A DE <i>RHIZOBIUM ETLI</i>	70
6.2.1 La rizosfera de <i>Phaseolus vulgaris</i> tiene un rol importante en la transferencia conjugativa de pRet42a. 71	
6.2.2 Efecto de los extractos de raíz y nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> sobre la frecuencia de conjugación.....	73
6.2.3 Efecto de los exudados totales de <i>Phaseolus vulgaris</i> sobre la frecuencia de conjugación.....	74
6.2.4 Compuestos flavonoides incrementan la frecuencia de conjugación	74
6.2.5 Conjugación dependiente de quórum sensing en presencia de planta.....	77

6.2.6 Análisis de la frecuencia de conjugación <i>in vitro</i> bajo diversas condiciones	78
6.2.7 Comparación de frecuencias de conjugación utilizando diferentes plantas	79
6.2.8 Conclusiones.....	82
6.2.9 Perspectivas.....	83
6.3 TRANSFERENCIA DEL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DENTRO DE LOS NÓDULOS DE RAÍCES DE FRIJOL	84
6.3.1 Condiciones o compuestos de nódulos de frijol encienden la maquinaria de transferencia del plásmido simbiótico	85
6.3.2 Transferencia del plásmido simbiótico a receptoras nativas dentro de los nódulos de raíces de frijol	88
6.3.3 Conclusiones.....	91
6.3.4 Perspectivas.....	92
7. Referencias.....	93
8. ANEXO, ARTÍCULOS.....	112

Índice de Figuras

Figura 1. Modelo interacción <i>Rhizobium</i> - Leguminosa.....	17
Figura 2. Transformación natural bacteriana.....	20
Figura 3. Transformación artificial bacteriana.....	21
Figura 4. Modelo de transducción generalizada.....	22
Figura 5. Modelo de transducción especializada.....	23
Figura 6. Modelo de conjugación bacteriana.....	26
Figura 7. Esquema para el ensayo de plantas en medio hidropónico.....	41
Figura 8. Estrategia para diferenciar entre donadoras y transconjugantes.....	48
Figura 9. Poblaciones de donadoras y transconjugantes en superficie de raíz, hilos de infección y nódulos.....	50
Figura 10. Porcentaje de ocupación de nódulos.....	51
Figura 11. Análisis de la frecuencia de conjugación de nódulos.....	51
Figura 12. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos.....	53
Figura 13. Los promotores de <i>tral</i> y <i>traA</i> se inducen en la superficie de la raíz, el hilo de infección y los nódulos.....	54
Figura 14. Los promotores de <i>tral</i> y <i>traA</i> no se inducen en un fondo <i>tral</i>	55
Figura 15. Análisis de la frecuencia de conjugación con TraM.....	57
Figura 16. Inhibición de la conjugación en la rizosfera con TraM.....	58
Figura 17. Análisis de la frecuencia de conjugación con TraM en el medio y sobre la superficie de la raíz.....	59
Figura 18. Inhibición de la conjugación en la superficie de la raíz no evita la aparición de transconjugantes en los nódulos.....	60
Figura 19. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos (2).....	61
Figura 20. Cuando <i>tral</i> está bajo el control del promotor <i>nifH</i> , las transconjugantes se observan solo dentro de los nódulos.....	62
Figura 21. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos (3).....	62
Figura 22. pRet42a frecuencia de transferencia en el medio, superficie de la raíz y nódulos, con donadoras que llevan <i>tral</i> bajo el control del promotor <i>nifH</i>	63
Figura 23. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos (4).....	64
Figura 24. Modelo hidropónico de planta.....	71

Figura 25. Transferencia de pRet42a en presencia de la planta.	72
Figura 26. Análisis de la frecuencia de conjugación en presencia de extractos de nódulo y raíz.	73
Figura 27. Análisis de la frecuencia de conjugación en presencia de exudados de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. sativa</i>	74
Figura 28. Análisis de la frecuencia de conjugación en presencia de flavonoides.	77
Figura 29. Análisis de la frecuencia de conjugación en planta dependiente de <i>quorum sensing</i>	78
Figura 30. Análisis de la frecuencia de conjugación en diferentes condiciones.	79
Figura 31. Análisis de la frecuencia de conjugación en medio con diferentes plantas (<i>P. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> , <i>M. sativa</i>).	80
Figura 32. Análisis de la frecuencia de conjugación sobre la superficie de la raíz con diferentes plantas (<i>P. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> , <i>M. sativa</i>).	81
Figura 33. Transferencia del plásmido simbiótico en nódulos.	86
Figura 34. Análisis de la frecuencia de conjugación del plásmido simbiótico en nódulos medio y raíz.	87
Figura 35. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas en distintas partes de la planta entre las cepas que pRet42d::GFP/ch::RFP vs CFN2001.	87
Figura 36. Transferencia del plásmido simbiótico a posibles endófitas dentro de los nódulos.	88
Figura 37. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas en distintas partes de la planta entre las cepas que pRet42d::GFP/ch::RFP vs posibles endófitas (PE).	89

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo.	35
Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este trabajo.	37
Tabla 3. Preparación medio Fahraeus	39
Tabla 4. Actividad de distintos flavonoides.	75
Tabla 5. Secuenciación e identificación de diversas cepas endófitas.....	90

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la fijación biológica de nitrógeno que se produce en los nódulos resultantes de la interacción entre los rizobios y leguminosas, se pensó que los nódulos eran entidades exclusivas para albergar bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. En este trabajo descubrimos una nueva función de los nódulos, como un nicho o lugar adecuado para la adquisición de plásmidos por transferencia conjugativa. Utilizamos a *Rhizobium etli* CFN42, el cual nodula a *Phaseolus vulgaris*. El genoma de *R. etli* CFN42 contiene un cromosoma y seis plásmidos. pRet42a es un plásmido conjugativo regulado por el sistema de *Quorum-Sensing* (QS), a través de los productos de los genes *trai*, *traR* y *cinR*. pRet42d es el plásmido simbiótico, ya que lleva los genes involucrados en la nodulación y fijación de nitrógeno. Usando microscopía confocal y citometría de flujo, mostramos que pRet42a se transfiere a otras bacterias en la superficie de la raíz, e inesperadamente, dentro de los nódulos. La conjugación tuvo lugar dentro de los nódulos, incluso cuando estaba restringida en la superficie de la planta, al colocar *trai* bajo el promotor del gen de la nitrogenasa, que solo se expresa dentro de los nódulos, o al inhibir la inducción transcripcional de los genes de transferencia, impidiendo su inducción por los reguladores QS con un antiactivador (*traM*) en un vector inestable, mantenido en la superficie de la planta y perdido dentro de los nódulos. Estos resultados confirman de manera concluyente la actividad de conjugación dentro de estas estructuras, definiéndolas como un ambiente protegido que facilita la diversificación bacteriana. Por otra parte, mostramos que la planta juega un papel importante en la transferencia conjugativa de pRet42a, lo que puede ser debido a que diversos compuestos de la planta como extractos, exudados o ciertos flavonoides,

incrementen la frecuencia de conjugación. Estos compuestos pueden ser utilizados como como nutrientes o bien la planta pueda actuar como un soporte donde las bacterias se pueden adherir y llevar a cabo la conjugación. Así mismo, demostramos que la conjugación de *R. etli* es dependiente del sistema de *quorum-sensing* aún en condiciones simbióticas. Finalmente, datos preliminares muestran la transferencia del plásmido simbiótico (pRet42d) dentro de los nódulos, mediada por los genes de transferencia que porta. La activación de los genes del pRet42d no se había logrado previamente más que por manipulación genética, sugiriendo que, alguna condición o compuesto de los nódulos pudieran estar activando este sistema. Además, pudimos aislar e identificar algunas bacterias endófitas de nódulos que posiblemente adquirieron el plásmido pRet42d.

ABSTRACT

Since the discovery that biological nitrogen fixation ensues in nodules resulting from the interaction of rhizobia with legumes, they were thought to be exclusive for hosting nitrogen-fixing and plant growth promoting bacteria. In this work we uncover a novel function of nodules, as a place where plasmids may perform conjugation. We used *Rhizobium etli* CFN42, which nodulate *Phaseolus vulgaris*. The genome of *R. etli* CFN42 contains a chromosome and six plasmids. pRet42a is a conjugative plasmid regulated by Quorum-Sensing (QS) and pRet42d is the symbiotic plasmid. Here, using confocal microscopy and flow cytometry, we show that pRet42a transfers on the root's surface, and unexpectedly, inside the nodules. Conjugation still took place inside nodules, even when it was restricted on the plant surface by placing the QS *traI* regulator under the promoter of the nitrogenase gene, which is only expressed inside the nodules, or by inhibiting the QS transcriptional induction of transfer genes with a *traM* antiactivator on an unstable vector maintained on the plant surface and lost inside the nodules. These results conclusively confirm the occurrence of conjugation in these structures, defining them as a protected environment for bacterial diversification. On the other hand, we showed that the plant plays an important role in the conjugative transfer of pRet42a, this may be because diverse plant compounds such as: extracts, exudates or certain flavonoids that increase the conjugation frequency can act as nutrients or that the plant can act as a support where bacteria can adhere and carry out the conjugation, we also showed that the conjugation of *R. etli* is dependent on the *quorum sensing* system and not on some plant compound. Finally, preliminary data showed the transfer of plasmid pRet42d within the nodules, depending on its own transfer genes. Until now, activation of these genes had only been achieved by genetic manipulation., This may be

because there is some condition or compound in the nodules able to activate this system. We could also isolate and identify some endophytic bacteria from the nodules that possibly had acquired plasmid pRet42d.

1. Introducción

1.1 Importancia de la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno (N_2) es un elemento vital para los seres vivos ya que forma parte de los aminoácidos y ácidos nucleicos. A pesar de ser muy abundante en la atmósfera (alrededor del 80%), este elemento se encuentra en su forma diatómica lo que impide que pueda ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes. Esto debido a que para poder romper el triple enlace se requiere un gasto energético fuerte, lo que prácticamente lo convierte en un elemento químicamente inerte e inactivo. En consecuencia, a pesar de su abundancia en la atmósfera, es una fuente muy escasa en su forma orgánica aprovechable para los seres vivos. En el ciclo del nitrógeno hay tres etapas principales: La amonificación, el cual es un proceso donde compuestos nitrogenados producto de la descomposición de materia orgánica como ácidos nucleicos, proteínas, etc., son degradados a compuestos simples por microorganismos que habitan en el suelo (principalmente bacterias y hongos), los cuales utilizan estos compuestos para formar las proteínas que necesitan y el exceso de nitrógeno lo liberan en forma de amoniaco (NH_3) o amonio (NH_4^+). El segundo proceso, la nitrificación, consiste en que algunas bacterias nativas del suelo (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*) oxidan el amoniaco o amonio, a nitritos en una primera etapa y posteriormente a nitratos. En esta oxidación se libera energía que las bacterias utilizan como fuente de energía primaria. Por último, tenemos la asimilación, que es el proceso consistente en que una vez que los nitratos están dentro de la planta, vuelven a ser reducidos a amonio, el cual se transfiere a compuestos que contienen carbono para producir compuestos que la planta requiera (Xu et al., 2012; Stein and Klotz, 2016). Además de estos procesos para

la asimilación del nitrógeno, existe un proceso industrial para producción de amonio, el proceso de Haber-Bosch descrito por primer vez en (1923), en el cual el nitrógeno atmosférico es reducido a NH_4 en presencia de H_2 , mediante condiciones de presión y temperatura extremadamente altas (500°C y 300 atm), sin embargo, este proceso requiere un gasto de energía bastante alto para su producción, y es muy caro (Kandemir et al., 2013).

1.2 Organismos fijadores de nitrógeno

Existen microorganismos (bacterias, cianobacterias, actinomicetos) que pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, los cuales pueden vivir en forma libre o asociaciones con plantas. Estos microorganismos pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, proceso que les permite transformar el N_2 atmosférico en orgánico, disponible para su utilización, por medio de la enzima nitrogenasa.

1.3 Organismos fijadores de nitrógeno de vida libre

Existe un gran grupo de bacterias de suelo que pueden fijar niveles significativos de nitrógeno sin asociarse con otros organismos. Hay una gran diversidad metabólica en las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazotróficas) entre las cuales se encuentran bacterias anaerobias, microaeróbicas, aerobias estrictas, de grupos taxonómico-diversos, como cianobacterias, actinomicetos, etc. Entre las bacterias anaerobias obligadas o facultativas tenemos a *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp, *Desulfovibrio*, etc., (Stewart, 1969). Las bacterias anaerobias facultativas carecen de sistemas para proteger a la nitrogenasa frente al oxígeno, por lo tanto, solo fijan el nitrógeno en ausencia de o presencia de baja concentración de oxígeno (Egland et al., 1997). Por otra parte, las bacterias aeróbicas entre las cuales tenemos a *Azospirillum*,

Azotobacter, *Beijerinckia*, etc., han desarrollado mecanismos para la protección de la nitrogenasa: en el primero de ellos producen una elevada tasa respiratoria y de esta forma mantienen una concentración intracelular de oxígeno baja, en el segundo la nitrogenasa cambia su disposición a una forma reversible inactiva (Robson and Postgate, 1980; Segura and Espin, 1998).

Las cianobacterias tienen una amplia distribución, como otras bacterias, incluyendo el agua y suelo. Durante el siglo XIX, las cianobacterias fueron conocidas como las primeras formas que fijaban el nitrógeno debido a su habilidad para crecer en condiciones deficientes de nitrógeno. Presentan una gran variedad morfológica, desde unicelulares hasta multicelulares filamentosas (*Nostoc* y *Anabaena* spp) con o sin la presencia de heterocistos (Fay, 1992). Los heterocistos son células especializadas para la fijación y asimilación de nitrógeno, se encuentran distribuidas a lo largo o al final del filamento, los heterocistos sufren cambios en la expresión génica que les permiten llevar a cabo la fijación de nitrógeno al mismo tiempo que en otras células se lleva a cabo la fotosíntesis (Golden et al., 1985; Fay, 1992).

1.4 Asociaciones no simbióticas

Los actinomicetos son bacterias filamentosas formadores de micelio Gram positivas, consideradas como organismos intermedios entre bacterias y hongos, (Mukesh Sharma et al., 2014). En este grupo se encuentra *Frankia*, capaz de fijar el nitrógeno atmosférico en vida libre en condiciones aeróbicas debido a que protege a la nitrogenasa manteniéndola en unas vesículas en el extremo de las células las cuales tienen paredes gruesas que retardan la difusión del oxígeno (Newcomb and Wood, 1987). Además, puede hacer asociaciones no simbióticas con alrededor de 200

especies de plantas (angiospermas) dando lugar a la formación de tumoraciones o nódulos en las raíces llamadas actinorrizas (Pawlowski and Bergman, 2007).

1.5 Asociaciones simbióticas e interacción *Rhizobium*-leguminosa

Los rizobios son bacterias Gram negativas perteneciente al grupo de las α -Proteobacterias, conocidas por su capacidad para establecer relaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno con las raíces de plantas leguminosas. Hellriegel and Wilfarth (1886) y Beijerinck (1888) publicaron experimentos cruciales que muestran que las bacterias localizadas dentro de los nódulos fijan el N_2 atmosférico y lo proporcionan a las plantas.

Para que la asociación entre *Rhizobium* y plantas leguminosas ocurra se requiere de un diálogo molecular entre ambos, el cual involucra la secreción de señales químicas por ambas partes. El proceso inicia cuando la planta secreta compuestos quimio-atrayentes como los flavonoides. Los flavonoides son metabolitos secundarios producidos por las plantas. Cada planta secreta o exuda un grupo particular de flavonoides, que pueden interactuar con los productos de los genes *nodD* de las bacterias, provocando la transcripción de los genes *nod* comunes (*nodABC*), imprescindibles para la nodulación. Los genes *nodABC* están conservados en todos los rizobios y algunos pueden intercambiarse entre especies y géneros. Cada uno de los genes de nodulación tiene una función específica en la síntesis de los factores de nodulación. NodC tiene una actividad de quitina sintasa, NodB es una deacetilasa que elimina el grupo acetilo del extremo no reductor y NodA transfiere el ácido graso a esta posición. La actividad de todos estos genes permite la formación del esqueleto común de los factores de nodulación (N-acetil D-glucosamina con uniones β 1-4), sin embargo, la ausencia de

alguno de estos genes resulta en la incapacidad de la formación de los factores de nodulación y por lo tanto de establecer el proceso de infección (Lohrke et al., 1995; Fujishige et al., 2008). La estructura química de los factores de nodulación puede tener sustituciones en el extremo no reductor de una cadena alifática de variada longitud e insaturación y distintas sustituciones en el extremo reductor como: adición de un grupo metilo, sulfato, acetilo, etc. Por otra parte, existen genes *nod* específicos (*nodFE*, *nodH*, *nodPQ*) responsables de la especificidad del hospedero, por lo que mutaciones en alguno de estos genes alteran o amplían el rango de hospedero (Fujishige et al., 2008). Una vez sintetizados los factores de nodulación, son secretados a la rizosfera en concentraciones nano molares, y son reconocidos de manera específica por la planta, que, en respuesta, sufre una serie de cambios, principalmente en los pelos radicales, formados por células cilíndricas y que tienen un crecimiento polarizado.

Entre los cambios que sufren los pelos radicales en respuesta a los factores de nodulación están los cambios iónicos de Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , la alcalinización del citoplasma, despolarización de la membrana, y aumentos transitorios en los niveles intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la región apical (Cárdenas et al., 1999; Cárdenas et al., 2000; Cárdenas and Quinto, 2008). También ocurre una reorganización de los microfilamentos de actina y microtubulos de los pelos radicales, que culmina con un hinchamiento inicial del pelo radical para después enroscarse y atrapar a las bacterias en su interior (Cárdenas et al., 1999). Al mismo tiempo, las células corticales de la planta entran en un proceso de división mitótica que da origen a la formación del primordio del nódulo. Una vez que las bacterias son atrapadas por los pelos radicales, inducen la formación del hilo de infección, que consiste en una invaginación de los pelos radicales que sirve como un túnel por donde las bacterias entran y avanzan hasta

el primordio en desarrollo, guiando a las bacterias que posteriormente son liberadas al citoplasma de las células del primordio por exocitosis y endocitosis, donde quedan protegidas por una membrana peribacteroidal de origen vegetal. Posteriormente estas bacterias entran en un proceso de división continua y sincronizada hasta que se forman unas células hinchadas y deformes llamadas bacteroides, y en este estado diferenciado son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (figura 1) (Gage, 2004; Quinto et al., 2014).

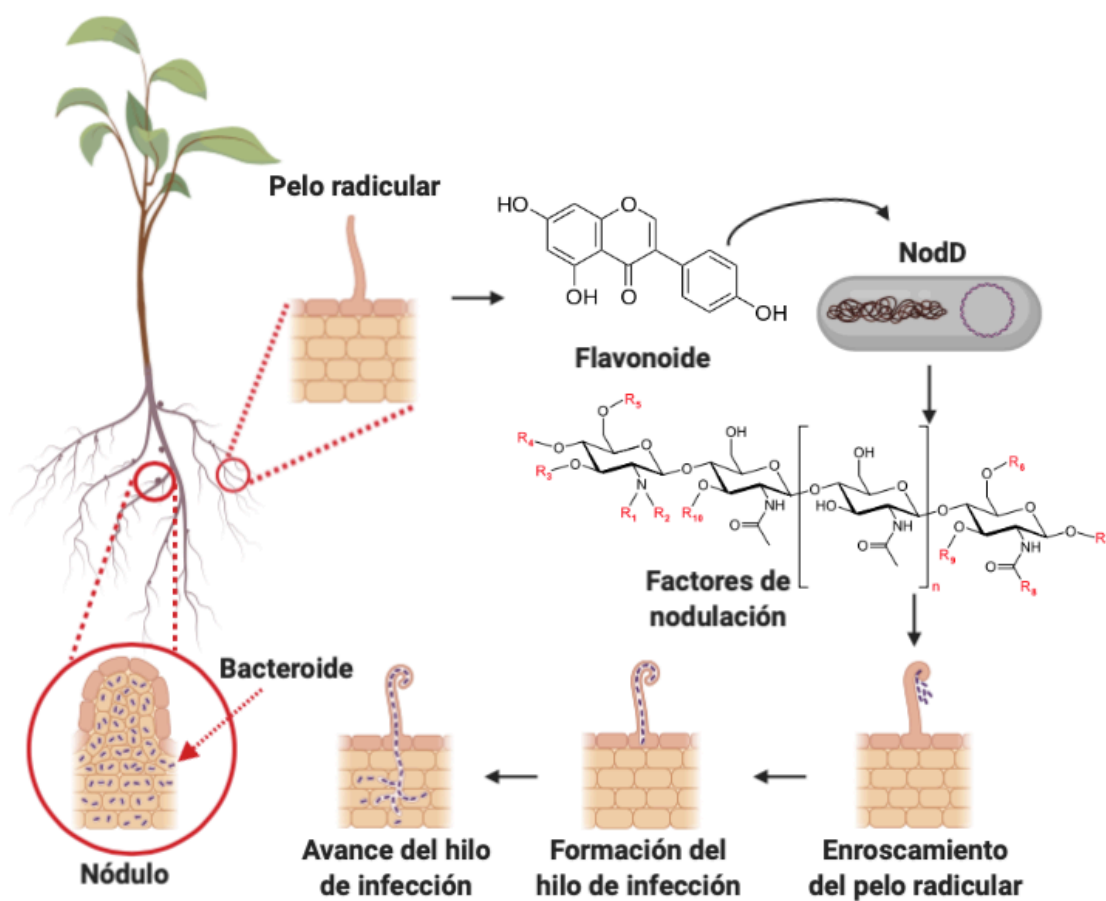


Figura 1. Modelo interacción *Rhizobium* - Leguminosa.

1.6 Genomas de Rizobios

Los genomas de rizobios están compuestos por un cromosoma y por uno o más plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN que se replican independientemente del cromosoma, generalmente tienen forma circular y pueden portar genes que les confieran alguna ventaja como puede ser resistencia a antibióticos, metales pesados, información simbiótica, etc. (revisado en Romero y Brom (2004)). Los rizobios suelen contener un número variable de plásmidos grandes (> 100Kb), con información genética diversa (Hynes and McGregor, 1990; Brom et al., 1992; Brom et al., 2000; Brom et al., 2014). Desde finales de los años 60, se realizaron experimentos que demostraron que la especificidad de la nodulación (Higashi, 1967) podía transferirse entre diferentes cepas, por conjugación. Además, el plásmido RP4 del grupo-P (Johnston and Beringer, 1975) y algunos plásmidos rizobiales, que contienen la región *mob* del RP4, podían transferirse por conjugación entre diferentes cepas rizobiales e incluso a otras especies (Johnston et al., 1978; Hirsch, 1979; Beynon, 1980; Hooykaas et al., 1981; Kondorosi et al., 1982). Estos experimentos contribuyeron a determinar que en muchas rizobias los genes de nodulación y de fijación de nitrógeno están localizados en los plásmidos, y que algunos de ellos son conjugativos y que también se pueden encontrar en islas simbióticas, en regiones de ADN de 10,000 a 20,000 Kb. La característica principal de las islas es que en sus extremos se encuentran secuencias repetidas directas de 16 a 20 pares de bases, y suelen contener una integrasa y genes de transferencia, lo que les permite integrarse y escindir del cromosoma y transferirse por conjugación. La isla puede también llevar transposasas, genes de resistencia a antibióticos, a metales pesados, de simbiosis o patogenicidad, etc. (Ramsay et al., 2017). Estudios posteriores han

descrito los diferentes sistemas de transferencia de plásmidos rizobiales y su regulación, encontrando que muchos plásmidos, tanto simbióticos como no simbióticos, son conjugativos o movilizables. Se ha demostrado que la transferencia está regulada a través de diversos mecanismos, como *Quorum-Sensing* (QS) (Fuqua et al., 1994; Miller and Bassler, 2001; Tun-Garrido et al., 2003; McAnulla et al., 2007), similar a la regulación descrita para el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Piper et al., 1993; Fuqua and Winans, 1994), por reguladores tales como RctA (Pérez-Mendoza et al., 2005; Sepúlveda et al., 2008), y la presencia de otros genes, cuyas funciones aún no se han analizado (Ding et al., 2013; Pistorio et al., 2013; López-Fuentes et al., 2015).

1.7 Mecanismo de transferencia de material genético

1.7.1 Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes (HGT) es la incorporación de material genético en un organismo proveniente de otro que no es su ascendiente directo. Se le ha reconocido como una fuerza importante que contribuye a la evolución, diversificación y adaptación de bacterias a nuevos ambientes (Doolittle, 1999; Dagan and Martin, 2009; Heuer and Smalla, 2012). Inclusive, se han descrito eventos de intercambio de material genético entre bacterias no relacionadas filogenéticamente o con organismos eucarióticos. La HGT requiere de una maquinaria compleja de proteínas que hacen posible el paso de una molécula de DNA a través de la barrera que supone la envoltura celular bacteriana. La HGT puede realizarse por tres mecanismos conocidos: transformación, transducción y conjugación (Frost et al., 2005).

1.7.2 Transformación

La transformación consiste en la incorporación de DNA desnudo, desde el exterior de la célula. Se reportó por primera vez en 1928 en estudios realizados por Griffith (Griffith, 1928) en *Streptococcus pneumoniae*, y posteriormente en (1944) Avery y colaboradores demostraron que el principio transformante era el ADN. Existen dos formas de transformación: natural y artificial. En la primera se requiere que las células bacterianas entren en un estado de competencia, que involucran entre 20-50 proteínas. El estado de competencia puede ser debido a respuestas específicas del ambiente, crecimiento bacteriano, acceso a nutrientes, QS, etc. Posteriormente el ADN desnudo ingresa al citoplasma y se integra al genoma de la bacteria por recombinación homóloga (figura 2) (Thomas and Nielsen, 2005).

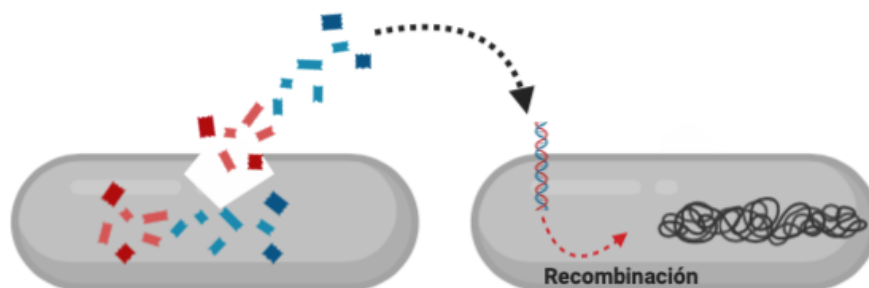


Figura 2. Transformación natural bacteriana.

En cambio, la transformación artificial consiste en procedimientos llevados a cabo en el laboratorio. Las bacterias son tratadas con CaCl_2 para hacerlas permeables, posteriormente son tratadas con un choque térmico para que abra la membrana y el ADN pueda ingresar (figura 3) (Rahimzadeh et al., 2016).

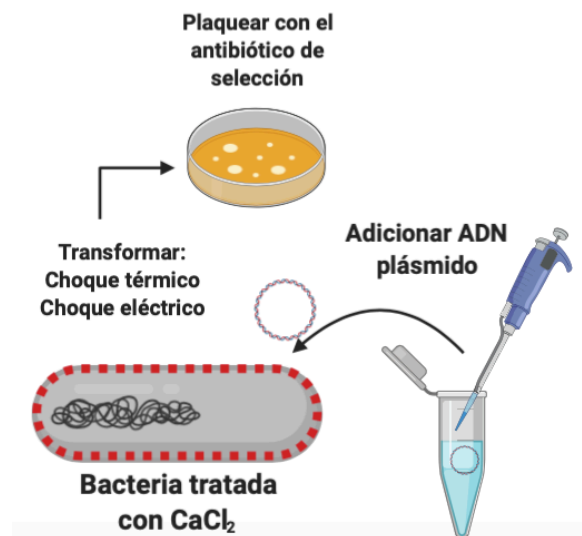


Figura 3. Transformación artificial bacteriana.

1.7.3 Transducción

La transducción es un proceso en el que el ADN es transferido desde una bacteria a otra mediante un virus (bacteriófago). Los científicos Zinder y Lederberg en (1952) fueron los primeros en asignar el nombre de transducción al fenómeno descrito por estudios realizados en *Salmonella*. Existen dos tipos de transducción: generalizada y especializada. La transducción generalizada se lleva a cabo cuando un fago penetra en una célula, se induce su maquinaria de replicación y de síntesis de proteínas, el cromosoma de la bacteria se fragmenta en pequeñas partes, y algunos de los fagos producidos incorporan ADN de la bacteria. Posteriormente cuando el fago penetra otra célula, los genes bacterianos presentes en el genoma del fago pueden ser incorporados en la célula por recombinación (figura 4) (Thierauf et al., 2009).

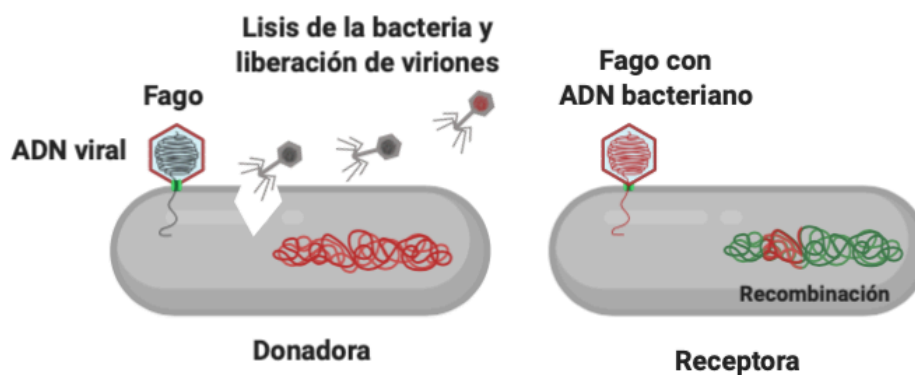


Figura 4. Modelo de transducción generalizada.

En la transducción especializada, el material genético del virus que infecta a la célula receptora se integra en un sitio específico al cromosoma bacteriano, por recombinación sitio específica. A esto se le conoce como profago y a la célula que tiene material genético del virus se le conoce como célula lisogénizada, el caso más estudiado de este proceso es el del fago λ el cual se inserta de manera específica en el cromosoma bacteriano entre el gen de la galactosidasa (*gal*) y el gen de la biotina (*bio*). En este estado la célula se puede replicar de manera normal, replicando el genoma del virus junto con el cromosoma, pero cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés, emite una respuesta SOS que puede causar la escisión del genoma del virus. En ocasiones, el fragmento escindido puede llevar consigo parte del genoma bacteriano formando virus defectivos que pueden infectar una nueva célula, pero el ADN del virus no se podrá integrar en el cromosoma y pueden ocurrir tres procesos. El primero de ellos es que el segmento incorporado al virus dentro de la célula se pueda recombinar con el cromosoma bacteriano de la célula receptora. En el segundo proceso puede ocurrir una degradación del ADN del virus por las nucleasas de la bacteria receptora y, por último, puede ocurrir una integración y esto se puede deber a que en la célula

receptora se encuentre un profago y este pueda ayudar al virus infectivo a integrarse en el cromosoma bacteriano generando una célula que ahora posee dos copias de un mismo gen. La integración también puede darse por recombinación homóloga entre la secuencia cromosomal de la receptora, con la que porta el fago (figura 5) (Thierauf et al., 2009; Snyder L et al., 2013).

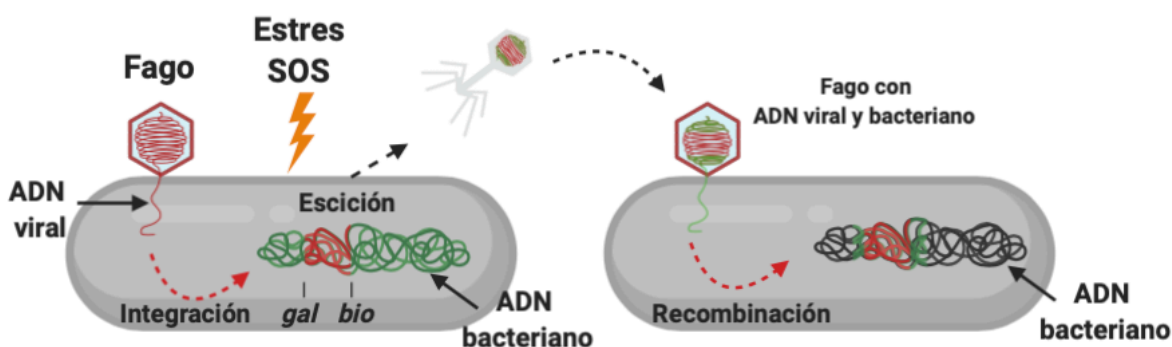


Figura 5. Modelo de transducción especializada.

1.7.4 Conjugación

La conjugación bacteriana fue descubierta en (1946) por Joshua Lederberg y Edward Tatum en *Escherichia coli*. La conjugación bacteriana, consiste en la transferencia de material genético principalmente de plásmidos, mediante el contacto directo célula-célula. Los plásmidos son segmentos de ADN en forma circular que se replican de manera independiente del cromosoma. Los plásmidos pueden llevar genes que le confieran una propiedad a las bacterias como genes de resistencia a antibióticos, metales pesados, genes de conjugación, de simbiosis, etc. Los plásmidos se han clasificado en distintos tipos, según su capacidad conjugativa: plásmidos conjugativos o autotransferibles: contienen un *oriT*, genes *Dtr* por sus siglas en inglés (DNA-transfer-and-replication) y *Mpf* (Mating-pair-formation). Plásmidos movilizables *in trans*:

contienen un *oriT*, pero el sistema Dtr y/o Mpf para transferirse es proveído por otro replicón. Plásmidos movilizables por donación: no contienen *oriT*, Dtr o Mpf, pero son capaces de formar un cointegrado con un plásmido conjugativo (Smillie et al., 2010). El modelo mas conocido es el del plásmido o factor F (fertilidad) de *Escherichia coli*, este plásmido contiene un origen de transferencia (*oriT*), genes *tra* y *trb* que codifican para la formación del poro conjugativo y que participan en el procesamiento, transferencia y replicación del ADN (figura 6). En el modelo de *E. coli* a las bacterias que contiene el plásmido F autónomo, es decir, que está independiente del cromosoma bacteriano y se puede replicar, se le llama F⁺, también puede estar integrado en el cromosoma bacteriano en forma de episoma y se les llama Hfr. Los plásmidos denominados F['] surgen de la escisión incorrecta del plásmido F de una cepa Hfr donde en el plásmido queda integrado un segmento del cromosoma. El proceso de transferencia del plásmido F⁺ (donadora) a una F⁻ (receptora) inicia con el contacto un posible donador y una célula receptora, esto dispara la transcripción de los genes Dtr y Mpf. El principal componente del sistema Dtr es una relaxasa, la cual corta el ADN en el sitio *oriT*, y se queda unida al extremo 5' de una de las cadenas. A través de una proteína acopladora, la relaxasa con el ADN unido se acopla al sistema Mpf, encargado de formar el poro conjugativo, posteriormente, la relaxasa pasa a la célula receptora acarreando la cadena sencilla de ADN. Finalmente, tanto en la célula donadora como en la receptora la cadena de ADN se duplica y recirculariza. En el caso de transferencia de las Hfr a una receptora, como el plásmido F esta integrado en el cromosoma bacteriano, se puede transferir el cromosoma completo, en ocasiones la transferencia se interrumpe antes de que termine de pasar todo el cromosoma, por lo que solo se transferirá una parte del genoma, sin embargo la parte del cromosoma bacteriano que se transfirió puede hacer

recombinación homóloga con el cromosoma de la receptora, por esto el nombre de (High frequency recombination) de alta frecuencia de recombinación por sus siglas en inglés. En el caso de transferencia de las F' el plásmido F contiene un segmento del cromosoma bacteriano y el proceso de transferencia es igual al de las F⁺, sin embargo, una vez transferido el F' a la receptora el segmento del cromosoma integrado en el plásmido puede realizar recombinación homóloga con el cromosoma de la receptora (Griffiths et al., 2000), o quedar como plásmido, generando merodiploides al tener dos copias de algún gene. Por otra parte, existen los sistemas de exclusión los cuales impiden que una F⁺ pueda actuar como receptoras frente a otras F⁺. Hay dos sistemas, el primero de ellos es la exclusión de superficie, el cual se sitúa en la membrana externa (*traT*) impidiendo la formación de contactos con otras F⁺ y el otro sistema es el sistema de exclusión de entrada localizado en la membrana citoplasmática (*traS*) el cual impide o evita la entrada de ADN de otra célula F⁺ (Achtman et al., 1977). En general, la transferencia conjugativa se ha considerado como el mecanismo mas frecuente de la HGT en bacterias.

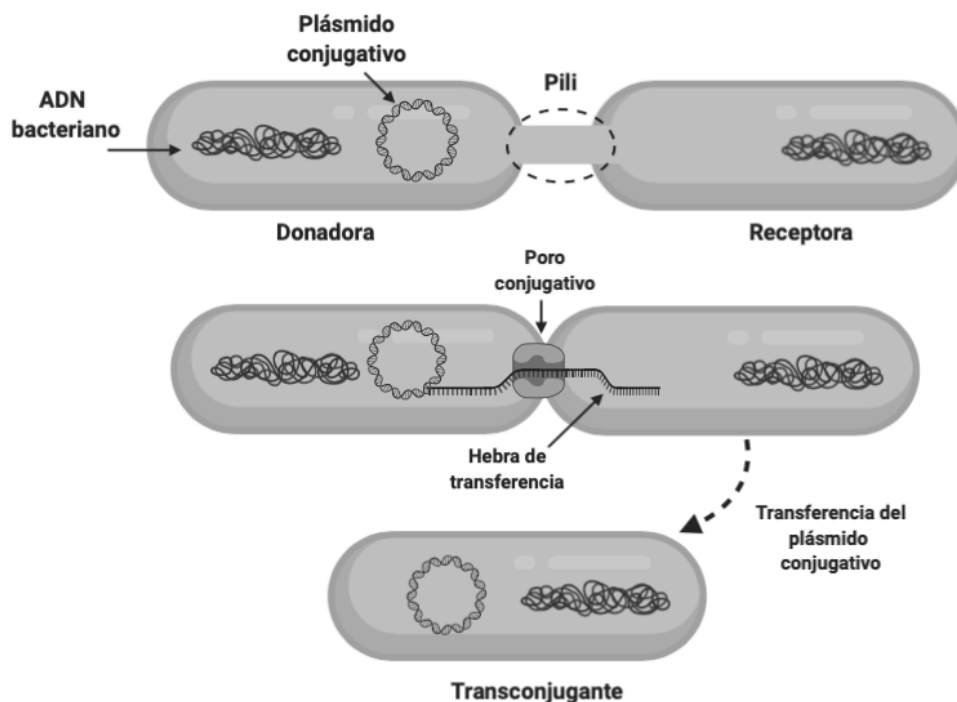


Figura 6. Modelo de conjugación bacteriana.

1.8 MECANISMOS DE “QUORUM SENSING”

El “*quorum sensing*” es un mecanismo por el cual las bacterias se comunican entre sí. Las bacterias secretan sustancias llamadas autoinductores, los cuales se acumulan extracelularmente hasta llegar a una concentración crítica, que las lleva a ingresar otra vez al citoplasma de la célula, generalmente por difusión libre, y posteriormente interactúan específicamente con algún regulador, permitiendo la expresión o represión de genes involucrados en diversas actividades fisiológicas. Existen moléculas de señalización de *quorum sensing*: en bacterias Gram negativas predominan las acilhomoserín lactonas (AHLs) y en las bacterias Gram positivas está mediado por pequeños péptidos (Waters and Bassler, 2005). El *quorum sensing* fue descubierto y descrito por primera vez en una bacteria marina bioluminiscente llamada *Vibrio fischeri*, la cual coloniza un órgano de un calamar hawaiano llamado *Euprymna scolopes*, donde las bacteria crecen a una alta densidad e inducen la expresión de los genes requeridos

para la bioluminiscencia (Nealson and Hastings, 1979). Dos proteínas (LuxI y LuxR) controlan la expresión del operón de la luciferasa *luxCDABE* requerido para la producción de la luz. LuxI pertenece a una familia de proteínas que participa en la síntesis de la molécula señal (AHLs) mientras que LuxR es un polipéptido que actúa como receptor citoplasmático de AHLs y activador transcripcional del ADN. Actualmente, el mecanismo de *quorum sensing* ha sido bien caracterizado en otros organismos y es similar al sistema descrito. La actividad de genes blanco es diversa, como por ejemplo la transferencia del plásmido Ti en *A. tumefaciens*, síntesis de factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, motilidad y nado en *Serratia liquefaciens*, producción de exopolisacáridos en *Pantoea stewartii*, transferencia de plásmidos conjugativos en *R. etli* CFN42, etc. (Miller and Bassler, 2001; Gonzalez and Marketon, 2003; Tun-Garrido et al., 2003; Waters and Bassler, 2005; Papenfort and Bassler, 2016). *Vibrio harveyi*, a pesar de ser Gram negativa, utiliza un sistema de dos componentes para la percepción del *quorum sensing*, similar al empleado por bacterias Gram positivas. Este sistema de *Vibrio harveyi* está formado por tres autoinductores y tres receptores cognados. En el primero de ellos la producción de AI-1 (3OHC4-homoserina lactona) depende de la sintasa LuxM y AI-1 se une a LuxN, por otra parte, para la producción de AI-2 (diester de furanosil borato) se requiere de la sintasa LuxS. AI-2 se une al periplasma por la proteína LuxP y este complejo LuxP-AI-2 se une a otro sensor de membrana LuxQ y finalmente CAI-1 es producido por la enzima CqsA y esta señal interactúa con un sensor de membrana llamado CqsS. Todos estos autoinductores activan una cascada de transducción de señales a otras proteínas citoplasmáticas (LuxU, LuxO, LuxR) desencadenando la activación del operón de bioluminiscencia *luxCDABE* (Miller and Bassler, 2001; Waters and Bassler, 2005).

Por otra parte, algunas bacterias Gram positivas secretan péptidos para su comunicación. Hay dos vías por la cual lo pueden hacer, la primera de ellas es que los péptidos se sintetizan en el ribosoma como pro-péptidos y posteriormente se modifican postraduccionalmente, estos péptidos se secretan a través de transportadores ABC localizados en la membrana. Una vez que los péptidos alcanzan cierto umbral son reconocidos por un receptor quinasa específico en la superficie celular, que a su vez se activa mediante la fosforilación de un residuo conservado de histidina. La activación de la histidina-quinasa inicia una cascada de fosforilación intracelular que regula la transcripción de los genes blanco, así como los de la vía de secreción de péptidos. Dado que este sistema involucra dos elementos claves la quinasa y la histidina se le conoce comúnmente como un sistema de dos componentes. Entre algunos ejemplos de este mecanismo están, virulencia en *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, competencia en *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus subtilis*, adherencia en *Enterococcus faecalis*, etc., (Bramhachari, 2018). La segunda vía por la cual las bacterias Gram positivas se comunican se inicia cuando los péptidos sintetizados por el ribosoma y modificados postraduccionalmente se secretan por sistemas dependientes de SecA, y a diferencia del sistema de dos componentes, cuando los péptidos alcanzan el umbral de concentración, ingresan a la célula a través de un sistema transportador de oligopéptidos (reguladores de fosfato) y una vez dentro de la célula, los péptido activan al regulador asociado, quien finalmente activa la expresión de los genes blanco. Un ejemplo de esta vía es la transferencia conjugativa de un plásmido de *Enterococcus faecalis* (pCF10) resistente a tetraciclina, el cual involucra un péptido de señalización codificado en el cromosoma bacteriano (cCF10), el cual es el responsable de la transferencia del plásmido (Dunny et al., 1978).

2. Antecedentes

2.1 *Rhizobium etli* CFN42

Nuestro modelo de estudio, *Rhizobium etli* CFN42 induce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de *Phaseolus vulgaris*. En esta cepa, el material genético se encuentra distribuido en un cromosoma y seis plásmidos (p42a – p42f) que varían en un rango de tamaño de 180 a 642 Kb (Gonzalez et al., 2006). Uno de estos plásmidos (pRet42d) ha sido identificado como el plásmido simbiótico (pSim), debido a que lleva la mayoría de los genes requeridos para la nodulación y fijación de nitrógeno (Brom et al., 1992). pRet42a ha sido identificado como un plásmido conjugativo. Contiene todos los elementos necesarios (un *oriT*, los genes *Dtr* y *Mpf*) para su transferencia. Este plásmido es capaz de transferirse a una frecuencia bastante alta (10^{-2}). La expresión de los genes que permiten la conjugación está regulada por un sistema tipo "quórum-sensing" que incluye un gen *tral*, que codifica para una acilhomoserín lactona sintasa, y dos reguladores transcripcionales (*TraR* y *CinR*), los cuales inducen la transcripción de los genes de transferencia, en respuesta al producto de *Tral* (Tun-Garrido et al., 2003). Además del pRet42a, se encontró que el pSim también es capaz de transferirse, aunque a una frecuencia más baja (10^{-6}). El pSim es movilizable, ya que para que se pueda transferir requiere formar un cointegrado con el pRet42a a través de recombinación sitio específica o recombinación homóloga (Brom et al., 2004; Pérez-Mendoza et al., 2005). El cointegrado se transfiere utilizando la maquinaria del pRet42a y una vez que está en la receptora, el cointegrado se resuelve regenerando los dos plásmidos nativos. En algunas ocasiones el cointegrado se puede resolver por recombinación en un sitio diferente al utilizado para la cointegración,

generando plásmidos recombinantes. Un segundo mecanismo por el cual el plásmido simbiótico se puede transferir depende de genes de transferencia (*tra*, *vir*) localizados en el plásmido simbiótico. Estos genes están regulados por el sistema RctA/RctB. En la cepa silvestre, en condiciones normales el regulador RctA reprime la expresión de los genes *tra* y *vir*, mientras que el regulador RctR indirectamente reprime a RctB, que es un activador de los genes de transferencia, lo que impide que se encienda la maquinaria de conjugación. Si se inactiva el gen *rctA* o se sobre-expresa RctB por manipulación genética, se induce la maquinaria de conjugación. Hasta este momento, no se conoce ninguna señal ambiental que induzca este sistema (Pérez-Mendoza et al., 2005). Otra característica interesante de pRet42a es que contiene un conjunto de genes *vir*, homólogos a los del pTi de *Agrobacterium*. En *Agrobacterium* estos genes permiten la transferencia e integración del ADN-T a las células vegetales y la inducción de tumores (Piper et al., 1993; Fuqua and Winans, 1994; Lacroix and Citovsky, 2016). Se ha demostrado que los genes *vir* localizados en pRet42a son funcionales. La transferencia conjugativa de otros plásmidos rizobiales también está regulada por QS o reguladores similares a TraR, por ejemplo: pSfr64a de *Sinorhizobium fredii* GR64 (Cervantes et al., 2011); pLPU83a de *Rhizobium favelukesii* LPU83, en este sistema la activación de TraR parece ser independiente de AHLs (Torres Tejerizo et al., 2014); pRL1JI de *R. leguminosarum* quien tiene dos genes regulatorios tipo LuxR: *bisR* y *traR*. BisR induce la expresión de *traR* en respuesta a 3-OH-C_{14:1}-AHLs, la cual es producida por CinI de cepas receptoras potenciales (Danino et al., 2003; McAnulla et al., 2007) y pAoF64/95 de *Agrobacterium spp.* La transferencia de este plásmido esta regulada por una opina (Manopina) que induce la expresión de *traR* (regulador tipo LuxR) (Wetzel et

al., 2018), revisado en (Ding and Hynes, 2009; Brom et al., 2014; Bañuelos-Vazquez et al., 2017).

2.2 Transferencia conjugativa en rizosfera

Se ha demostrado que la transferencia conjugativa ocurre en una gran cantidad de receptoras diferentes (Musovic et al., 2014; Klumper et al., 2015), incluyendo bacterias Gram positivas (Musovic et al., 2006). También se ha detectado un efecto positivo sobre la transferencia en co-cultivos de diversas cepas (Hall et al., 2016). Se ha observado transferencia de información simbiótica en la rizosfera, de una cepa de *Mesorhizobium loti* inoculada en el campo hacia cepas nativas, que adquirieron la isla simbiótica y la capacidad de nodulación (Sullivan et al., 1995; Sullivan and Ronson, 1998). Esta transferencia se incrementa en presencia de inductores de nodulación de la planta (Sullivan and Ronson, 1998) a través de un sistema de QS (Ramsay et al., 2009). Estudios sobre la transferencia de una isla simbiótica de *Azorhizobium caulinodans* mostraron un incremento en la transferencia en respuesta a inductores de nodulación de plantas (Ling et al., 2016). Por otra parte, en *Cupriavidus metallidurans* CH34 se identificaron 3 islas genómicas en los plásmidos pMOL28 y pMOL30 que contienen genes de resistencia a metales pesados (Monchy et al., 2007). Adicionalmente, hay evidencia indirecta de transferencia de plásmidos de rizobios por el aislamiento de cepas de diferentes orígenes geográficos con plásmidos o secciones de similares entre ellos, lo que sugiere que estas cepas surgieron a través de transferencia horizontal de plásmidos y su recombinación con la información genética del hospedero (Martínez-Romero and Caballero-Mellado, 1996; Herrera-Cervera et al., 1999; Brom et al., 2002; Cervantes et al., 2011). Además, los biofilms o biopelículas,

que son ecosistemas formados por una o mas especies microbianas asociadas a diferentes tipos de superficie, pueden ser lugares adecuados para inducción de sistemas QS debido la alta densidad de bacterias, la cual provee un ambiente físico estable para el contacto célula – célula. En un estudio realizado por (Christensen et al.) se demostró la transferencia del plásmido pWDL7 de *Pseudomonas putida* UWC3 en una comunidad bacteriana (biofilm) formada por *Pseudomonas putida* RI JB156, *Acinetobacter* sp. Por otra parte, también se ha observado que la formación de biopelículas y la transferencia de plásmidos con resistencia a antibióticos se ve aumentada en *Pseudomonas putida*, cuando es expuesta a concentraciones subletales de diferentes antibióticos (Ma and Bryers, 2013).

2.3 Justificación

La mayor parte de información con que se cuenta actualmente respecto a la transferencia de plásmidos de *R. etli* se ha obtenido en condiciones de laboratorio. Por otra parte, el ciclo de vida de *Rhizobium* involucra su proliferación tanto en suelo, como en simbiosis con raíces de leguminosas. Por esta razón creemos que es importante estudiar los diversos factores que impulsan la HGT, imitando este tipo de condiciones. Hay que tomar en cuenta que los suelos son hábitats extremadamente diversos y complejos debido a su arquitectura ya que es como una red, formada por minerales, materia orgánica, hifas de hongos, raíces, restos vegetales, permitiendo la coexistencia de numerosos nichos de bacterias que varían dependiendo de diversos factores como presencia o ausencia de agua, pH, temperatura, nutrientes, concentraciones de contaminantes, etc.

3. Hipótesis

La transferencia conjugativa de plásmidos rizobiales está relacionada al hábitat en que se desarrollan estas bacterias (simbiosis) definiendo las condiciones en que se distribuye el material genético entre rizobios.

4. Objetivo general

Analizar la capacidad de transferencia conjugativa de un plásmido autotransferible de una cepa noduladora de frijol en condiciones simbióticas.

4.1 Objetivos específicos

- Construir y caracterizar derivados de plásmidos con los genes reporteros adecuados que permitirán evaluar eventos de transferencia conjugativa en diversas condiciones.
- Analizar la transferencia de plásmidos en la rizosfera, en distintas etapas de la simbiosis.

5. Materiales y métodos

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepas y plásmidos	Características	Resistencia	Referencias
<i>R. etli</i>			
CFN42	Cepa silvestre	Nal	(Quinto et al., 1982)
CFN42-1	Derivada de CFN42, con pBBR:: <i>ptral</i> ::GFP	Nal, Gm	Este trabajo
CFN42-2	Derivada de CFN42, con pBBR:: <i>ptrA</i> ::GFP	Nal, Gm	Este trabajo
CFN42-3	Derivada de CFN42, con pBBR:: <i>pnifH</i> ::GFP	Nal, Gm	Este trabajo
CFNX559	Derivada de CFN42 con RFP en el cromosoma y GFP en pRet42a	Gm, Sp	(Torres Tejerizo et al., 2015)
CFNX559-1	Derivada de CFNX559, con pU	Nal, Tc	Este trabajo
CFNX559-2	Derivada de CFNX559, con pS	Nal, Tc	Este trabajo
CFNX559-3	Derivada de CFNX559, con pRet42a-HI	Gm, Sp, Km	Este trabajo
CFNX559-4	Derivada de CFNX559, con pHM	Gm, Sp, Km	Este trabajo
CFNX559-5	Derivada de CFNX559-3, con pHM	Gm, Sp, Km	Este trabajo
CFN2001	CFN42 curada de pRet42a y pRet42d	Rif	(Leemans et al., 1984)
CFN2001-1	Derivada de CFN42, con pU	Rif, Tc	Este trabajo
CFN2001-2	Derivada de CFN42, con pS	Rif, Tc	Este trabajo
CFNX187	CFNX182 complementada con pRet42a::Tn5mob	Nal, Neo	(Brom et al., 1992)
CFNX669	Derivada de CFN42, con <i>tral</i> ::pSUP Ω	Nal, Sp	(Tun-Garrido et al., 2003)
CFNX669-1	Derivada de CFN42, con pBBR:: <i>ptral</i> ::GFP	Nal, Sp, Gm	Este trabajo
CFNX669-2	Derivada de CFN42, con pBBR:: <i>ptrA</i> ::GFP	Nal, Sp, Gm	Este trabajo
CFNX669-3	Derivada de CFN42, con pBBR:: <i>pnifH</i> ::GFP	Nal, Sp, Gm	Este trabajo
<i>E. coli</i>			

Materiales y métodos

DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>relA1</i>	Nal	(Sambrook et al., 1989)
S17-1	<i>E. coli</i> 294::[RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)] <i>thi pro hsdR</i> <i>hsdM ΔrecA</i>		(Simon et al., 1983)
Plásmidos			
pK18mob	Vector con alto numero de copias	Km	(Schäfer et al., 1994)
pK18mob-sacB	Vector de clonación, movilizable	Km	(Schäfer et al., 1994)
pBBRIMCS5	Vector de clonación	Gm	(Kovach et al., 1995)
pTR102	Vector de clonación	Tc	(Weinstein et al., 1992)
pTR102 -U	Derivada de pTR102 curada del locus de estabilidad	Tc	Este trabajo
pS	pTR102 con <i>traM</i>	Tc	Este trabajo
pU	pTR102-U con <i>traM</i>	Tc	Este trabajo
pFAJ1700	Vector de clonación	Ap, Km	(Dombrecht et al., 2001)
pHM	pFAJ1700 con <i>pnifH::traM</i>	Km	Este trabajo
pRet42a-HI	pRet42a con <i>tral</i> bajo el promotor de <i>nifH</i>	Km, Sp	Este trabajo

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

PCR Primers (5' -> 3').	
Up-ovTral-pHc ¹	5'- <u>AGGCGATATGCAAGTTGTCGCGTTCT</u> - 3'
Lw-Tral-R1 ¹	5'-TGGAATTCGGTCATCATGGCAGACCGCACA- 3'
Up-pHc-Bh-Xho ²	5'-TTGGATCCTCGAGTACGACTTGCCACACTA- 3'
Lw-ovpHc-Tral ²	5'- <u>CAACTTGCATATCGCCTTCCTTCTTTCGTT</u> - 3'
Up-repAa-H3 ³	5'-TCGAAGCTTCCATGAGCTCCAGGTTGCC- 3'
Lw-repAa-Bh ³	5'-AACGGATCCGAATTTCTCCGTCGTTTGTG- 3'
Up-pHc-Bh-Xho ⁴	5'-TTGGATCCTCGAGTACGACTTGCCACACTA- 3'
Lw1-ov-pHc-TraM ⁴	5'-AAATTGCATATCGCCTTCCTTCTTTCGTTT- 3'
Up1-ov-traM-	5'- <u>AGGAAGGCGATATGCAATTTGAGGAGACGGGGA</u> - 3'
Lw-TraM-R1 ⁵	5'-CTGACGAATTCCTTACTCGTTATTCTCAAGCAGC- 3'
Up-pHc-Bh-Xh ⁶	5'-TTGGATCCTCGAGTACGACTTGCCACACTA- 3'
Lw-TraM-R1 ⁶	5'-CTGACGAATTCCTTACTCGTTATTCTCAAGCAGC- 3'
Up TraM- H3 ⁷	5'-GGCAAGCTTACAGGAAACAGCTATGAACGATATGGGC TCATCCGAGG- 3'
Lw-TraM-Bh ⁷	5'-GGCGGATCCCTAGTTGTCATCGTCGAAAGGC- 3'
Up-ptraA-Xho ⁸	5'-TTTTTCTCGAGGCTTGTCTTTTGAACCCATTTTTTCG- 3'
Lw-ptraA-XbaI ⁸	5'-TTTTTCTAGACGGGGATTACGAACTCTTCGTG- 3'
Up-ptral-Xho ⁹	5'-TTTTTCTCGAGCGCTCACGTTAGAATCTCTCATC- 3'
Lw-ptral-XbaI ⁹	5'-TTTTTCTAGAACTTGCATGAATTTCTCCGTCGTT- 3'
Up-nifHc-Bh ¹⁰	5'-TTTTGGATCCGCGATTTCCAACCGACAAG- 3'
Lw-nifHc-R1 ¹⁰	5'-TTTTGAATTCGCGATTTGACGCAAATCTGAC- 3'
Up-GFP-R1 ¹¹	5'-TTTTGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAAGCATGCG- 3'
Lw-GFP-H3 ¹¹	5'-CCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTATTTG- 3'

*Los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos están en *itálicas*. Oligonucleótidos subrayados indican la región en que los oligos se superponen.

¹Fragmento de 1039 pb que lleva la región completa de *tral* CDS y 483 pb del final del 5' del gen *trbB*. ²Fragmento de 332 pb que contiene la región promotora de *nifHc*. ³Fragmento de 1043 pb que contiene 673 pb de la región final del 5' del gen *repAa* y la región intergénica de los genes *repAa-trala*. ⁴Fragmento de 331 pb que contiene la región promotora de *nifHc*. ⁵Fragmento de 364 pb que contiene el gen *traM*. ⁶Fragmento de 675 pb que contiene el promotor de *nifHc* y el gen *traM*.

⁷Fragmento de 324 pb que contiene el gen *traM*. ⁸Fragmento de 421 pb que contiene la región promotora de *traA*. ⁹Fragmento de 410 pb que contiene la región promotora de *tral*. ¹⁰Fragmento de 277 pb que contiene la región promotora de *nifHc*. ¹¹Fragmento de 768 pb que contiene GFP.

5.1 Condiciones de Cultivo.

El crecimiento de las cepas usadas en este estudio se hizo de la siguiente manera. Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C. Las cepas de *Rhizobium etli* se crecieron en medio Peptone-Yeast (PY) a 30 °C. Los antibióticos fueron adicionados a las siguientes concentraciones ($\mu\text{g/ml}$): para *E. coli*, Gentamicina (Gm_{10}), Kanamicina (Km_{25}), and Tetraciclina (Tc_{10}). Para Rhizobia: Acido Nalidíxico (Nal_{20}), Neomicina (Nm_{60}), Rifampicina (Rif_{50}), Espectinomicina (Sp_{100}), Gm_{30} , y Tc_5 . Para la preparación en medio solido se agregó agar al 1%, el cual fue esterilizado junto con los medios a 120 °C durante 30 minutos.

5.2 Conjugaciones bacterianas

Las conjugaciones entre las cepas fueron hechas de manera biparental, usando cultivos crecidos hasta fase estacionaria por una noche (Over Night). La conjugación entre las cepas donadoras y receptoras se hizo realizando una mezcla 1:1 (vol/vol) en placa incubándose a 30 °C ON. Posteriormente la mezcla fue resuspendida en 1 ml de MgSO_4 10 mM - tween 40 0.01% (vol/vol). Seguido de diluciones seriadas y plaqueadas en placas suplementadas con los correspondientes antibióticos con el fin de cuantificar el número de células donadoras, receptoras y transconjugantes. La frecuencia de conjugación está expresada como el número de transconjugantes entre el número de donadoras. Se verifico el patrón de plásmidos de las cepas donadoras, receptoras y transconjugantes usadas en este estudio empleando la técnica de Eckhardt (Eckhardt, 1978), modificada por Hynes y McGregor (1990).

5.3 Desinfección y germinación de semillas.

5.3.1 *Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa.

Se hizo una preselección de aquellos frijoles que no presentaron algún daño en la cutícula. Posteriormente se colocaron en un recipiente y lavaron con agua y agitaron vigorosamente para quitar los restos de tierra, después se lavaron con agua estéril (2-3 veces), acto seguido se añadió etanol al 100% durante un minuto y después se lavaron con agua estéril para quitar los restos de alcohol, por ultimo se lavaron con hipoclorito de sodio al 20% durante 5 minutos agitando las semillas para una mejor esterilización y finalmente se enjuagaron con agua estéril (3-5 veces).

Para la germinación de las semillas de frijol, se colocaron en una charola con una base de papel humedecida con medio Fahraeus (tabla 3) y se cubrieron con papel aluminio incubaron a una temperatura de 30°C por 48 horas.

Tabla 3. Preparación medio Fahraeus

Stock Medio Fahraeus 1000X			Stock Trazas Gibson (g/L) 1000X		
*2.5 g	CaCl ₂	0.680 M	2.8 g	H ₃ BO ₃	0.680 M
*3 g	MgSO ₄	0.486 M	2.03 g	MnSO ₄	0.486 M
*2.5 g	KH ₂ PO ₄	0.734 M	0.22 g	ZnSO ₄	0.734 M
*3.7 g	Na ₂ HPO ₄	1.042 M	8 g	CuSO ₄	1.042 M
*0.125 g	Citrato Férrico	0.0185 M	8 g	NaMoO ₄	0.0185 M

*Se disuelven en 25 ml de agua estéril y se esterilizan a 120 °C por 30 min

Se agrega 1 ml de cada solución y después aforar a un litro con agua estéril y se ajusta el pH a 5.5 y se guarda a 4 °C.

5.3.2 *Zea mays* (Maíz morado).

Las semillas de maíz se colocaron en un frasco y se lavaron con hipoclorito de sodio al 20% durante 5-7 minutos agitando fuertemente para poder romper la cutícula, posteriormente se enjuagaron con agua estéril de 3-5 veces. Para la germinación se hace de la misma forma como se describió en el apartado anterior.

5.3.3 *Medicago sativa* (Alfalfa).

Las semillas de alfalfa se colocaron en un matraz y se agrega ácido sulfúrico concentrado en agitación durante 5 min. Posteriormente se lavaron con agua estéril evitando dejar restos del ácido sulfúrico. Por último, se añadió hipoclorito de sodio al 20% en agitación por 5 min y se lavaron con agua estéril de 3-5 veces. Se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se añade agar suave al 0.01% y se cubren con papel aluminio y se guardan a 4°C por 24 horas.

Se prepararon cajas de agar y se colocaron las semillas de alfalfa e incubaron a 20°C por 48-72 horas.

5.4 Ensayo de plantas

Semillas de *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa fueron esterilizadas y germinadas con el método previamente descrito por (Cárdenas et al., 1995). Plántulas de dos días post germinación (dpg) fueron colocadas en tubos (40 ml) con medio Fahraeus (Fahraeus, 1957), posteriormente se inocularon con las cepas donadoras y/o receptoras ajustando a una D.O. de 0.05 a 600 nm, en una proporción de 1:1. Después de 20 días las raíces fueron introducidas a tubos falcón (25 ml) con medio y se pusieron en un baño ultrasónico por 20 minutos (Branson 200 ultrasonic cleaner), después se retiraron las plantas y el medio se centrifugó por 15 min a 5000 rpm a 4 °C, finalmente se

recuperaron las bacterias y se hicieron diluciones para plaquearlas en los diferentes medios con los antibióticos apropiados. Además, se tomaron muestras de raíz y nódulos para el análisis por microscopía confocal y citometría de flujo a distintos tiempos (figura 7).

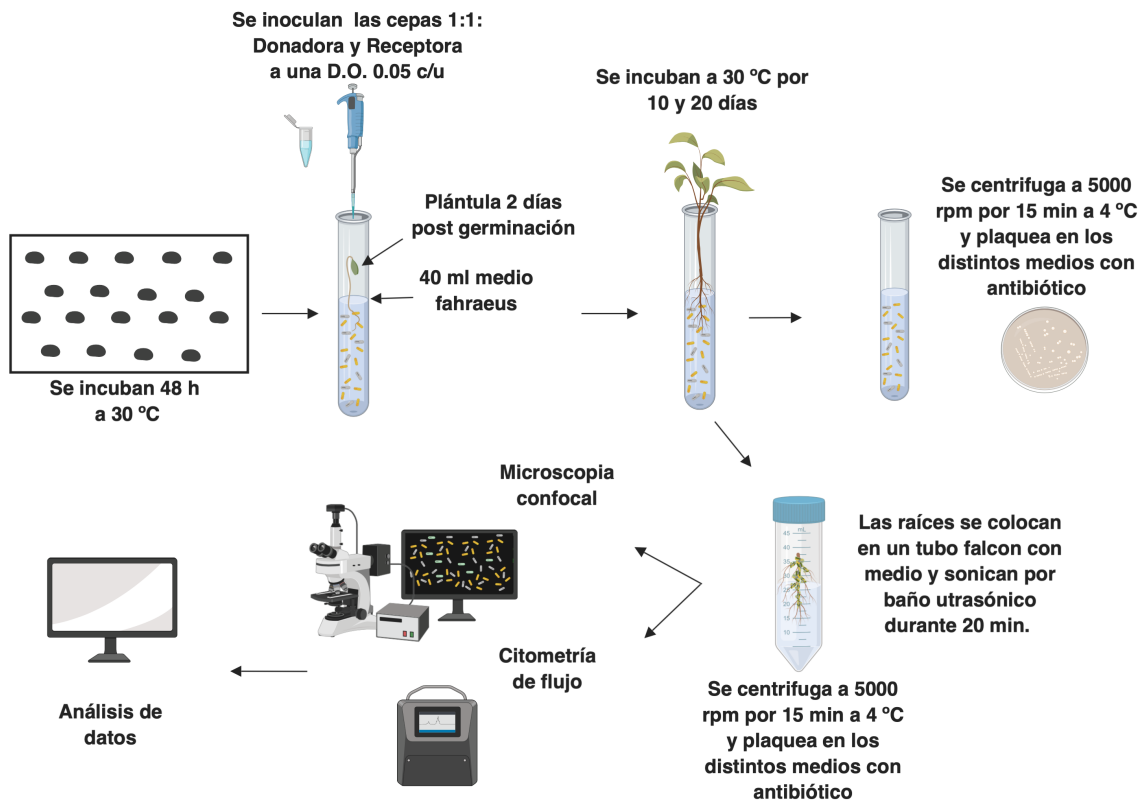


Figura 7. Esquema para el ensayo de plantas en medio hidropónico.

Para el ensayo de plantas en medio hidropónico primero se esterilizaron las semillas (ver materiales y métodos) de frijol negro var negro jamapa y se germinaron por 48h, posteriormente se inocularon con las cepas correspondientes y se incubaron a 30°C a diferentes tiempos (1, 10 y 20 días) para sus respectivos análisis por UFC y/o microscopía de fluorescencia.

5.5 Análisis de Microscopía

Las bacterias adheridas a la superficie de la raíz fueron visualizadas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta adjunto a un Axiovert 200 M. La excitación de la GFP fue a 488 nm, usando un láser Ar/2 y un espejo con excitación dicroica HFT

UV 488/543/633 nm con un filtro de emisión para detección BP 500–530 IR. Para DsRed se excitó a 543 nm con un láser He/Ne1, con el mismo espejo de excitación dicroica dual y filtro de emisión un BP565–615 IR. Se utilizó el objetivo EC 'Plan-Neofluar' 10×/0.30 Ph1 con campo oscuro y C-Apochromat 63×/1.2 W Korr, Ph3, DIC. Las imágenes de campo claro fueron obtenidas con contraste de interferencia diferencial (DIC). También se colectaron imágenes en un sistema confocal de escaneo de laser Olympus FV-1000, conectado a un microscopio invertido Olympus IX-81 (Tokio, Japón). Para la excitación de la GFP, se utilizó una línea múltiple de láser de argón a 488 nm (Melles Griot Bensheim, Alemania), un espejo dicroico primario DM 405/488 y un aceite para el objetivo UPLSAPO 60×/1.35 LSM (Olympus). La emisión fue detectada en un rango de 500–600 nm. RFP se excitó a 561 nm, con un espejo dicroico DM405/488/561/633. La emisión se detectó en un rango de 600–700 nm. Las imágenes fueron procesadas usando el programa ImageJ 1.47v (Institutos Nacionales Wayne Rasband de Salud) y el software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

5.6 Análisis por citometría de flujo

Para la preparación y análisis de las muestras para citometría de flujo, las bacterias fueron aisladas de los nódulos usando el protocolo descrito por Tsyganov (2003). Las bacterias fueron colectadas de los nódulos y resuspendidas en 500 μ l de MgSO₄ 10 mM.

Para la adquisición se utilizó el equipo Imaging flow cytometer (ImageStream^x; Amnis/EMD Millipore, Seattle, Wa). La adquisición de imágenes incluye imágenes en campo claro y se utilizó el canal 1 con una absorbancia de 420 – 480 nm, para la GFP

el canal 2, con una absorbancia de 480 – 560 nm, para la RFP el canal 4 con una absorbancia de 595 – 660 nm. Para cada muestra, se colectaron 20 000 eventos. Para el análisis se utilizó el software IDEAS® versión 5.0 (Amnis Corp, Seattle, WA). Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces, se muestra el promedio y desviación estándar.

5.7 Construcciones de plásmidos y cepas usados en este estudio

5.7.1 Construcción de las cepas CFN42-1, CFN42-2, CFN42-3, CFNX669-1, CFNX669-2 y CFNX669-3

Para generar las fusiones transcripcionales con el gen reportero GFP, se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones promotoras de *tral* de 410 pares de bases (pb) y *traA* de 421 pb respectivamente. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *XhoI* y *XbaI*, y clonados en los sitios correspondientes en el vector pK18mob-LKNot pLacGFP. Posteriormente se realizaron dobles digestiones con las enzimas *XhoI* e *HindIII* que contienen las regiones promotoras de *tral* y *traA* fusionadas con GFP, y los fragmentos se clonaron en los sitios correspondientes en el plásmido pBBR1MCS-5. Una vez clonadas se pasaron por conjugación a una cepa de *Rhizobium etli* CFN42 obteniendo las cepas CFN42-1 y CFN42-2 y a una cepa mutante en *tral* (CFNX669) (Tun-Garrido et al., 2003) obteniendo las cepas CFNX669-1 y CFNX669-2.

5.7.2 Construcción de las cepas CFNX559-1 y CFNX559-2

El plásmido pTR102 fue modificado para obtener un derivado carente de 3.2 kb de la región de estabilidad (Weinstein et al., 1992). El plásmido pTR102 fue digerido con *HindIII-KpnI* para sustituir la región de estabilidad insertando un casete *loxSp* en los

sitios *HindIII-KpnI* (Martínez-Salazar and Romero, 2000). El casete *loxSp* del plásmido fue removido digiriendo con *BamHI*, dando como resultado el plásmido pU. Se amplificó la región de *traM* de la cepa NGR234 con oligos específicos (TraM-H3 y Lw-TraM-Bh) Una vez amplificado el gen se hizo una doble digestión en dichos sitios de los plásmidos pS y pU y posteriormente se ligó, de tal manera que ahora estos vectores tienen fusionado este gen, una vez obtenidos estas construcciones se pasaron por conjugación a la derivada de CFNX559.

5.7.3 Construcción de la cepa CFNX559-3

Se obtuvo un producto de PCR de 1022 pb que contenía el gen *trala* completo y el extremo 5' del gen *trbB* de *R. etli* CE3 bajo el control del promotor *nifHc* utilizando la metodología de extensión de PCR por solapamiento (Shevchuk et al., 2004). Para determinar la fidelidad del producto, fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y secuenciado. Para construir un plásmido suicida útil para la homogenización (pLG77), se purificó el fragmento *PnifHc-trala* (*BamHI-EcoRI*) y se ligó el producto de PCR en los sitios *BamHI-HindIII* del gen *repAa* en el plásmido pK*mobsacB modificado con un casete Ω Tc (Schäfer et al., 1994). Este plásmido se modificó insertando un casete de Ω Km en la región intergénica *repAa-trala*. Todos los sitios de restricción utilizados para generar el plásmido pLG77 se introdujeron en los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 2. Para introducir el alelo *PnifHc-trala* en *R. etli*, *E. coli* DH5 α /pLG77 se hizo una crucea triparental utilizando la cepa de *R. etli* CFNX559 como receptora y DH5 α /pRK2013 como ayudante de conjugación. Las dobles recombinantes se seleccionaron como NaI^R, Sm^R, Km^R y Tc^S. El resultado es un derivado de pRet42a con el gen *tral* bajo el

promotor de *nifH* (pRet42a-HI). A esta construcción se le nombró CFNX559-3.

5.7.4 Construcción de las cepas CFNX559-4 y CFNX559-5

El plásmido pHM, que contiene el gen *traM* bajo el promotor de *nifH* se construyó generando 2 productos de PCR, el primero de ellos corresponde al promotor de *nifH* con los oligonucleótidos Up-pHc-Bh-Xho y Lw1-ov-pHc-TraM, y el otro es de *traM*, con los oligonucleótidos Up1-ov-traM-pHc y Lw-TraM-R1. Estos productos se fusionaron y clonaron en el vector pCR2.1 TOPO. Se verificaron cuatro clonas por secuencia. pCR2.1 TOPO::*pnifHc-traM* se digirió con EcoR1, utilizando los sitios de restricción del oligonucleótido Lw-TraM-R1 y del vector. El fragmento R1 (665 pb) se clonó en el vector pFAJ1700, y se digirió con *EcoR1*. Los transformantes se introdujeron en las cepas CFNX559 y CFNX559-3

5.7.5 Construcción de la cepa CFN42/Ch::*RFP*/pRet42d::*GFP-Sp*/pRet42a

Para la construcción de esta cepa se utilizó una derivada de *R. etli* que no tiene el plásmido pRet42a y se integró el gen de la proteína RFP en su cromosoma. Posteriormente se realizó una conjugación entre las cepas CFN42/Ch::*RFP* y S17-1 pK18mob-sacB::*pRet42d-pNEO::GFPmut3-Sp*, esta última contiene una sección del plásmido simbiótico fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP). Las transformantes obtenidas se analizaron por PCR para ver su integración.

6. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se encuentran plasmados en la publicación: "Luis Alfredo Bañuelos-Vazquez, Gonzalo Torres Tejerizo, Laura Cervantes-De la Luz, Lourdes Girard, David Romero and Susana Brom*. Conjugative transfer between *Rhizobium etli* endosymbionts inside the root nodule. Environmental Microbiology 21(9): 3430 - 3441. doi:10.1111/1462-2920.14645. ISSN:1462-2912. PMID: 31037804.

La conclusión principal del trabajo es que los nódulos de plantas leguminosas son nichos apropiados para la transferencia conjugativa de plásmidos de rizobios y no solo para la fijación de nitrógeno bacteriana.

Los resultados de este trabajo se dividieron en tres apartados:

6.1 Nódulos de plantas leguminosas son nichos apropiados para la transferencia conjugativa de plásmidos de rizobios y no solo para la fijación de nitrógeno bacteriana.

6.2 La rizosfera de *Phaseolus vulgaris* estimula la transferencia conjugativa de pRet42a de *Rhizobium etli*.

6.3 Transferencia del plásmido simbiótico dentro de los nódulos de raíces de frijol

6.1 Nódulos de plantas leguminosas son nichos apropiados para la transferencia conjugativa de plásmidos de rizobios y no solo para la fijación de nitrógeno bacteriana.

6.1.1 pRet42a realiza la transferencia conjugativa en la rizosfera y en nódulos de plantas de frijol.

Para determinar si la transferencia conjugativa se lleva a cabo en la rizosfera y/o en estructuras simbióticas (superficie de la raíz, hilo de infección y nódulos) utilizamos como donadora a la cepa CFNX559 la cual es una derivada de *R. etli* CFN42. Esta cepa tiene marcado el plásmido conjugativo (pRet42a) con la proteína GFP y el cromosoma con RFP, y como receptora se utilizó la cepa CFN2001, la cual no contiene los plásmidos pRet42a y pRet42d, además de no tener ninguna marca fluorescente. Esto nos permitió hacer una detección diferencial para los análisis de microscopía y citometría de flujo, ya que la cepa donadora al tener las dos marcas fluorescentes nos da un color amarillo (por la combinación de colores de las proteínas fluorescentes) y las transconjugantes serán verdes debido a la transferencia del plásmido pRet42a que tiene la marca con GFP (figura 8) (Torres Tejerizo et al., 2015).

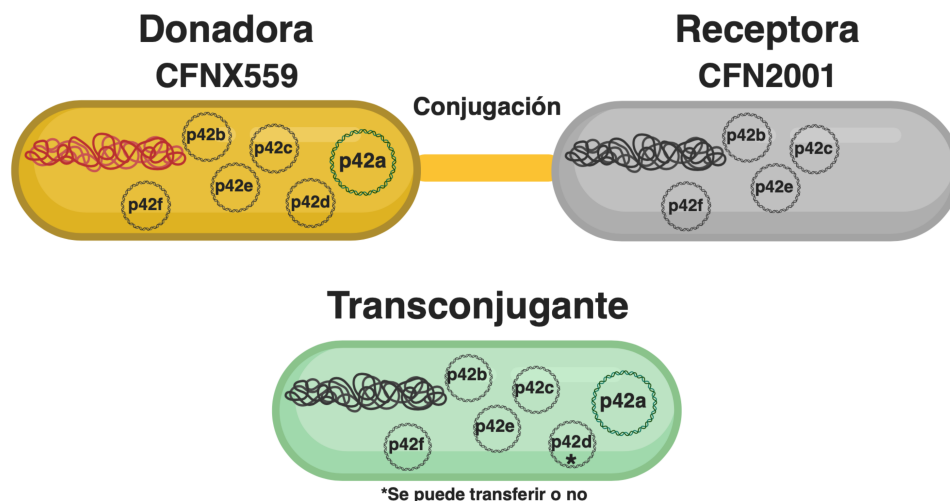


Figura 8. Estrategia para diferenciar entre donadoras y transconjugantes.

Las células donadoras tienen un marcador de GFP en el plásmido pRet42a (CFN42/pRet42a-GFP) y un marcador de RFP en el cromosoma, presentando fluorescencias verde y roja. La cepa receptora no tiene ningún marcador fluorescente. Los transconjugantes heredarán el pRet42a-GFP y expresarán solo la fluorescencia verde.

Los experimentos que realizamos en planta fueron hechos en condiciones hidropónicas y analizados 10-20 días post inoculación (dpi). Como se puede observar en la figura 9A en el biofilm formado sobre la superficie de la raíz se encuentran algunas secciones de transconjugantes y otras con donadoras y transconjugantes mezcladas. Este resultado sugiere que la conjugación se pueda estar llevando a cabo sobre las raíces. Cabe mencionar que existen reportes de que *Rhizobium* es capaz de inducir la formación de biofilms en las raíces de plantas leguminosas (Fujishige et al., 2006), no obstante, no mencionan que dicha formación de biofilms puedan favorecer la conjugación en estas estructuras. En hilos de infección (figura 9B) se puede apreciar una mezcla de bacterias (donadoras, transconjugantes). Este dato es interesante ya que los hilos de infección pudieran favorecer eventos de conjugación debido a la cercanía y contacto célula – célula que se puede dar en dichas estructuras, sin embargo, cabe la posibilidad de que las transconjugantes observadas puedan venir desde el exterior y haber ingresado a los hilos de infección, de cualquier manera, encontrar transconjugantes en hilos de infección es un dato atractivo y sugerente de que pudiera estar ocurriendo la conjugación.

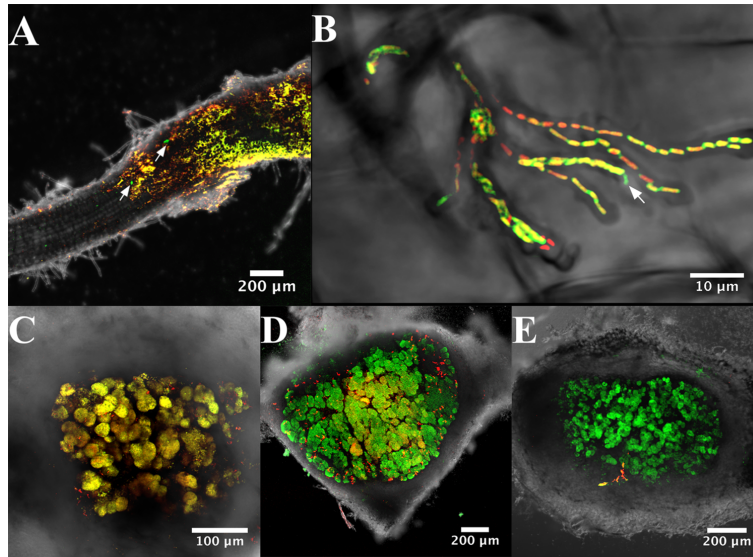


Figura 9. Poblaciones de donadoras y transconjugantes en superficie de raíz, hilos de infección y nódulos.

Muestras de raíces, hilos de infección y nódulos de plantas inoculadas con las cepas CFNX559 (donadora) y CFN2001 (receptora) fueron analizadas a 20 dpi por microscopía confocal. Las células donadoras son amarillas debido a que tienen los marcadores RFP y GFP, y las transconjugantes son verdes porque solo llevan el marcador GFP. Las células rojas son donadoras que perdieron el plásmido pRet42a. (A) superficie de la raíz, (B) hilo de infección, (C), (D) y (E) nódulos. Las flechas indican la ubicación de algunas transconjugantes.

Además, se analizaron diversos nódulos a 20 dpi, entre los cuales encontramos nódulos poblados por una sola cepa (donadoras o transconjugantes), o mezclados como se aprecia en la figura 9C – E. Conjuntamente se analizaron un total de 100 nódulos para ver la distribución de las poblaciones que habitan dichas estructuras (figura 10), observando un mayor número de nódulos mezclados (45 %), que de transconjugantes y donadoras, 30 y 25 %, respectivamente.

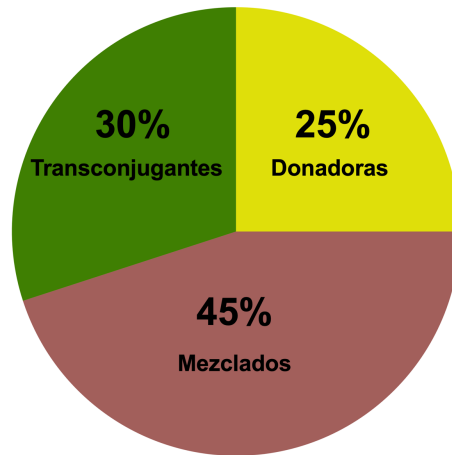


Figura 10. Porcentaje de ocupación de nódulos.

Análisis de 100 nódulos los cuales muestran un 25% de nódulos ocupados por donadoras, un 45% de nódulos mezclados y finalmente un 30% de nódulos ocupados por transconjugantes.

Por otra parte, se recuperaron las bacterias dentro de los nódulos (ver materiales y métodos) para posteriormente crecerlas en placas de agar con los antibióticos adecuados para recuperar las distintas poblaciones y así obtener la frecuencia de conjugación. Como se puede observar en la figura 11, la frecuencia de conjugación dentro de los nódulos es bastante alta.

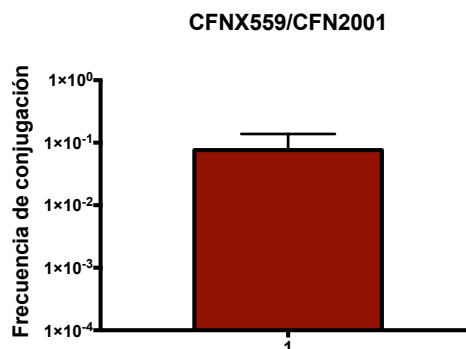


Figura 11. Análisis de la frecuencia de conjugación de nódulos.

El análisis de los nódulos por citometría de flujo reveló que la población está compuesta principalmente por transconjugantes (60 %), y el 40 % restante esta constituido por 30 % donadoras, 8 % receptoras y 2 % de donadoras que perdieron el pRet42a (figura 12A). Como control, se inocularon plantas exclusivamente con la cepa donadora

(CFNX559). En la citometría de flujo de este control se encontró un 2% de la población que pudiera corresponder a transconjugantes (figura 12B). También se encontró una población que pudiera corresponder a bacterias endófitas, que pudieran estar funcionando como receptoras. Este dato es sugerente de que pueda haber una diversificación bacteriana por la incorporación de genes conjugativos y/o simbióticos a bacterias endófitas presentes en los nódulos.

Cabe resaltar que la cepa receptora CFN2001, no tiene el pRet42a ni el plásmido simbiótico pRet42d, lo que la hace incapaz de nodular por si sola, sin embargo, los datos de citometría nos revelan que se encuentra dentro de los nódulos lo que sugiere que esta cepa pudiera estar aprovechando los hilos de infección generados por la cepa donadora para ingresar a los nódulos. Sorprendentemente, observamos un gran número de transconjugantes en los nódulos. Esto nos llevó a suponer que la conjugación pudiera estar ocurriendo dentro de estas estructuras. Para confirmar o descartar esta posibilidad empleamos 4 estrategias que se describen en las siguientes secciones.

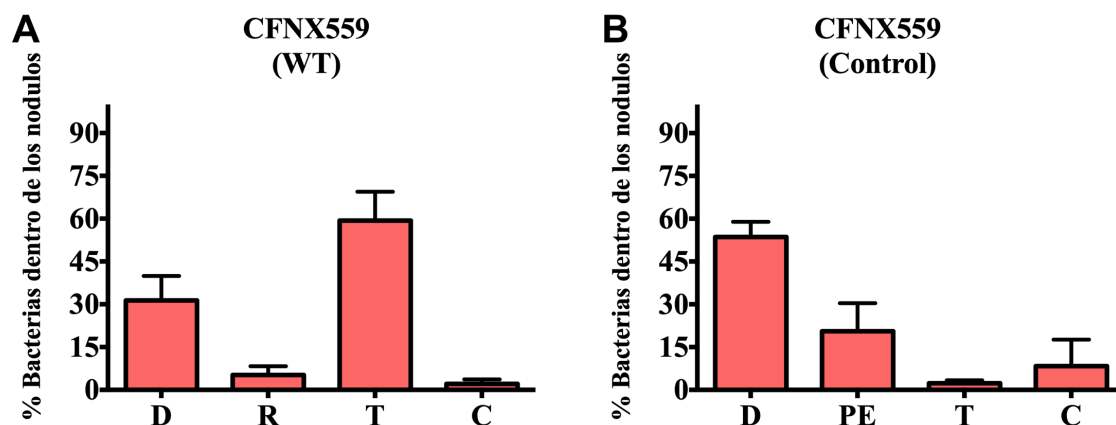


Figura 12. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos.

Las bacterias se aislaron a partir de nódulos 20 dpi, de plantas inoculadas con: A. CFNX559 (donadora) y CFN2001 (receptora), B. CFNX559 (donadora) sin receptora. D - donadoras, R - receptoras, T - transconjugantes, C - curadas, PE - posibles endófitas.

6.1.2 Expresión de las fusiones *ptral::GFP* y *ptrA::GFP* indican que la maquinaria de conjugación esta activa dentro de los nódulos

La primera estrategia que se utilizó fue para saber si la maquinaria de conjugación se encontraba activa dentro de la planta. Para ello se seleccionaron dos genes: *traA*, que codifica para la relaxasa, y es el primer gen del operón para el procesamiento y transferencia del DNA, y *tral* que codifica para la acil homoserin lactona sintasa, y participa en la inducción de la expresión de todos los genes de transferencia (Tun-Garrido et al., 2003). Las regiones promotoras de ambos genes se fusionaron con el gen reportero GFP y se introdujeron a la cepa silvestre *Rhizobium etli* CFN42.

Asimismo, comparamos la actividad de las fusiones transcricionales de *ptral::GFP* y *ptrA::GFP* dentro de la planta con la actividad del promotor del gen de la nitrogenasa reductasa (*nifH*) el cual solo se activa dentro del nódulo, donde hay baja concentración de oxígeno. Como se puede observar en la figura 13 la transcripción de *ptral::GFP* y *ptrA::GFP* (paneles A – D) se encuentra activada en la superficie de la raíz, hilos de infección y nódulos, mientras que la actividad de *pnifH::GFP* (paneles E – F) solo se

activa en los nódulos.

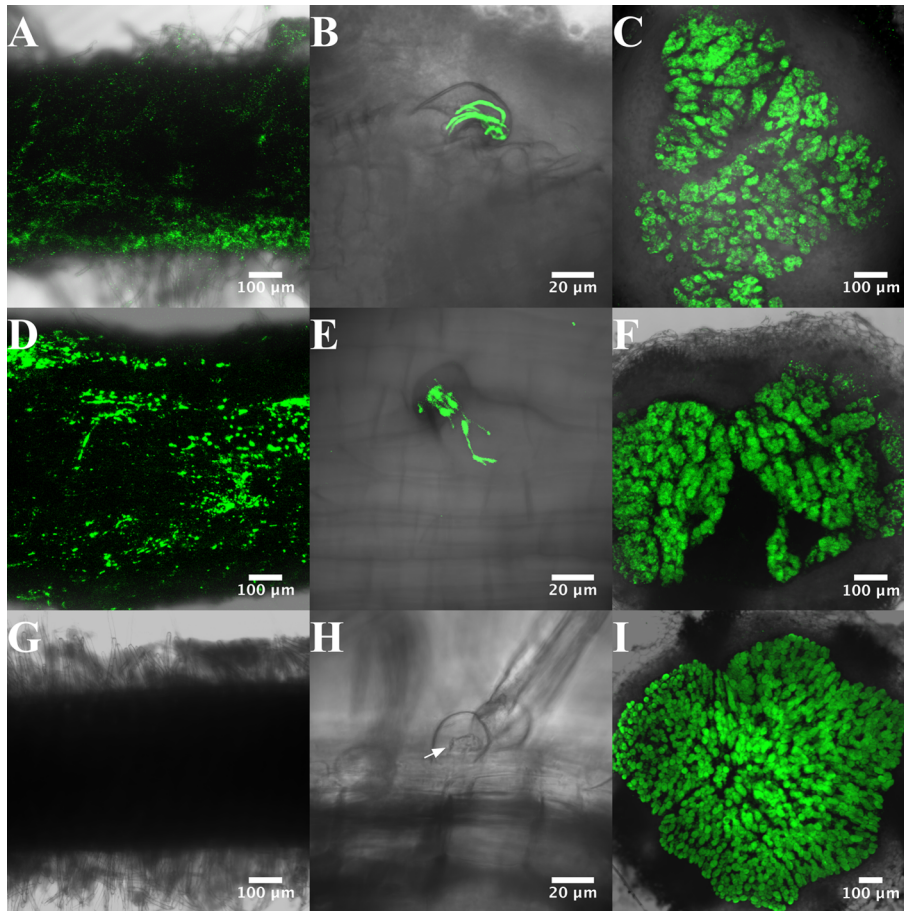


Figura 13. Los promotores de *tral* y *traA* se inducen en la superficie de la raíz, el hilo de infección y los nódulos.

Cultivos hidropónicos que contenían plántulas se inocularon con derivados que llevan un marcador GFP bajo el promotor de *tral* (paneles A, B y C), de *traA* (paneles D, E y F) y del promotor de *nifH* como control (paneles G, H y I). Las muestras se aislaron a 20 dpi, y las diferentes estructuras se analizaron mediante microscopía confocal. Raíces (paneles A, D y G), hilos de infección (paneles B, E y H) y nódulos (paneles C, F e I).

De la misma forma las fusiones transcripcionales (*ptral::GFP*, *ptrA::GFP* y *pnifH::GFP*) se introdujeron a una cepa mutante en *tral* (CFNX669) para ver su actividad. Los resultados no mostraron actividad con *ptral::GFP* y *ptrA::GFP* (figura 14A – E) mientras que con *pnifH::GFP* la actividad solo se ve en nódulos (figura 14G – I). Con

estos datos podemos concluir que la maquinaria de conjugación se encuentra activa dentro y fuera de la planta y está sujeta a una regulación por *quorum - sensing*.

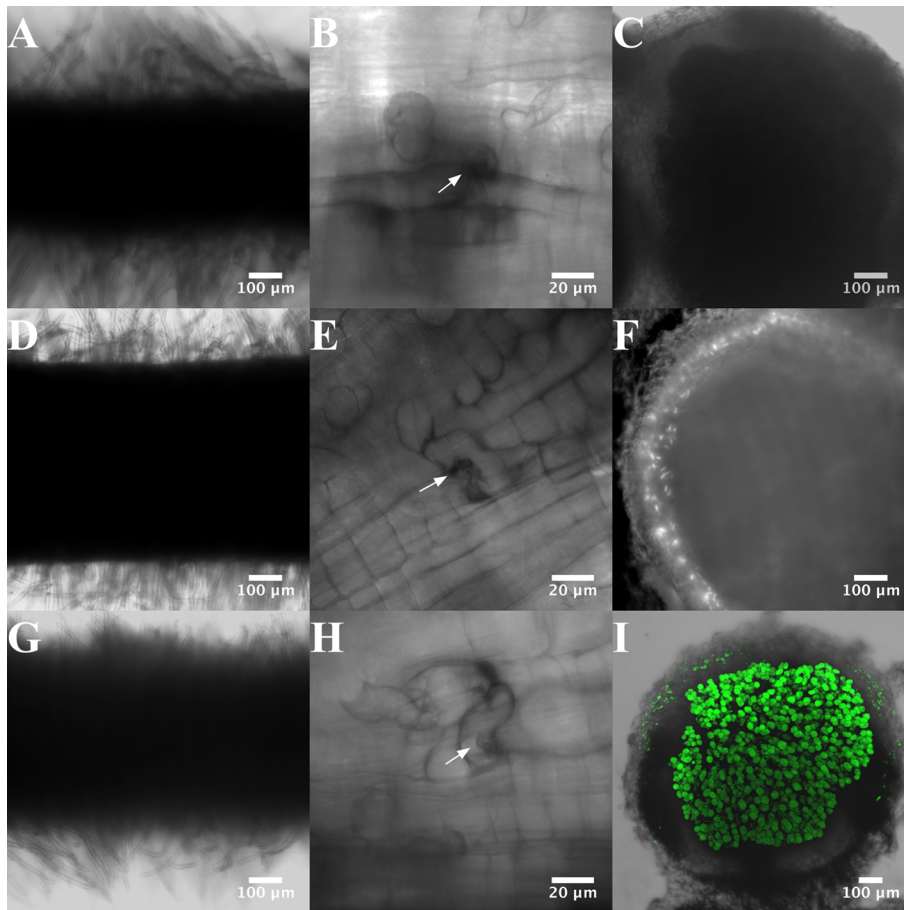


Figura 14. Los promotores de *tral* y *traA* no se inducen en un fondo *tral*:

Cultivos hidropónicos que contenían plántulas de frijol se inocularon con una cepa *tral*⁻ que llevan un marcador GFP bajo el control del promotor de *tral* (paneles A, B y C), del promotor de *traA* (paneles D, E y F), y bajo el control del promotor de *nifH* (paneles G, H e I). Las muestras se aislaron a 20 dpi, y se analizaron las diferentes estructuras mediante microscopía confocal. Raíces (paneles A, D y G), hilos de infección (paneles B, E y H) y nódulos (paneles C, F e I). Las flechas indican la ubicación de los hilos de infección.

6.1.3 Inhibición de la conjugación en la superficie de la planta no impide la aparición de transconjugantes en el nódulo

La segunda estrategia que se realizó para mostrar si la conjugación ocurre dentro de los nódulos, surgió de una de las interrogantes que era: ¿Cómo podemos inhibir la

conjugación en la rizosfera, pero no en el interior de la planta? Para hacer esto utilizamos a *traM*, el cual codifica para un anti-activador de TraR en el plásmido pTi de *A. tumefaciens*, regulando negativamente la expresión de los genes de conjugación (Luo et al., 2000). En el plásmido pRet42a de *R. etli* este gen se encuentra presente, pero inactivo. Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que al introducir un TraM heterólogo (en este caso de la cepa NGR234), la frecuencia de conjugación del plásmido pRet42a disminuye aproximadamente 100 veces (Tun-Garrido et al., 2003). Para cumplir nuestro objetivo se construyeron dos clonas (CFNX559-1 y CFNX559-2) que llevan *traM*. Una de estas clonas (CFNX559-1) lleva un plásmido inestable (pU) debido a que la región de estabilidad del plásmido fue removida y la otra clona (CFNX559-2) contiene el plásmido estable (pS). Una vez obtenido esto, lo primero que hicimos fue ver si en efecto en estas cepas se disminuía la frecuencia de conjugación en placa comparando con la cepa silvestre. Como se puede ver en la figura 15, disminuyó la frecuencia de conjugación de las cepas que llevan la fusión con *traM*, observándose una disminución mayor en la cepa CFNX559-2 que lleva el plásmido estable (pS::*traM*).

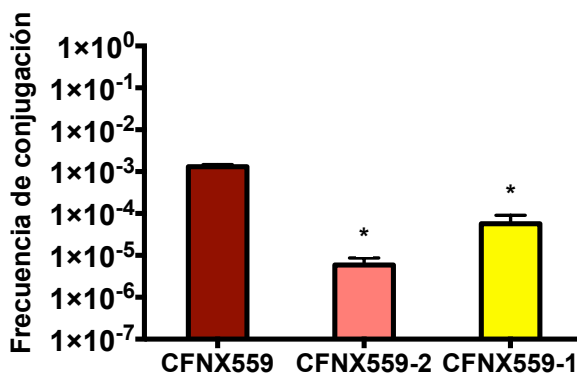


Figura 15. Análisis de la frecuencia de conjugación con TraM.

Frecuencia de conjugación de las cruces entre las cepas CFNX559/CFN2001, CFNX559-2/CFN2001, CFNX559-1/CFN2001. Se muestra una clara disminución de la frecuencia de conjugación cuando TraM esta presente.

Posteriormente, utilizando nuestro sistema hidropónico de plantas, realizamos los siguientes pasos para evitar la conjugación en la rizosfera como se muestra en la figura 16. Primero se pusieron las plantas en el medio hidropónico y se inocularon con las cepas donadora y receptora, ambas conteniendo el plásmido pU, y se le adicionó al medio antibiótico (Tc_5), para forzar la permanencia del plásmido. Se dejaron tres días para que las bacterias se pudieran adherir a la raíz y empezar el proceso de simbiosis, después de ese tiempo, las plantas se retiraron y colocaron en un medio nuevo sin antibiótico, para permitir que las bacterias que iniciaron la simbiosis pudieran perder el plásmido. Además, las plantas se re-inocularon, con la cepa donadora que tiene la región estable (pS), para que, al no poderse perder, pudieran seguir inhibiendo la conjugación en la rizosfera, aún en ausencia del antibiótico. También inoculamos, por separado, plántulas desde el inicio con la cepa que lleva el pS. Después de esto analizamos las diferentes estructuras simbióticas a 10 dpi por microscopia de fluorescencia y a 20 dpi con citometría de flujo y por UFC.

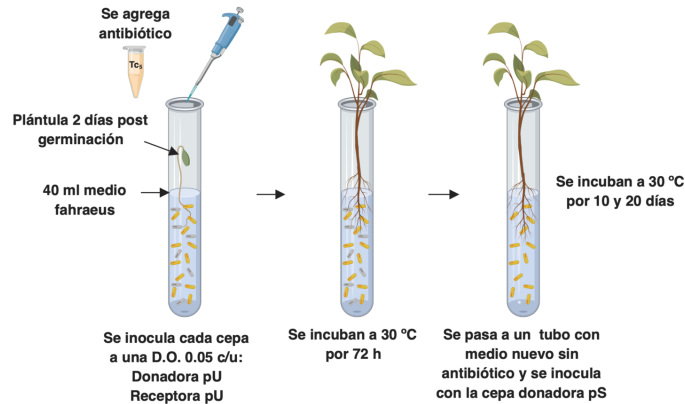


Figura 16. Inhibición de la conjugación en la rizosfera con TraM.

Se inocularon plántulas 2 días post germinación con las cepas CFNX559-1 (pU) y CFN2001-1 (pU), además de agregar antibiótico para tener una presión selectiva de los plásmidos (T_{C5}), y se incubaron por tres días para que dichas cepas entraran en los hilos de infección y comenzaran la formación de nódulos. Tres días después se retiró la planta y se sumergió en un nuevo tubo con medio fresco sin antibiótico, y se inoculó con la cepa CFNX559-2 (pS) para inhibir las posibles receptoras que pierdan el plásmido pU. Se incubaron por 10 y 20 días y se analizaron por microscopía confocal.

Los resultados, midiendo la frecuencia de conjugación por UFC se muestran en la figura 17. A diferentes tiempos (1, 10 y 20 días) en el medio (panel A) y sobre la superficie de la raíz (panel B), se observa una clara disminución de la frecuencia de conjugación a etapas tempranas (1 y 10 días) mas no así a etapas tardías (20 días). Esto puede ser debido a aquellas bacterias que perdieron el plásmido con TraM, y aquellas transconjugantes que se estén duplicando.

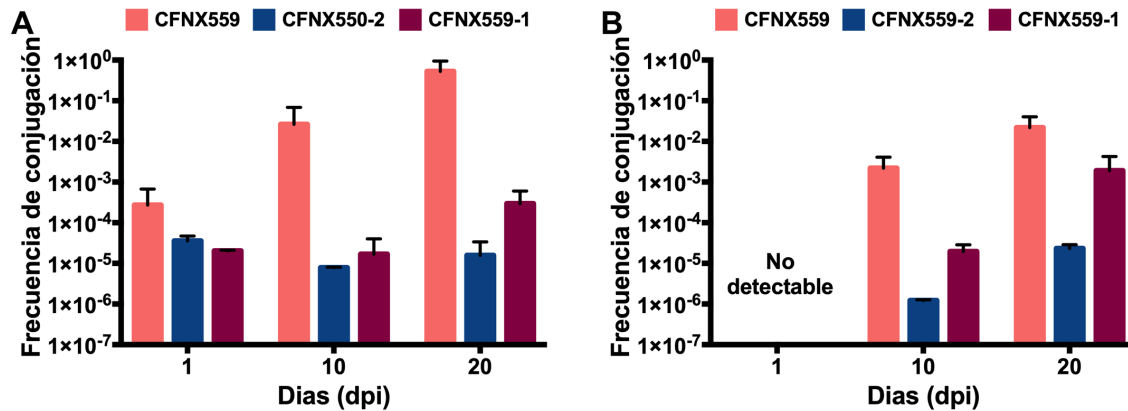


Figura 17. Análisis de la frecuencia de conjugación con TraM en el medio y sobre la superficie de la raíz.

A. Análisis de la frecuencia de conjugación en el medio a diferentes tiempos (1, 10 y 20 dpi). B. Análisis de la frecuencia de conjugación sobre la superficie de la raíz a diferentes tiempos (1, 10 y 20 dpi).

Por tal motivo se analizaron nódulos de plantas de 10 dpi para ver un efecto sobre la inhibición de la frecuencia de conjugación. Las imágenes nos muestran un gran número de transconjugantes en nódulos en las plantas que llevan el pU (figura 18B) y unas pocas en la superficie de la raíz (biofilms) (figura 18D). En plantas inoculadas con la cepa que lleva el pS el número de transconjugantes disminuyó considerablemente (figura 18A y C).

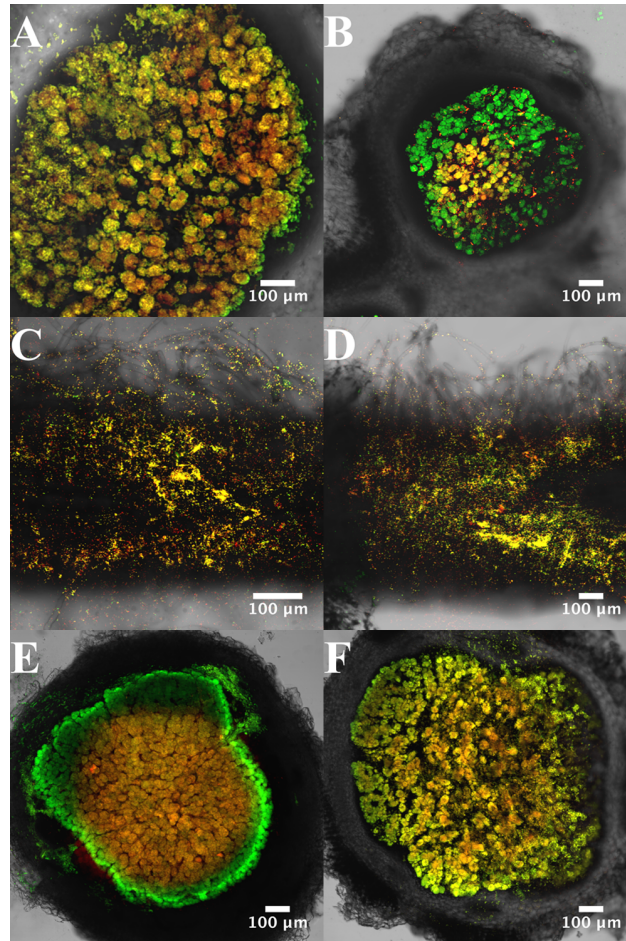


Figura 18. Inhibición de la conjugación en la superficie de la raíz no evita la aparición de transconjugantes en los nódulos.

Microscopía confocal de nódulos (paneles A, B, E y F) y superficie de la raíz (paneles C y D) de plantas (10 dpi) inoculadas con: A) y C) CFNX559-2 (la donadora lleva pS) y CFN2001-2 (la receptora que lleva pS), B) y D) CFNX559-1 (la donadora que lleva pU) y CFN2001-1 (la receptora que lleva pU), E) CFNX559-4 (donadora con pHM) y CFN2001 (receptora), F) CFNX559-5 (donadora con pRet42a-HI y pHM) y CFN2001 (receptora).

El análisis cuantitativo por citometría de flujo confirmó que el porcentaje de transconjugantes disminuyó significativamente cuando tiene el pS como se puede observar en la figura 19B en comparación con cuando tiene el pU (figura 19A).

Estos resultados corroboran nuestra hipótesis de que cuando el pU se pierde, la conjugación se puede llevar a cabo en el interior del nódulo. Ya que la inhibición de la conjugación por TraM es parcial (100 veces) aun podemos ver algún porcentaje de

transconjugantes con la cepa que lleva el plásmido pS. Por lo tanto, podemos concluir que la maquinaria de conjugación de pRet42a esta activa y funcional dentro de los nódulos descartando la posibilidad de que la conjugación solo ocurra en la superficie de la raíz.

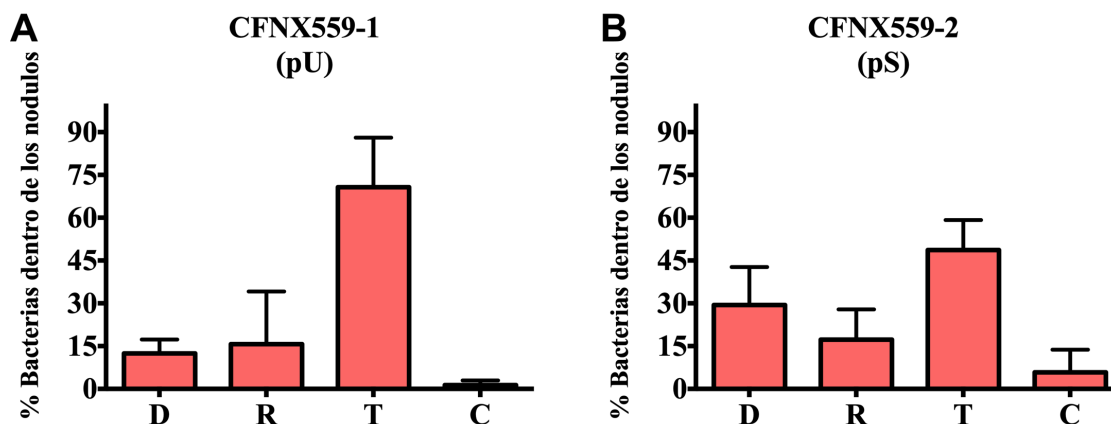


Figura 19. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos (2).

Las bacterias se aislaron a partir de nódulos 20 dpi, de plantas inoculadas con: A. CFNX559-1 (donadora que lleva el plásmido pU) y CFN2001-1 (receptora que lleva el plásmido pU), B. CFNX559-2 (donadora que lleva el plásmido pS) y CFN2001-2 (receptora que lleva el plásmido pS).

6.1.4 Expresión de *tral* bajo el control del promotor de *nifH* permite la transferencia de pRet42a en nódulos

La tercera estrategia implementada para confirmar la conjugación dentro del nódulo fue reemplazar el promotor nativo de *tral* por el promotor de *nifH* con la finalidad de que la maquinaria de conjugación solo se encienda dentro del nódulo. Una vez obtenida la construcción (CFNX559-3) con *tral* bajo el promotor de *nifH* se hicieron ensayos de conjugación en nuestro modelo de planta. Los resultados que observamos por microscopía confocal a 20 dpi (figura 20) indicaron la presencia de transconjugantes en nódulos (figura 20B) mas no así en la superficie de la raíz (figura 20A). Esto es debido a que afuera de la planta el nivel de oxígeno impide la activación del promotor de *nifH*, y por lo tanto de la maquinaria de conjugación.

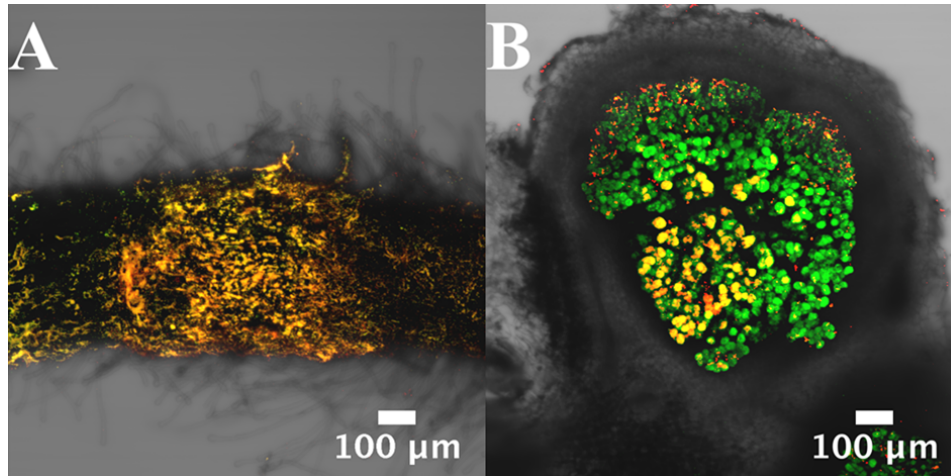


Figura 20. Cuando *tral* está bajo el control del promotor *nifH*, las transconjugantes se observan solo dentro de los nódulos.

A. Microscopía confocal de raíces (10 dpi) y nódulos (20 dpi) (B) de plantas inoculadas con CFNX559-3 (donante con pRet42a-HI) y CFN2001 (receptor).

El análisis por citometría de flujo mostró un porcentaje alto de transconjugantes (figura 21) incluso mayor que el de la cepa CFNX559, tal vez debido a que el promotor de *nifH* pueda ser mucho mas fuerte que el nativo de *tral*.

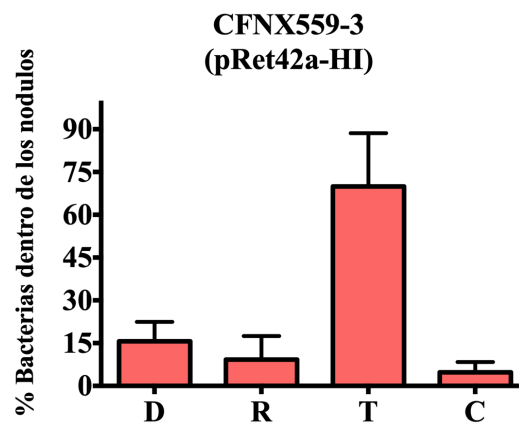


Figura 21. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos (3).

Las bacterias se aislaron a partir de nódulos 20 dpi, de plantas inoculadas con CFNX559-3 (donadora que lleva el plásmido pRet42a-HI) y CFN2001 (receptora).

Finalmente medimos la frecuencia de conjugación por unidades formadoras de colonias (UFC) en presencia de planta a diferentes tiempos. Los resultados nos muestran que no hay conjugación en la rizosfera (medio y superficie de la raíz), pero si en nódulos (figura 22).

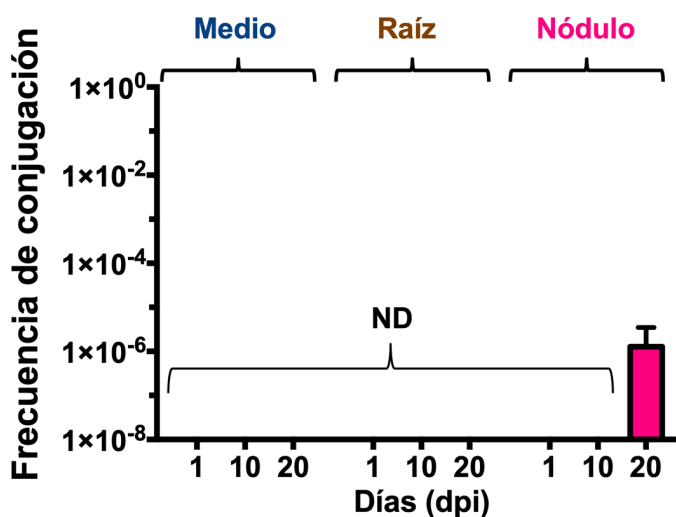


Figura 22. pRet42a frecuencia de transferencia en el medio, superficie de la raíz y nódulos, con donadoras que llevan *traI* bajo el control del promotor *nifH*.

Las unidades formadoras de colonias (UFC) correspondientes a las donadoras (D), receptoras (R) y transconjugantes (T) se obtuvieron del medio, la superficie de la raíz y los nódulos de plantas inoculadas con CFNX559-3 (donadora con pRet42a-HI) y CFN2001 (receptora). La frecuencia de conjugación, expresada como T / D, se determinó a 1, 10 y 20 dpi.

6.1.5 Expresión de *traM* bajo el promotor de *nifH* reduce la transferencia de pRet42a en nódulos

La última estrategia utilizada consistió en determinar que cuando la transferencia es inhibida dentro de los nódulos, el número de transconjugantes disminuye. Para realizar esto, lo que se hizo fue poner a *traM* bajo el promotor de *nifH* y clonarlo en el vector (pHM), posteriormente se introdujo a la cepa CFNX559, generando la cepa CFNX559-4. También se introdujo a la cepa que tiene *traI* bajo el promotor de *nifH* generando la cepa CFNX559-5. Se realizaron ensayos de conjugación en planta a 20 dpi con estas

Resultados

cepas utilizando como receptora a la cepa CFN2001. Los resultados muestran que en los nódulos inoculados con las cepas donadoras que llevan el inhibidor TraM bajo el promotor de *nifH*, disminuye la frecuencia de conjugación (figura 18E – F). Sin embargo, la disminución fue mas evidente con la cepa CFNX559-5, esto muy probablemente debido a que la cepa CFNX559-4 es capaz de conjugarse en la rizosfera y las transconjugantes generadas puedan ingresar a los nódulos mientras que la cepa CFNX559-5 solo puede conjugarse dentro del nódulo. Los análisis por citometría de flujo confirman la disminución del número de transconjugantes comparado con sus respectivas cepas parentales que no llevan el plásmido pHM (figura 23A vs figura 12A y figura 23B vs figura 21). Estos datos confirman que el proceso de conjugación se está llevando a cabo dentro del nódulo y que el número de transconjugantes disminuye cuando el proceso se inhibe en estas estructuras.

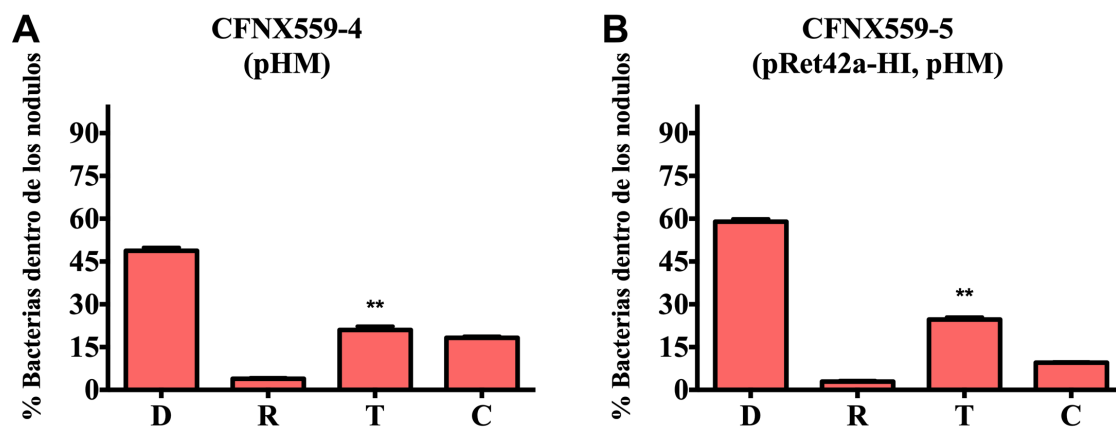


Figura 23. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas de nódulos (4).

Las bacterias se aislaron a partir de nódulos 20 dpi, de plantas inoculadas con: A. CFNX559-4 (donadora que lleva el plásmido pHM) y CFN2001 (receptora), B. CFNX559-5 (donadora que lleva el plásmido pRet42a-HI y pHM) y CFN2001 (receptora).

6.1.6 Discusión

En este trabajo, mostramos que el plásmido pRet42a de *R. etli* es capaz de realizar conjugación a una alta frecuencia dentro de nódulos formados durante el establecimiento de la simbiosis entre *R. etli* y las raíces de *P. vulgaris*. Pensamos que las bacterias receptoras, que son incapaces de nodular, aprovechan a las bacterias donadoras para introducirse dentro de los nódulos, como fue propuesto por Dudeja et al. (2012). Nuestras conclusiones están apoyadas por el uso de diferentes técnicas: visualización de transconjugantes mediante microscopía confocal y cuantificación del número de transconjugantes por citometría; y mediante la implementación de diferentes estrategias para descartar la posibilidad de que todas las transconjugantes se hayan generado en la superficie de la raíz y posteriormente colonizado los hilos de infección y nódulos. Dos de las estrategias fueron dirigidas a inhibir la transferencia conjugativa en la superficie de la raíz. En la primera de ellas utilizamos el gen *traM*, que codifica un antiactivador de TraR. En presencia de TraM, la transferencia de pRet42a disminuye aproximadamente 100 veces (Tun-Garrido et al., 2003). Se introdujo un vector inestable que contiene *traM* en la cepa donadora. Los resultados mostraron que la frecuencia de conjugación de pRet42a disminuyó a niveles casi indetectables en la rizosfera, donde el vector se mantuvo por una presión selectiva con antibiótico, mientras que, dentro de los nódulos, donde la presión para mantener el vector se eliminó permitiendo su pérdida, hubo transferencia del plásmido pRet42a. La segunda estrategia fue colocar el gen *traI* bajo el promotor del gen de la nitrogenasa *nifH*. Este promotor solo se induce dentro de los nódulos (Peralta et al., 2004), de modo que la conjugación en la rizosfera fue completamente abatida. Al usar esta donadora, pudimos obtener transconjugantes dentro los nódulos, comprobando que el proceso conjugativo puede tener lugar dentro

de estas estructuras. La ocurrencia de transferencia de información simbiótica en nódulos fue sugerida en un artículo publicado por Pretorius Güth y col. (1990). A diferencia de nuestro trabajo, donde la transferencia fue realizada por el sistema de transferencia nativo de pRet42a, en el estudio de Pretorius-Güth et al., el plásmido tenía introducida una región *mob*, y la posibilidad de que la conjugación pueda ocurrir en la rizosfera, por lo que no pudo ser completamente descartado que las transconjugantes previamente generadas pudieran entrar a los nódulos. Además, presentamos evidencia de transferencia conjugativa sobre la superficie de las raíces. Esto expande el panorama de la transferencia conjugativa en la rizosfera, que había sido evidenciado por transferencia de islas simbióticas (Sullivan et al., 1995; Sullivan and Ronson, 1998) y de plásmidos que llevan genes de resistencia a antibióticos (Musovic et al., 2006; Heuer and Smalla, 2012; Musovic et al., 2014; Shintani et al., 2014; Klumper et al., 2015; Hall et al., 2016). En hilos de infección, pudimos visualizar transconjugantes y determinar que los genes relacionados a transferencia conjugativa *traI* y *traA* estaban expresándose. Sin embargo, no podemos afirmar de manera concluyente que la conjugación se lleve a cabo en estas estructuras, porque por el momento no hay una técnica disponible para aislar las bacterias de los hilos de infección, de modo que solo unos pocos se pudieron analizar por microscopía. Otro hallazgo inesperado de este trabajo fue encontrar derivadas que perdieron el pRet42a, como se puede observar en los experimentos de citometría. Estudios previos habían mostrado que los plásmidos de *R. etli* CFN42 están sujetos a diferentes rearrreglos, incluyendo la pérdida de plásmidos (Brom et al., 1991). La proporción mas alta de derivadas carentes del plásmido se observó en las cepas que contienen el plásmido pHM (figura 23). El pHM tiene a *traM* bajo el promotor de *nifH*, y este es altamente expresado en los nódulos. Quizás estas

características están relacionadas. A lo largo del tiempo, los nódulos han sido considerados estructuras exclusivas para hospedar rizobios fijadores de nitrógeno y promotores del crecimiento de las plantas, enfatizando el beneficio recibido por la planta, con el único beneficio de las bacterias de recibir una fuente de carbono. Nuestros resultados respaldan una nueva función para los nódulos, destacando un claro beneficio para la bacteria, el cual puede permitir su diversificación y evolución a través de la transferencia conjugativa. La nodulación suele ser un proceso específico, donde ciertas bacterias interactúan con ciertas leguminosas (Gage, 2004; Popp and Ott, 2011; Westhoek et al., 2017), sin embargo, se ha demostrado que los nódulos contienen otras bacterias endógenas, incluyendo diversos rizobios y géneros no rizobianos, como *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, *Actinobacteria* y *Enterobacteriaceae* no clasificadas (Dudeja et al., 2012; Mora et al., 2014; De Meyer et al., 2015; Leite et al., 2016; Lu et al., 2017). Los nódulos contienen una gran cantidad de bacterias, aproximadamente 10^9 (Downie, 2014); incluso si los más abundantes son rizobios, 10^5 – 10^8 bacterias pueden pertenecer a otros géneros (Sturz et al., 1997; Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). Estas bacterias pueden ser receptoras naturales, o donadoras, en eventos de transferencia conjugativa, contribuyendo a la evolución y diversificación de bacterias, no restringida a información simbiótica. Cuando inoculamos la cepa donadora CFNX559 en ausencia de una cepa receptora, alrededor del 2% de la población mostró, por citometría, un patrón correspondiente a transconjugantes (figura 12B). Esta población puede contener transconjugantes donde el plásmido fue transferido a receptoras nativas, o bien que algunas donadoras carezcan de la expresión del marcador RFP. Este tema necesita ser estudiado más a fondo. El ambiente del nódulo puede incrementar la transferencia

conjugativa al proporcionar un ambiente estructurado donde la población de bacterias es muy grande, estableciendo condiciones adecuadas para que se enciendan los mecanismos que regulan la transferencia conjugativa, como *quorum sensing*, o algún otro mecanismo no descrito aún. Las plantas de frijol producen nódulos determinados, que pierden el meristemo y tienen una vida útil limitada, mientras que otras leguminosas producen nódulos indeterminados, que continúan creciendo debido a un meristemo persistente, y se dividen en diferentes zonas: crecimiento del meristemo, infección, fijación de nitrógeno y senescencia (Popp and Ott, 2011). Por lo que nos preguntamos: ¿La transferencia conjugativa puede ocurrir en ambos tipos de nódulos? Este será otro aspecto interesante para explorar. Además, dentro de los nódulos hay una mezcla de bacterias y bacteroides, la forma diferenciada de bacterias capaces de fijar nitrógeno (Gage, 2004).

En nódulos indeterminados se producen bacteroides diferenciados, mientras que en nódulos determinados no (Mergaert et al., 2006). El que bacteroides completamente diferenciados realicen transferencia conjugativa es poco probable, sin embargo, será un desafío tratar de determinar si este tipo de bacteroides con capaces de realizar transferencia conjugativa o solo esta restringido a las formas bacterianas presentes en los nódulos.

6.1.7 Perspectivas

- Analizar la transferencia conjugativa en nódulos indeterminados, debido a que en este tipo de nódulos se pueden diferenciar las distintas zonas, tanto de infección, fijación de nitrógeno y senescencia.
- Analizar la transferencia conjugativa del pRet42 a cepas endófitas de *Phaseolus vulgaris* y ver si estas cepas pueden transferir el plásmido a otras cepas incluyendo ciertas rizobiales con el objetivo de una diversificación y evolución bacteriana.

6.2 La Rizosfera de *Phaseolus vulgaris* estimula la transferencia conjugativa de pRet42a de *Rhizobium etli*.

6.2.1 La rizosfera de *Phaseolus vulgaris* tiene un rol importante en la transferencia conjugativa de pRet42a

En la sección anterior describimos que los nódulos de plantas de frijol son nichos adecuados para la transferencia conjugativa, lo que podría incidir sobre la diversificación bacteriana. Por lo tanto, en esta parte del proyecto nos centramos en determinar si la planta juega un papel importante en incrementar o disminuir la frecuencia de conjugación.

Para esto, lo que hicimos fue utilizar nuestro modelo hidropónico de plantas (figura 24) y hacer conjugación en ellas entre las cepas CFNX559 (donadora) y CFN2001 (receptora) y analizar a 1, 10 y 20 días la frecuencia de conjugación en el medio donde esta la planta y sobre la superficie de la raíz. También se analizó la transferencia en un medio sin planta, pero adicionando una fuente de carbono y nitrógeno, suplementando los nutrientes que la planta le pudiera estar proporcionando a las bacterias (figura 24A y B).

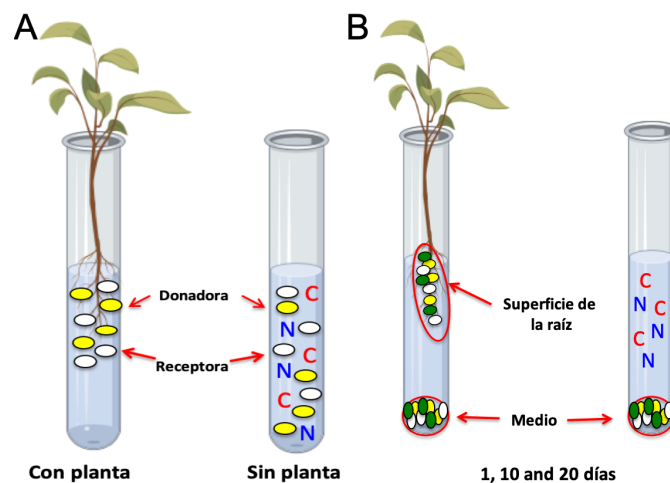


Figura 24. Modelo hidropónico de planta.

A. Representación de una planta inoculada y de un tubo (sin planta) inoculado con las cepas donadora y receptora, adicionándole una fuente de carbono y nitrógeno. B. Representación de las muestras a analizar: superficie de la raíz, medio en presencia y ausencia de planta a diferentes días (1, 10 y 20).

Resultados

Los resultados mostraron que en el medio con la planta la frecuencia de conjugación aumentó con el tiempo de manera considerable, mientras que en el medio sin planta se la frecuencia de conjugación aumenta del día 1 al 10, pero a 20 días las bacterias se mueren, probablemente debido a que los nutrientes en el medio se agotan. Finalmente, al día 1 no se detectaron bacterias adheridas a la superficie de la raíz, pero a tiempo mas largos se adhieren en gran cantidad y la frecuencia de conjugación se vio aumentada (figura 25).

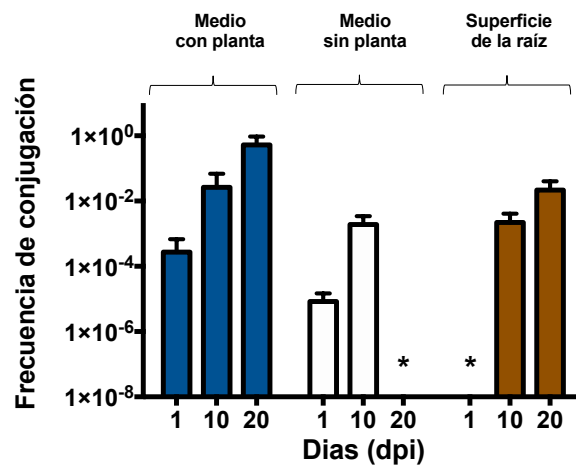


Figura 25. Transferencia de pRet42a en presencia de la planta.

Análisis de la frecuencia de conjugación en el medio con y sin planta y superficie de la raíz a diferentes días post inoculación (1, 10 y 20).

Por lo tanto, estos datos sugieren que la planta provee un mejor escenario para que se lleve a cabo la conjugación, posiblemente debido a que puede abastecer de nutrientes a las bacterias, incrementando su crecimiento, o pueda funcionar como un soporte para que se puedan adherir y llevar a cabo la conjugación, o algún compuesto afecte directamente la capacidad de conjugación.

6.2.2 Efecto de los extractos de raíz y nódulos de *Phaseolus vulgaris* sobre la frecuencia de conjugación.

Los resultados previamente descritos, donde se ve un incremento en la frecuencia de conjugación en presencia de la planta, nos llevaron a plantear si pudiera existir algún elemento que la planta esté proporcionando a las bacterias para el aumento de la frecuencia de conjugación. Para estudiar esto, se realizaron extractos de raíces y nódulos de *P. vulgaris*, se filtraron por membranas de 0.22 μm para quitar restos de material vegetal, posteriormente se realizaron conjugaciones en caja Petri (ver materiales y métodos) resuspendiendo las bacterias donadoras y receptoras en 100 μl de los extractos. Los datos muestran un incremento significativo tanto con extractos de nódulo como de raíz (figura 26). Este conjunto de datos nos sugiere que existen compuestos en la planta que pudieran estar aportando ciertos nutrientes o compuestos que activen la maquinaria de conjugación.

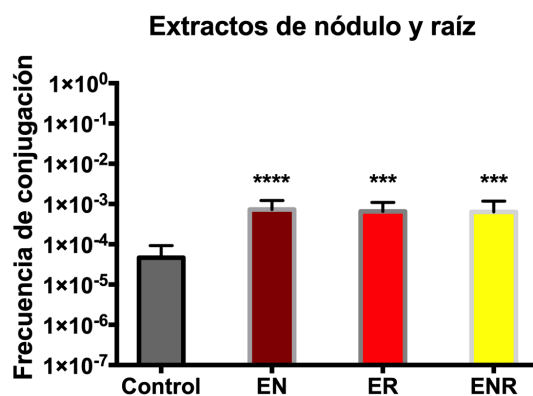


Figura 26. Análisis de la frecuencia de conjugación en presencia de extractos de nódulo y raíz.

Se realizaron conjugaciones entre la cepa CFNX559/CFN2001 (Control) en presencia de extractos de nódulo (EN), extractos de raíz (ER) y extractos de nódulo y raíz (ENR).

6.2.3 Efecto de los exudados totales de *Phaseolus vulgaris* sobre la frecuencia de conjugación

Por otra parte, decidimos analizar la frecuencia de conjugación en presencia de exudados totales de *P. vulgaris* y de *Medicago sativa* (*M. sativa*), que es otra planta leguminosa. Esto con el objetivo de ver si dichos exudados pueden ser específicos o no. Los resultados nos indican un incremento significativo en la frecuencia de conjugación en presencia de los exudados totales de frijol, sorprendentemente los exudados de *M. sativa* también tuvieron un efecto significativo (figura 27), esto puede ser debido a que el efecto esté mediado por compuestos compartidos entre diferentes leguminosas. También en este caso el efecto puede deberse a la activación directa de la maquinaria de conjugación o bien a que los exudados estén permitiendo un mejor crecimiento, debido a la cantidad de nutrientes que exudan las plantas tanto de *P. vulgaris* y *M. sativa* como azúcares, compuestos fenólicos, aminoácidos, etc.

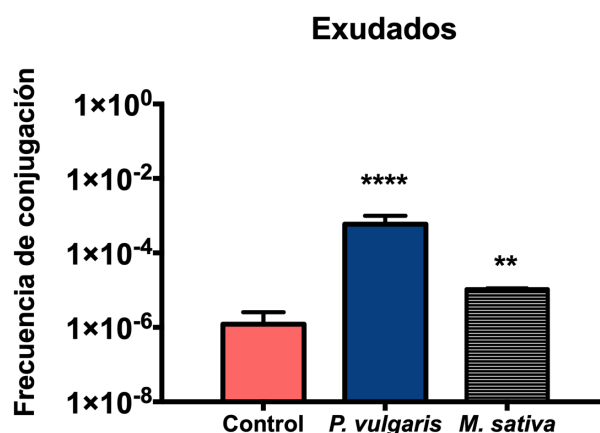


Figura 27. Análisis de la frecuencia de conjugación en presencia de exudados de *P. vulgaris* y *M. sativa*.

6.2.4 Compuestos flavonoides incrementan la frecuencia de conjugación

Con los resultados obtenidos que muestran un incremento en la frecuencia de conjugación en presencia de la planta, extractos y exudados decidimos probar distintos

flavonoides exudados por *P. vulgaris* (ver tabla 4) y hacer conjugaciones *in vitro* para ver si hay un aumento en la frecuencia de conjugación.

Tabla 4. Actividad de distintos flavonoides.

Nombre	Clase Polifenol	Sub-clase Polifenol	Actividad	Referencias
Naringenina	Flavonoide	flavonona	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce la producción de acil homoserin lactonas (HSL) in <i>Pseudomonas aeuroginosa</i> PAO1. • Antioxidante, neuroprotector y actividades anti-cáncer. • Inductor de la nodulación 	(Hungria et al., 1991; Vandeputte et al., 2011)
Genisteina	Flavonoide	Isoflavonoide	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante y actividades anti-proliferativas • Inductor de la nodulación 	(Glian'ko et al., 2009; Guajardo-Flores et al., 2013)
Quercetina	Flavonoide	Flavonoles	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad antibacterial • Antioxidante 	(Amarowicz et al., 2008; Mendoza-Sanchez et al., 2016)
Luteolina	Flavonoide	Flavonas	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos hipoglucemiantes e hipolipemiantes. • Inductor de la nodulación 	(Hartwig et al., 1990; Sidorova et al., 2017)
Apigenina	Flavonoide	Flavonas	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante y actividades antiinflamatorias, previene enfermedades neurodegenerativas • Inductor de la nodulación 	(Muñoz Aguilar et al., 1988; Salehi et al., 2019)
Ácido gálico	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad antidiabética, hipolipidémica y cardioprotectora. 	(Ombra et al., 2016)
Acetosiringona	Compuestos fenólicos		<ul style="list-style-type: none"> • Induce la virulencia de los genes de <i>Agrobacterium</i>. 	(Winans, 1991)

Resultados

Se utilizaron distintas concentraciones de los flavonoides (2, 20 y 50 μM). Sorprendentemente, como se puede ver en la figura 28A a 2 μM hay un aumento en la frecuencia de conjugación con naringenina y apigenina. Como hemos mencionado anteriormente, la naringenina es un inductor de la nodulación en *R. etli* (Hungria et al., 1991) esto debido a que es reconocido por la proteína NodD. La posible participación de naringenina en el incremento sobre la frecuencia de conjugación puede ser debida a dos cosas: la primera de ellas es que la naringenina pueda estar actuando como una señal en cascada sobre el plásmido simbiótico (pRet42d) y debido a que este plásmido además de contener su propia maquinaria de conjugación se puede cointegrar con el plásmido conjugativo (pRet42a), y de esta manera pueda ayudar a su transferencia. La segunda posibilidad es que la naringenina pueda estar influyendo sobre los genes de transferencia del plásmido conjugativo (pRet42a) sobre-expresándolos y por tal motivo vemos un incremento en la frecuencia de conjugación. Por su parte, se sabe que la apigenina es un inductor de la nodulación en *Rhizobium leguminosarum* actuando como un quimio atrayente (Muñoz Aguilar et al., 1988), y podría estar actuando de la misma manera que la naringenina. Sin embargo, a una concentración mas alta de 20 y 50 μM la frecuencia de conjugación con apigenina no se ve aumentada, pero si con naringenina (figura 28B y C). Por otra parte, hay una disminución en la frecuencia de conjugación con quercetina a 50 μM (figura 28C), que se puede deber a que a estas concentraciones pueda ser algo tóxica impidiendo el crecimiento de la bacteria y por lo tanto los eventos de conjugación. Notablemente, cuando se hace la combinación de todos los flavonoides la frecuencia de conjugación es muy similar al control esto se puede explicar a que puede haber un efecto no sinérgico en el cual flavonoides que

aumentan la frecuencia de conjugación son contrarrestados con aquellos que la disminuyen (figura 28).

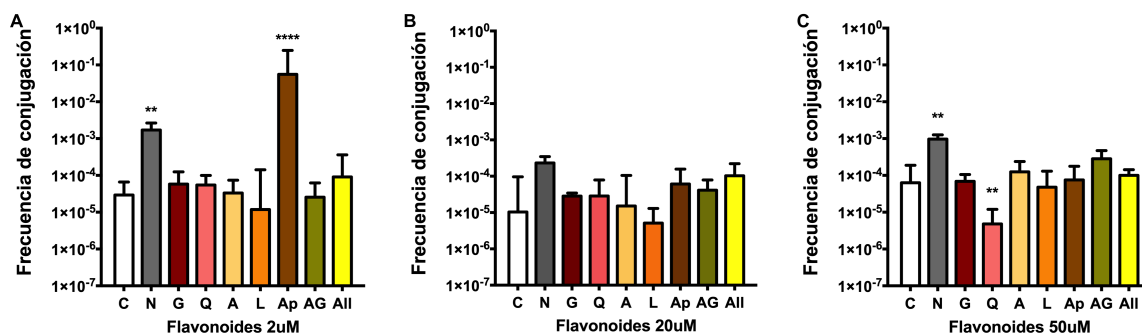


Figura 28. Análisis de la frecuencia de conjugación en presencia de flavonoides.

Se realizaron conjugaciones entre la cepa CFNX559/CFN2001 en presencia de distintas concentraciones de flavonoides 2 μM (A), 20 μM (B) y 50 μM (C).

6.2.5 Conjugación dependiente de quórum sensing en presencia de planta

Como hemos mencionado anteriormente, la transferencia del plásmido conjugativo (pret42a) es dependiente de un sistema de quórum sensing (Tun-Garrido et al., 2003). Por lo tanto, al ver un incremento en la frecuencia de conjugación por compuestos totales o individuales de la planta, queríamos saber si algún compuesto pudiera estar funcionando como una acil "homoserina lactona-like" e inducir la maquinaria de conjugación. Por lo que decidimos utilizar una cepa Tral⁻ (CFNX669), la cual es incapaz de hacer conjugación porque no puede sintetizar la homoserina lactona (Tun-Garrido et al., 2003). Como control se utilizó la cepa CFNX187, la cual tiene marcado el plásmido conjugativo con Tn5, pero sin ninguna marca fluorescente y esta cepa es capaz de realizar conjugación de manera normal. Se realizaron ensayos de conjugación en nuestro modelo de planta hidropónico con cada una de las cepas mencionadas utilizando como receptora la cepa CFN2001, y posteriormente se analizaron a distintos tiempos (1, 10 y 20 días). La figura 29 muestra que la frecuencia de conjugación con la cepa control CFNX187/CFN2001 a los distintos tiempos sigue el patrón previamente

visto, con aumento en la frecuencia de conjugación durante el tiempo. Sin embargo, con la cepa mutante CFN669/CFN2001 no detectamos conjugación a ningún tiempo. Por lo tanto, los resultados indican que la conjugación en presencia de la planta es dependiente de quórum sensing y la planta no proporciona algún elemento que pudiera encender el sistema de transferencia del plásmido conjugativo.

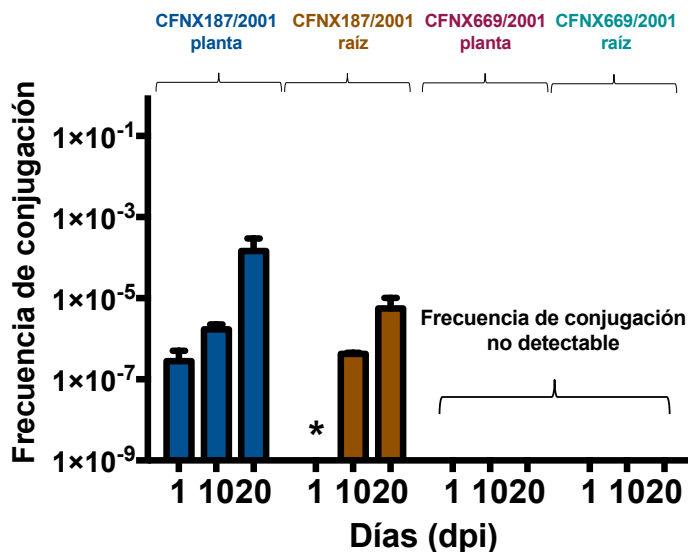


Figura 29. Análisis de la frecuencia de conjugación en planta dependiente de quorum sensing.

6.2.6 Análisis de la frecuencia de conjugación *in vitro* bajo diversas condiciones

Para identificar otros factores que pudieran aumentar o disminuir la frecuencia de conjugación, se realizaron conjugaciones *in vitro* en diversas condiciones tratando de simular a aquellas a las que están expuestas las bacterias en la naturaleza tales como: nutrientes, salinidad, temperatura, bajo nivel de oxígeno. Los resultados muestran que cuando realizamos conjugación en un medio rico en nutrientes comparado con un medio mínimo, la conjugación decrece considerablemente en esta última condición (figura 30A). Esto sugiere que cuando los nutrientes son limitantes, las células utilizan su energía en otros procesos, y no en la conjugación. Por otra parte, cuando se

realizaron conjugaciones en diversas temperaturas (20, 30 y 37°C), no se vieron cambios significativos en la frecuencia de conjugación, por lo que la temperatura no parece afectar de manera directa la conjugación (figura 30B). Sin embargo, bajo condiciones "similares" a las que prevalecen dentro del nódulo: a 1 % nivel de oxígeno, pudimos observar que la conjugación se incrementa ligeramente, lo cual apoya nuevamente nuestros experimentos del primer apartado, donde se vio que se puede llevar a cabo conjugación dentro de los nódulos (figura 30C). Finalmente, se analizó si un estrés salino pudiera estar afectando la conjugación, no obstante, los datos no muestran diferencia alguna por lo que las bacterias pueden soportar cierto nivel de estrés salino sin afectar la conjugación (figura 30D).

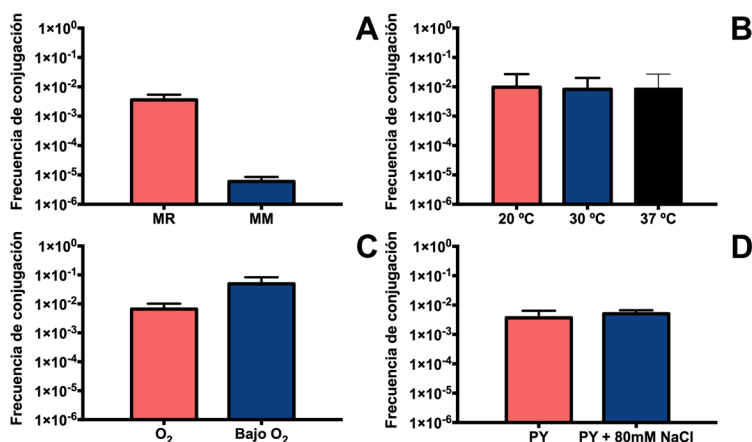


Figura 30. Análisis de la frecuencia de conjugación en diferentes condiciones.

A. Nutrientes, Temperatura. C. Bajo nivel de oxígeno D. Estrés salino.

6.2.7 Comparación de frecuencias de conjugación utilizando diferentes plantas

Con el fin de conocer si *Rhizobium etli* CFN42 es capaz de conjugarse de igual manera en presencia de otras plantas debido a la aportación de nutrientes de cada una de ellas o solamente puedan servir como un soporte para llevar a cabo la conjugación se realizaron cruces entre la cepa CFN559 y CFN2001 en presencia de dos leguminosas; frijol (*P. vulgaris*) y alfalfa (*M. sativa*) y una no leguminosa: maíz (*Zea mays*), y se

Resultados

analizaron los resultados a 1, 10 y 20 días. En la figura 31 se puede observar que la frecuencia de conjugación en presencia tanto de frijol como de alfalfa a etapas tempranas son similares, a diferencia de las plantas de maíz, donde es mas elevada, pero a tiempos mas largos 10 y 20 días la frecuencia de conjugación en las tres plantas es muy parecida.

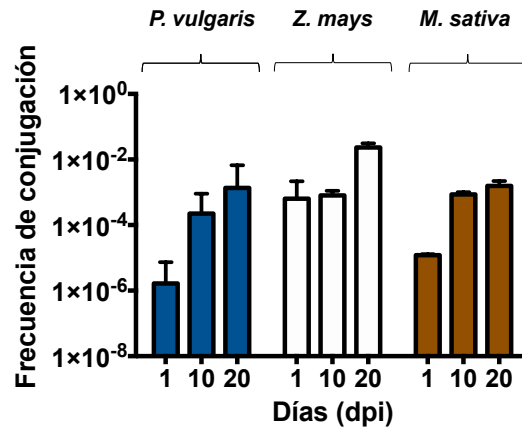


Figura 31. Análisis de la frecuencia de conjugación en medio con diferentes plantas (*P. vulgaris*, *Z. mays*, *M. sativa*).

También se analizó la frecuencia de conjugación en la superficie de la raíz debido a que la cantidad de raíces que tiene cada una de las plantas utilizadas es diferente siendo la de maíz la que mayor cantidad tiene, seguida de frijol y alfalfa, sin embargo, esto no parece influir para que se lleve a cabo la conjugación como se puede ver en la figura 32.

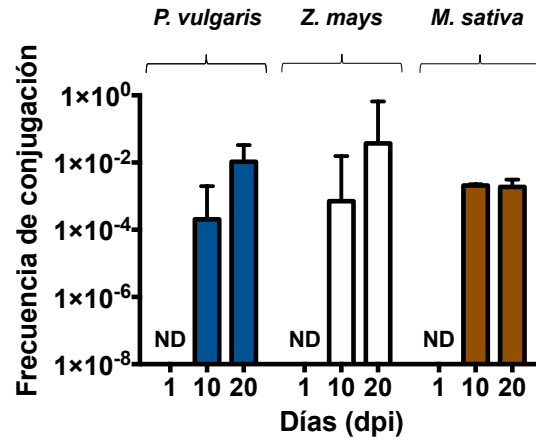


Figura 32. Análisis de la frecuencia de conjugación sobre la superficie de la raíz con diferentes plantas (*P. vulgaris*, *Z. mays*, *M. sativa*).

Esto sugiere que diferentes plantas pueden proporcionar diversos nutrientes a las bacterias, así como un soporte en el cual las bacterias se pueden adherir y llevar a cabo la conjugación.

6.2.8 Conclusiones

Resultados preliminares sugieren que la planta juega un papel afectando la conjugación bacteriana, ya que se pudo observar que ciertos compuestos tanto de extractos de nódulos y raíz, así como exudados de diversas plantas y compuestos individuales (flavonoides como naringenina, apigenina) incrementan la frecuencia de conjugación. Esto pudiera explicarse de la siguiente manera: que estos compuestos pudieran actuar como nutrientes y de esta manera las bacterias tengan un mejor crecimiento y llegar más rápido a una densidad de población que permita la activación de la maquinaria de *quorum sensing*. Otra posibilidad, es que la planta este actuando como un soporte en el cual las bacterias se puedan adherir a ella (biopelículas) y de esta manera facilitar la conjugación. Una tercera posibilidad, pudiera ser que estos compuestos estuvieran actuando de manera indirecta, es decir estuvieran activando la maquinaria de conjugación del plásmido simbiótico ya que, como se explicó, este plásmido tiene su propia maquinaria conjugativa y debido a que la mayoría de estos compuestos están relacionados a simbiosis, pudieran estar encendiendo esta maquinaria, permitiendo transferencia del pRet42a por cointegración con el pSim. Por otra parte, la transferencia de pRet42a en presencia de la planta es dependiente de *quorum sensing* y no parece que algún compuesto de la planta pueda estar actuando de manera similar a una acilhomoserina lactona. Las distintas posibilidades no son excluyentes.

6.2.9 Perspectivas

- Determinar el nivel de expresión de los genes de la maquinaria de transferencia *traA*, *tral* en vida libre y en condiciones simbióticas para ver si estos genes de cierta manera están relacionados y activan la maquinaria de transferencia en presencia de los distintos compuestos que incrementan la conjugación.
- Analizar si el pSim ayuda al plásmido conjugativo a su transferencia, utilizando una cepa que no tenga el pSim y midiendo la frecuencia de conjugación en las diferentes condiciones.

6.3 Transferencia del plásmido simbiótico dentro de los nódulos de raíces de frijol

6.3.1 Condiciones o compuestos de nódulos de frijol encienden la maquinaria de transferencia del plásmido simbiótico

El plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* (pRet42d) tiene la mayoría de los genes para realizar simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Como se mencionó en la Introducción, este plásmido se puede transferir a otras bacterias por dos mecanismos muy específicos. El primero de ellos es por cointegración con el plásmido conjugativo (pRet42a) y el segundo es utilizando los genes de transferencia localizados en el plásmido simbiótico, que están regulados por el sistema RctA/RctB. Como hasta el momento no se ha encontrado ninguna condición ambiental que induzca este sistema, el interés de este trabajo es poder determinar si en condiciones de simbiosis se puede activar la transferencia del plásmido simbiótico utilizando el sistema RctA/RctB. Por lo que se hizo una construcción utilizando una derivada de *Rhizobium etli* que carece del plásmido pRet42a, con el objetivo de que el plásmido simbiótico no se pueda cointegrar con este y la única posibilidad de transferencia sea utilizando su propia maquinaria. A esta cepa se le marcó el plásmido simbiótico con la proteína verde fluorescente (GFP) y el cromosoma con la proteína roja fluorescente (RFP) (ver materiales y métodos). Se hicieron ensayos de conjugación *in vitro* utilizando como receptora a la cepa CFN2001, los cuales mostraron que no había conjugación, como se esperaba. Posteriormente, realizamos la misma conjugación en nuestro modelo de planta hidropónico y analizamos la frecuencia de conjugación a tiempos entre 15-20 días en el medio donde estaba la planta, superficie de la raíz y en nódulos. Los resultados por microscopia de fluorescencia mostraron que en la superficie de la raíz no se encontraron transconjugantes (figura 33A), mientras que en los nódulos si pudieron detectarse (figura 33B).

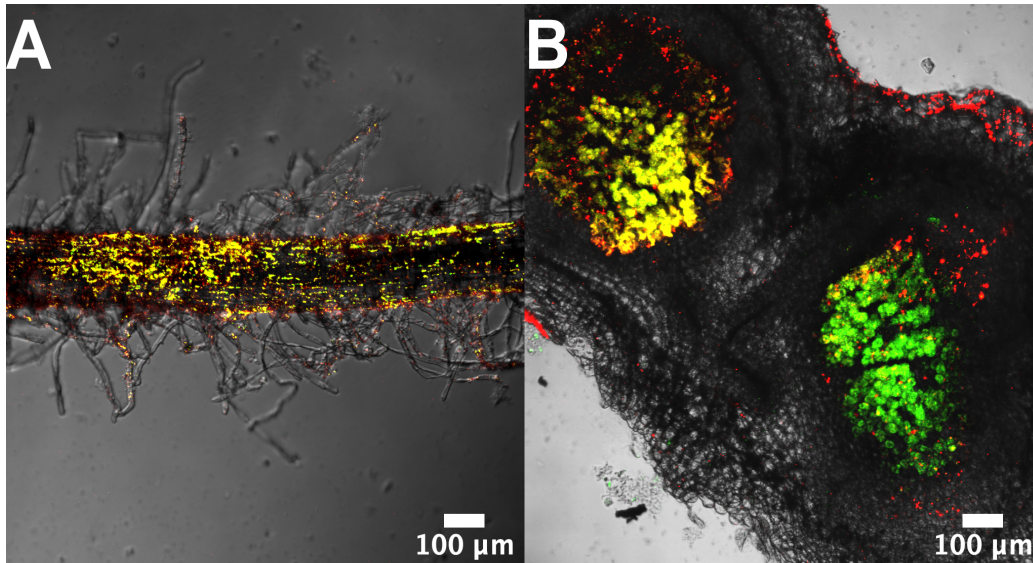


Figura 33. Transferencia del plásmido simbiótico en nódulos.

A. Bacterias adheridas a la superficie de la raíz. B. Corte de nódulo en el cual se observa un nódulo poblado en su mayoría por la cepa donadora (parte superior) y otro nódulo en su totalidad por transconjugantes (parte inferior).

También se recuperaron las bacterias del medio, superficie de la raíz y nódulos y se analizaron por cuentas viables para medir la frecuencia de conjugación y por citometría de flujo. Los resultados de la frecuencia de conjugación muestran que la transferencia del plásmido simbiótico solo ocurre en el nódulo mas no así en el medio donde estaba la planta o superficie de la raíz (figura 34).

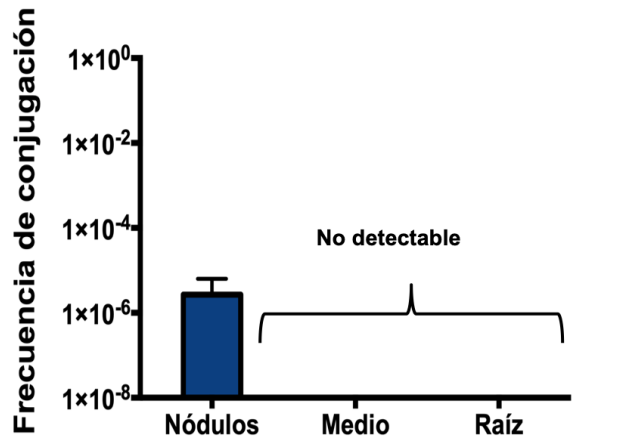


Figura 34. Análisis de la frecuencia de conjugación del plásmido simbiótico en nódulos medio y raíz.

Estos datos fueron comprobados por los análisis de citometría de flujo (figura 35). Como se puede observar en la figura 35A hay una población de alrededor del 10% de transconjugantes dentro del nódulo, pero no en el medio o superficie de la raíz (figura 35 B y C).

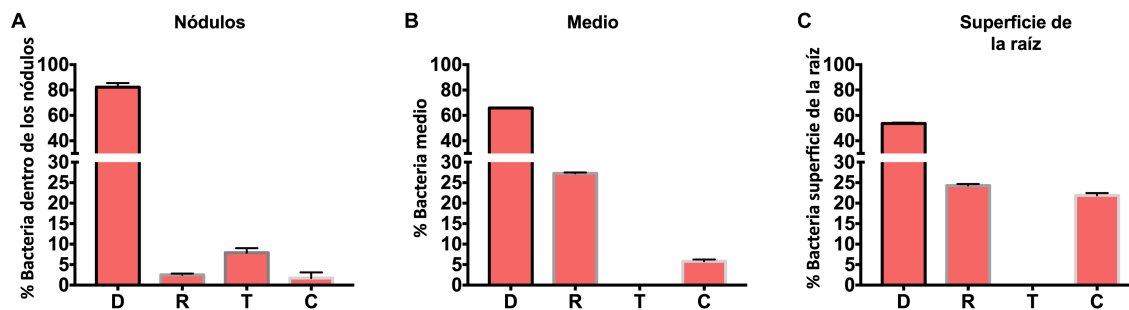


Figura 35. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas en distintas partes de la planta entre las cepas que pRet42d::GFP/ch::RFP vs CFN2001.

Estos resultados nos indican que en los nódulos de frijol existe alguna condición o compuesto capaz de inducir el sistema de transferencia regulado por Rcta/RctB. y no así en la superficie de la raíz de la planta ni en el medio donde se encuentra. Una posibilidad es que sean las condiciones microaeróbicas en las que se encuentra el nódulo y esta podría ser la condición que este encendiendo el sistema.

6.3.2 Transferencia del plásmido simbiótico a receptoras nativas dentro de los nódulos de raíces de frijol

Actualmente es muy conocido que existe un grupo diverso de bacterias endófitas que habitan en las semillas de leguminosas, las cuales se han recuperado de diversas partes de la planta (semilla, superficie de la raíz, nódulos) (Mora et al., 2014; Lopez et al., 2018). Por lo tanto, con el antecedente de que el plásmido simbiótico se puede transferir dentro del nódulo, nos propusimos determinar si el plásmido simbiótico se puede transferir a cepas endófitas que habitan en el nódulo. Utilizando nuestro modelo hidropónico de plantas, se inocularon plantas solo con una cepa derivada de *Rhizobium etli*, que tiene marcado el plásmido simbiótico pRet42d con GFP y cromosoma RFP, pero carece de plásmido conjugativo, sin inocular ninguna cepa receptora. Después de 20 días se analizaron por microscopia de fluorescencia las raíces y nódulos, las cuales muestran algunas posibles transconjugantes en el nódulo (figura 36A) y no así sobre la superficie de la raíz (figura 36B).

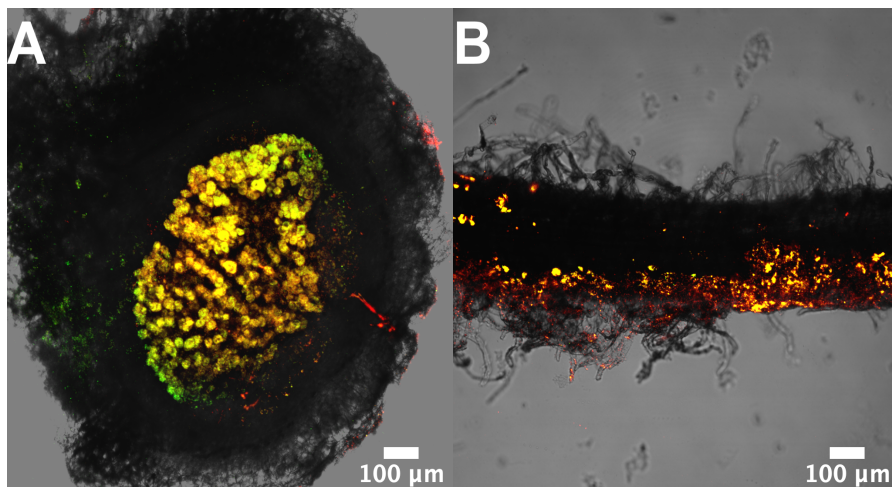


Figura 36. Transferencia del plásmido simbiótico a posibles endófitas dentro de los nódulos.

A. Corte de nódulo en el cual se observa un nódulo poblado en su mayoría por la cepa donadora (amarillo) y una pequeña cantidad de transconjugantes (verde). B. Bacterias adheridas a la superficie de la raíz.

Resultados

Posteriormente se extrajeron bacterias de estos nódulos y se analizaron por citometría de flujo, también se analizaron las bacterias adheridas a la superficie de la raíz y del medio donde estaba la planta. Utilizando este método, solo se encontraron transconjugantes en la población aislada de nódulos, y no en el medio o superficie de la raíz, a pesar de que recuperamos una gran cantidad de posibles endófitas (figura 37).

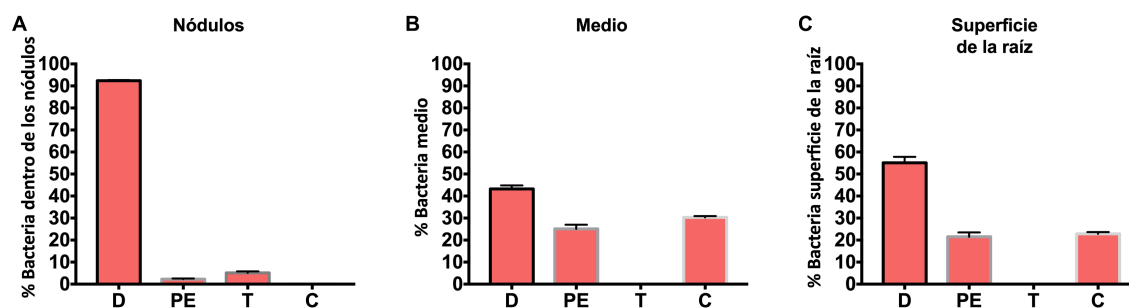


Figura 37. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones aisladas en distintas partes de la planta entre las cepas que pRet42d::GFP/ch::RFP vs posibles endófitas (PE).

Finalmente, las bacterias recuperadas de los nódulos se plaquearon en distintos medios (*Pseudomonas* Isolation Agar (PIA), *Pseudomonas* Agar Pyocyanin (PAP), medio PY sin calcio) para recuperar aquellas bacterias que pudieron haber adquirido el plásmido simbiótico. Obtuvimos 80 aislados de diferentes réplicas biológicas. De estos 80 aislados hemos analizado 25 a los cuales se les extrajo DNA y se hicieron reacciones de PCR contra GFP (4 amplificaron) y *nifH* (5 amplificaron), para ver si contenían los genes. Además, se analizaron estos aislados por fluorescencia para ver la expresión de la GFP y finalmente se mandaron a secuenciar 11 aislados para identificar los genes 16S y *gyrB*. Como se puede observar en la Tabla 5, hay una posible transconjugante de *Bacillus megaterium*, que contiene secuencias adquiridas posiblemente del pRet42d.

Tabla 5. Secuenciación e identificación de diversas cepas endófitas.

Grupo taxonómico	Clase-phyllum	Familia	Evidencia molecular (gen)	% cobertura e identidad (blastn)	E-value	Amplificación GFP	Amplificación <i>nifH</i>
<i>Brevundimonas diminuta</i> (strain ATCC(B) 19146)	Proteobacteria – Alphaproteobacteria	Caulobacteraceae	<i>gyrB</i>	99% 86.63%	0	NO	SI
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> Unidentified	Proteobacteria - Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>gyrB</i>	98% 94.16%	3E-167	NO	SI
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Proteobacteria – Gammaproteobacteria	Xanthomonadaceae	None	100% 99.57%	0	SI	NO
<i>Pandoraea norimbergensis</i> (strain DSM 11628, complete genome)	Proteobacteria – Betaproteobacteria	Burkholderiaceae	16s RNA	100% 99.57%	0	SI	NO
<i>Bacillus megaterium</i> (NBRC 15308 = ATCC 14581 chromosome, complete genome)	Firmicutes - Bacilli	Bacillaceae	16s RNA	100% 98.64%	0	SI	SI
<i>Achromobacter pulmonis</i> (strain P13-03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	Proteobacteria – Betaproteobacteria	Alcaligenaceae	16s RNA	99% 99.89%	0	SI (No específico)	SI (No específico)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Proteobacteria – Alphaproteobacteria	Brucellaceae	<i>gyrB</i>	100% 99.75%	0	NO	SI (No específico)
<i>Aminobacter aminovorans</i> (strain KCTC 2477)-	Proteobacteria – Alphaproteobacteria	Phyllobacteriaceae	<i>gyrB</i>	98% 83.25% - 97% 83.29%	0	NO	SI (No específico)
<i>Mesorhizobium oceanicum</i> (strain B7)	Proteobacteria – Gammaproteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>gyrB</i>	100% 99.47%	0	NO	NO
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Proteobacteria – Gammaproteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>gyrB</i>	99% 98.24%	0	NO	NO

6.3.3 Conclusiones

Datos preliminares en este trabajo muestran transferencia de pRet42d dentro de los nódulos bajo su propio sistema de conjugación (RctA/RctB). Este sistema se puede estar encendiendo por algún compuesto o señal proveniente de los nódulos ya que sobre la superficie de la raíz o en el medio no se detectó transferencia. Identificar la posible señal o compuesto que este activando este sistema seria una gran aportación debido que hasta el momento se desconoce.

Además, plantas inoculadas solamente con la cepa donadora, sin ninguna receptora, muestran la transferencia de pRet42d a posibles bacterias endófitas de *Phaseolus vulgaris*.

6.3.4 Perspectivas

- Determinar si genes involucrados en la regulación de la fijación de nitrógeno, tales como NifA participan en la activación del sistema de transferencia del plásmido simbiótico, utilizando derivadas con NifA inactivado o sobre expresado
- Medir los niveles de expresión de los genes *rctB*, *rctA*, *traA*, *virB* en condiciones de simbiosis, vida libre, alto y bajo nivel de oxígeno.

7. Referencias

1. Achtman, M., Kennedy, N., and Skurray, R. (1977) Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of traT protein in surface exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5104-5108.
2. Amarowicz, R., Dykes, G.A., and Pegg, R.B. (2008) Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia* **79**: 217-219.
3. Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type lii. *J Exp Med* **79**: 137-158.
4. Bañuelos-Vazquez, L.A., Torres Tejerizo, G., and Brom, S. (2017) Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements. *Plasmid* **91**: 82-89.
5. Beijerinck, M.W. (1888) Die Bacterien der Papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung, November 16*, **46**: 725 - 734, 741 - 750, 757 - 772, 781 - 790, 797 - 804.
6. Beynon, J.L., Beringer, J. E., Johnston, A. W. B. (1980) Plasmids and Host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *Journal of General Microbiology* **120**: 421-429.
7. Bramhachari, P.V. (2018) Quorum Sensing Mechanisms in Gram Positive Bacteria. In *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*. Singapore: Springer Nature Singapore.

Referencias

8. Brom, S., Pistorio, M., Romero, D., and Torres Tejerizo, G. (2014) Boundaries for Conjugative Transfer of Rhizobial Plasmids: Restraining and Releasing Factors. In *Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria*. Katsy, E.I. (ed). New York: Springer Science+Business Media., pp. 43-54.
9. Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., and Romero, D. (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**: 34-43.
10. Brom, S., García de los Santos, A., de Lourdes Girard, M., Dávila, G., Palacios, R., and Romero, D. (1991) High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. *J Bacteriol* **173**: 1344-1346.
11. Brom, S., Girard, L., García-de los Santos, A., Sanjuán-Pinilla, J.M., Olivares, J., and Sanjuán, J. (2002) Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2555-2561.
12. Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J Bacteriol* **174**: 5183-5189.
13. Brom, S., Girard, L., Tun-Garrido, C., García-de los Santos, A., Bustos, P., González, V., and Romero, D. (2004) Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**: 7538-7548.
14. Cárdenas, L., and Quinto, C. (2008) Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors. *Plant Signal Behav* **3**: 1101-1102.

Referencias

15. Cárdenas, L., Feijo, J.A., Kunkel, J.G., Sanchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P.K., and Quinto, C. (1999) Rhizobium nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J* **19**: 347-352.
16. Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T.L., Sanchez, F., Quinto, C., Feijo, J.A., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol* **123**: 443-452.
17. Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J., Spaink, H.P. et al. (1995) Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* **29**: 453-464.
18. Cervantes, L., Bustos, P., Girard, L., Santamaría, R.I., Dávila, G., Vinuesa, P. et al. (2011) The conjugative plasmid of a bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain is assembled from sequences of two *Rhizobium* plasmids and the chromosome of a *Sinorhizobium* strain. *BMC Microbiol* **11**: 149.
19. Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Eberl, L., Moller, S., Givskov, M., and Molin, S. (1998) Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2247-2255.
20. Dagan, T., and Martin, W. (2009) Getting a better picture of microbial evolution en route to a network of genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 2187-2196.
21. Danino, V.E., Wilkinson, A., Edwards, A., and Downie, J.A. (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**: 511-525.

Referencias

22. De Meyer, S.E., De Beuf, K., Vekeman, B., and Willems, A. (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry* **83**: 1-11.
23. Ding, H., and Hynes, M.F. (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can J Microbiol* **55**: 917-927.
24. Ding, H., Yip, C.B., and Hynes, M.F. (2013) Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM. *J Bacteriol* **195**: 328-339.
25. Dombrecht, B., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2001) Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 426-430.
26. Doolittle, W.F. (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* **284**: 2124-2129.
27. Downie, J.A. (2014) Legume nodulation. *Curr Biol* **24**: R184-190.
28. Dudeja, S.S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., and Kothe, E. (2012) Interaction of endophytic microbes with legumes. *J Basic Microbiol* **52**: 248-260.
29. Dunny, G.M., Brown, B.L., and Clewell, D.B. (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3479-3483.
30. Eckhardt, T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
31. Egland, P.G., Pelletier, D.A., Dispensa, M., Gibson, J., and Harwood, C.S. (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6484-6489.

Referencias

32. Fahraeus, G. (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* **16**: 374-381.
33. Fay, P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev* **56**: 340-373.
34. Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.
35. Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L., and Hirsch, A.M. (2006) Investigations of Rhizobium biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 195-206.
36. Fujishige, N.A., Lum, M.R., De Hoff, P.L., Whitelegge, J.P., Faull, K.F., and Hirsch, A.M. (2008) Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol* **67**: 504-515.
37. Fuqua, W.C., and Winans, S.C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796-2806.
38. Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
39. Gage, D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.
40. Glian'ko, A.K., Vasil'eva, G.G., Mitanova, N.B., and Ishchenko, A.A. (2009) [The influence of mineral nitrogen on legume-rhizobium symbiosis]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*: 302-312.

Referencias

41. Golden, J.W., Robinson, S.J., and Haselkorn, R. (1985) Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* **314**: 419-423.
42. Gonzalez, J.E., and Marketon, M.M. (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 574-592.
43. Gonzalez, V., Santamaria, R.I., Bustos, P., Hernandez-Gonzalez, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G. et al. (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3834-3839.
44. Griffith, F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**: 113-159.
45. Griffiths, A., Wesler, S., Lewontin, R., Gelbart, W., Suzuki, D., and Miller, J. (2000) Bacterial conjugation. In *An Introduction to Genetic Analysis*. Freeman, W.H. (ed). New York, pp. 155-165.
46. Guajardo-Flores, D., Serna-Saldivar, S.O., and Gutierrez-Urbe, J.A. (2013) Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* **141**: 1497-1503.
47. Haber, F. (1923) The Haber Process. *Nature* **111**: 101-102.
48. Hall, J.P., Wood, A.J., Harrison, E., and Brockhurst, M.A. (2016) Source-sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 8260-8265.

Referencias

49. Hartwig, U.A., Maxwell, C.A., Joseph, C.M., and Phillips, D.A. (1990) Chrysoeriol and Luteolin Released from Alfalfa Seeds Induce nod Genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **92**: 116-122.
50. Hellriegel, H., and Wilfarth, H. (1886) Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote. *Tageblatt der 59 Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte in Berlin 18-24 Sept.*
51. Herrera-Cervera, J., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H., Requena, N., Amarger, N. et al. (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 87-97.
52. Heuer, H., and Smalla, K. (2012) Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 1083-1104.
53. Higashi, S. (1967) Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *The Journal of General and Applied Microbiology* **13**: 391-403.
54. Hirsch, P., R. (1979) Plasmid-determined Bacteriocin Production by *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **113**: 219-228.
55. Hooykaas, P.J.J., Van Brussel, A.A.N., den Dulk-Ras, H., Van Slogteren, G.M.S., and Schilperoort, R.A. (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **291**: 351-353.
56. Hungria, M., Joseph, C.M., and Phillips, D.A. (1991) *Rhizobium nod* Gene Inducers Exuded Naturally from Roots of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* **97**: 759-764.

Referencias

57. Hynes, M.F., and McGregor, N.F. (1990) Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* **4**: 567-574.
58. Johnston, A.W., Beynon, J., Buchanan-Wollaston, A., Setchel, S., Hirsch, P., and Beringer, J. (1978) High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. . *Nature* **276**: 634-636.
59. Johnston, A.W.B., and Beringer, J.E. (1975) Identification of the rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers. *Journal of General Microbiology* **87**: 343-350.
60. Kandemir, T., Schuster, M.E., Senyshyn, A., Behrens, M., and Schlogl, R. (2013) The Haber-Bosch process revisited: on the real structure and stability of "ammonia iron" under working conditions. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**: 12723-12726.
61. Klumper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., and Smets, B.F. (2015) Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME J* **9**: 934-945.
62. Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C.E., Broughton, W.J., and Banfalvi, Z. (1982) Mobilization of a *Rhizobium meliloti* Megaplasmid Carrying Nodulation and Nitrogen Fixation Genes into Other Rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet* **188**: 433-439.
63. Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.

64. Lacroix, B., and Citovsky, V. (2016) A Functional Bacterium-to-Plant DNA Transfer Machinery of *Rhizobium etli*. *PLoS Pathog* **12**: e1005502.
65. Lederberg, J., and Tatum, E.L. (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558.
66. Leemans, J., Soberón, G., Cevallos, M.A., Fernández, L., Pardo, M.A., and de la Vega, H. (1984) General organization in *R. phaseoli* nif plasmids. In C Veeger and W E Newton (ed), *Advances in nitrogen fixation research Nijhoff-Junk-Pudoc, The Hague, The Netherlands*: 710.
67. Leite, J., Fischer, D., Rouws, L.F., Fernandes-Junior, P.I., Hofmann, A., Kublik, S. et al. (2016) Cowpea Nodules Harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. *Front Plant Sci* **7**: 2064.
68. Ling, J., Wang, H., Wu, P., Li, T., Tang, Y., Naseer, N. et al. (2016) Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 13875-13880.
69. Lohrke, S.M., Orf, J.H., Martinez-Romero, E., and Sadowsky, M.J. (1995) Host-Controlled Restriction of Nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* Strains in Serogroup 110. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2378-2383.
70. Lopez, J.L., Alvarez, F., Principe, A., Salas, M.E., Lozano, M.J., Draghi, W.O. et al. (2018) Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *J Biotechnol* **267**: 55-62.
71. López-Fuentes, E., Torres-Tejerizo, G., Cervantes, L., and Brom, S. (2015) Genes encoding conserved hypothetical proteins localized in the conjugative

- transfer region of plasmid pRet42a from *Rhizobium etli* CFN42 participate in modulating transfer and affect conjugation from different donors. *Front Microbiol* **5**: 793.
72. Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., and Chen, Y. (2017) Co-existence of Rhizobia and Diverse Non-rhizobial Bacteria in the Rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* Seedlings Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-Like Strains. *Front Microbiol* **8**: 2255.
73. Luo, Z.Q., Qin, Y., and Farrand, S.K. (2000) The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J Biol Chem* **275**: 7713-7722.
74. Ma, H., and Bryers, J.D. (2013) Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 317-328.
75. Martínez-Hidalgo, P., and Hirsch, A.M. (2017) The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes* **1**: 70-82.
76. Martínez-Romero, E., and Caballero-Mellado, J. (1996) *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci* **15**: 113-140.
77. Martínez-Salazar, J.M., and Romero, D. (2000) Role of the *ruvB* gene in homologous and homeologous recombination in *Rhizobium etli*. *Gene* **243**: 125-131.
78. McAnulla, C., Edwards, A., Sánchez-Contreras, M., Sawers, R.G., and Downie, J.A. (2007) Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid

Referencias

- transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiology* **153**: 2074-2082.
79. Mendoza-Sanchez, M., Guevara-Gonzalez, R.G., Castano-Tostado, E., Mercado-Silva, E.M., Acosta-Gallegos, J.A., Rocha-Guzman, N.E., and Reynoso-Camacho, R. (2016) Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. *Food Chem* **212**: 128-137.
80. Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O. et al. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5230-5235.
81. Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
82. Monchy, S., Benotmane, M.A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., and Mergeay, M. (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol* **189**: 7417-7425.
83. Mora, Y., Díaz, R., Vargas-Lagunas, C., Peralta, H., Guerrero, G., Aguilar, A. et al. (2014) Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5644-5654.
84. Mukesh Sharma, Pinki Dangi, and Choudhary, M. (2014) Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **3**: 801-832.

Referencias

85. Muñoz Aguilar, J.M., Ashvy, A.M., Loake, G.J., Watson, M.D., and Shaw, C.H. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *Journal of General Microbiology* **134**: 2741-2746.
86. Musovic, S., Oregaard, G., Kroer, N., and Sorensen, S.J. (2006) Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6687-6692.
87. Musovic, S., Klumper, U., Dechesne, A., Magid, J., and Smets, B.F. (2014) Long-term manure exposure increases soil bacterial community potential for plasmid uptake. *Environ Microbiol Rep* **6**: 125-130.
88. Nealson, K.H., and Hastings, J.W. (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**: 496-518.
89. Newcomb, W., and Wood, S.M. (1987) Morphogenesis and fine structure of *Frankia* (Actinomycetales): the microsymbiont of nitrogen-fixing actinorhizal root nodules. *Int Rev Cytol* **109**: 1-88.
90. Ombra, M.N., d'Acierno, A., Nazzaro, F., Riccardi, R., Spigno, P., Zaccardelli, M. et al. (2016) Phenolic Composition and Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Extracts of Twelve Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Endemic Ecotypes of Southern Italy before and after Cooking. *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 1398298.
91. Papenfort, K., and Bassler, B.L. (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**: 576-588.

Referencias

92. Pawlowski, K., and Bergman, B. (2007) Plant Symbioses with Frankia and Cyanobacteria. In *Biology of the Nitrogen Cycle*. Hermann Bothe, Stuart J. Ferguson, a., and Newton, W.E. (eds): Elsevier Science, pp. 165-178.
93. Peralta, H., Mora, Y., Salazar, E., Encarnación, S., Palacios, R., and Mora, J. (2004) Engineering the nifH promoter region and abolishing poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in Rhizobium etli enhance nitrogen fixation in symbiosis with Phaseolus vulgaris. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3272-3281.
94. Pérez-Mendoza, D., Sepúlveda, E., Pando, V., Muñoz, S., Nogales, J., Olivares, J. et al. (2005) Identification of the rctA gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol* **187**: 7341-7350.
95. Piper, K.R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. (1993) Conjugation factor of Agrobacterium tumefaciens regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.
96. Pistorio, M., Torres Tejerizo, G.A., Del Papa, M.F., Giusti Mde, L., Lozano, M., and Lagares, A. (2013) rptA, a novel gene from Ensifer (Sinorhizobium) meliloti involved in conjugal transfer. *FEMS Microbiol Lett* **345**: 22-30.
97. Popp, C., and Ott, T. (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 458-467.
98. Pretorius-Güth, I.M., Pühler, A., and Simon, R. (1990) Conjugal Transfer of Megaplasmid 2 between Rhizobium meliloti Strains in Alfalfa Nodules. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2354-2359.

Referencias

99. Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., and , and Palacios, R. (1982) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* **229**: 724-726.
100. Quinto, C., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., Montiel, J., Arthikala, M.K., Nava, N., and Santana, O. (2014) The symbiosis between *Phaseolus vulgaris* and rhizobia. *Legume Perspectives* **2**: 35-37.
101. Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., and Mobasheri, H. (2016) Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Mol Biol Res Commun* **5**: 257-261.
102. Ramsay, J.P., Hynes, M.F., Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (2017) Symbiosis Islands. In *Reference Module in Life Sciences*: Elsevier, pp. 598-600.
103. Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Jambari, N., Ortori, C.A., Heeb, S., Williams, P. et al. (2009) A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol Microbiol* **73**: 1141-1155.
104. Robson, R.L., and Postgate, J.R. (1980) Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu Rev Microbiol* **34**: 183-207.
105. Romero, D., and Brom, S. (2004) The symbiotic plasmids of the Rhizobiaceae. In *Plasmid Biology*. Phillips, G., and Funnell, B. (eds). Washington, DC.: ASM Press, , pp. 271–290.
106. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kregiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A. et al. (2019) The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int J Mol Sci* **20**.

Referencias

107. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
108. Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
109. Segura, D., and Espin, G. (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* ptsP affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **180**: 4790-4798.
110. Sepúlveda, E., Pérez-Mendoza, D., Ramírez-Romero, M.A., Soto, M.J., López-Lara, I.M., Geiger, O. et al. (2008) Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **190**: 4189-4197.
111. Shevchuk, N.A., Bryksin, A.V., Nusinovich, Y.A., Cabello, F.C., Sutherland, M., and Ladisch, S. (2004) Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* **32**: e19.
112. Shintani, M., Matsui, K., Inoue, J., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A. et al. (2014) Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **80**: 138-145.
113. Sidorova, Y., Shipelin, V., Mazo, V., Zorin, S., Petrov, N., and Kochetkova, A. (2017) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Vaccinium myrtillus* L. leaf and *Phaseolus vulgaris* L. seed coat extracts in diabetic rats. *Nutrition* **41**: 107-112.

Referencias

114. Simon, R., Prierer, U., and , and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
115. Smillie, C., Garcillan-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., and de la Cruz, F. (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 434-452.
116. Snyder L, Peters JE, Henkin TM, and W, C. (2013) "Lysogeny: the λ Paradigm and the Role of Lysogenic Conversion in Bacterial Pathogenesis". In *Molecular Genetics of Bacteria*. Press, A. (ed). Washington, DC, pp. 340-343.
117. Stein, L.Y., and Klotz, M.G. (2016) The nitrogen cycle. *Curr Biol* **26**: R94-98.
118. Stewart, W.D. (1969) Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **172**: 367-388.
119. Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., and Nowak, J. (1997) Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fertil Soils* **25**: 13-19.
120. Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5145-5149.
121. Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B., and Ronson, C.W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8985-8989.
122. Thierauf, A., Perez, G., and Maloy, A.S. (2009) Generalized transduction. *Methods Mol Biol* **501**: 267-286.

Referencias

123. Thomas, C.M., and Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711-721.
124. Torres Tejerizo, G., Bañuelos, L.A., Cervantes, L., Gaytán, P., Pistorio, M., Romero, D., and Brom, S. (2015) Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J Microbiol Methods* **117**: 155-163.
125. Torres Tejerizo, G., Pistorio, M., Althabegoiti, M.J., Cervantes, L., Wibberg, D., Schluter, A. et al. (2014) Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS Microbiol Ecol* **88**: 565-578.
126. Tsyganov, V.E., Voroshilova, V.A., Herrera-Cervera, J.A., Sanjuan-Pinilla, J.M., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A. et al. (2003) Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum*. *New Phytologist* **159**: 521-530.
127. Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V., and Brom, S. (2003) Conjugative transfer of p42a from rhizobium etli CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**: 1681-1692.
128. Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stevigny, C., Duez, P., Rajaonson, S. et al. (2011) The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **157**: 2120-2132.
129. Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.

130. Weinstein, M., Roberts, R.C., and Helinski, D.R. (1992) A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in planta inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. *J Bacteriol* **174**: 7486-7489.
131. Westhoek, A., Field, E., Rehling, F., Mulley, G., Webb, I., Poole, P.S., and Turnbull, L.A. (2017) Policing the legume-Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. *Sci Rep* **7**: 1419.
132. Wetzel, M.E., Asenstorfer, R.E., Tate, M.E., and Farrand, S.K. (2018) Quorum-dependent transfer of the opine-catabolic plasmid pAoF64/95 is regulated by a novel mechanism involving inhibition of the TraR antiactivator TraM. *MicrobiologyOpen*: e00625.
133. Winans, S.C. (1991) An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Mol Microbiol* **5**: 2345-2350.
134. Xu, G., Fan, X., and Miller, A.J. (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 153-182.
135. Zinder, N.D., and Lederberg, J. (1952) Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* **64**: 679-699.

8. Anexo, Artículos

Bañuelos-Vazquez, L.A. Cervantes-De la, L. Girard, L. Romero, D. Brom, S. 2019. **Conjugative transfer between *Rhizobium etli* endosymbionts inside the root nodule** *Environmental Microbiology*, Apr 29.

Bañuelos-Vazquez, L.A. Torres-Tejerizo, G. Brom, S. 2017. **Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements** *Plasmid*, 91, 82-89.

Torres-Tejerizo, G. **Bañuelos, L.A.** Cervantes, L. Gaytan, P. Pistorio, M. Romero, D. Brom, S. 2015. **Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia** *Journal of Microbiological Methods*, 117, 155-163.

Conjugative transfer between *Rhizobium etli* endosymbionts inside the root nodule

Luis Alfredo Bañuelos-Vazquez,¹
Gonzalo Torres Tejerizo,^{1†}
Laura Cervantes-De La Luz,¹ Lourdes Girard,²
David Romero¹ and Susana Brom^{1*}

¹Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

²Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Summary

Since the discovery that biological nitrogen fixation ensues in nodules resulting from the interaction of rhizobia with legumes, nodules were thought to be exclusive for hosting nitrogen-fixing and plant growth promoting bacteria. In this work, we uncover a novel function of nodules, as a niche permissive to acquisition of plasmids via conjugative transfer. We used *Rhizobium etli* CFN42, which nodulates *Phaseolus vulgaris*. The genome of *R. etli* CFN42 contains a chromosome and six plasmids. pRet42a is a conjugative plasmid regulated by Quorum-Sensing (QS), and pRet42d is the symbiotic plasmid. Here, using confocal microscopy and flow cytometry, we show that pRet42a transfers on the root's surface, and unexpectedly, inside the nodules. Conjugation still took place inside nodules, even when it was restricted on the plant surface by placing the QS *tral* regulator under the promoter of the nitrogenase gene, which is only expressed inside the nodules, or by inhibiting the QS transcriptional induction of transfer genes with a *traM* antiactivator on an unstable vector maintained on the plant surface and lost inside the nodules. These results conclusively confirm the occurrence of conjugation in these structures, defining them as a protected environment for bacterial diversification.

Introduction

Rhizobia are gram-negative bacteria known for their ability to establish nitrogen-fixing symbiotic relationships with the roots of leguminous plants. The crucial experiments showing that bacteria located inside the nodules were fixing atmospheric N₂ and providing it to the plants were published by Hellriegel and Wilfarth (1886) and Beijerinck (1888). Since then, numerous studies have been performed to better understand the legume-bacteria symbiosis. Briefly, the nodulation process is as follows: the plant secretes flavonoid compounds, which are specifically recognized by the bacteria and in response to them, they synthesize the Nod Factors, which induce curling of the root hair, formation of the infection thread, and division of the cortical cells to form the nodular structure. Bacteria trapped in the curled root hairs penetrate the plant through the infection thread and then are released into the nodules, where they differentiate into nitrogen-fixing bacteroids (Gage, 2004; Quinto *et al.*, 2014). The general view has been that the plant benefits from this association by receiving fixed nitrogen, while the bacteria receive other nutrients, mainly carbon sources (Haag *et al.*, 2013; Westhoek *et al.*, 2017). Using cultivation and genomic approaches, other plant growth promoting bacteria have been shown to be present in the nodules, indicating that bacteria lacking the genes required for nodulation may enter the nodules, probably hitchhiking among the nodulating bacteria (Dudeja *et al.*, 2012).

The genomes of rhizobia usually contain the symbiotic information on a large plasmid, or in genomic islands located on the chromosome, reviewed in Romero and Brom (2004). Additionally, rhizobia carry large plasmids, with varied genetic information (Hynes and McGregor, 1990; Brom *et al.*, 1992; Brom *et al.*, 2000; Brom *et al.*, 2014).

Since the late 60s, the experiments were done showing that nodulation specificity (Higashi, 1967) could be transferred among different strains, by conjugation. Also, the P-group plasmid RP4 (Johnston and Beringer, 1975) and rhizobial plasmids, some containing the *mob* region of RP4 could be transferred by conjugation among different rhizobial strains, and even species (Johnston *et al.*, 1978; Hirsch, 1979; Beynon *et al.*, 1980; Hooykaas *et al.*, 1981; Kondorosi *et al.*, 1982). These experiments contributed to

Received 16 October, 2018; revised 5 April, 2019; accepted 26 April, 2019. *For correspondence. E-mail sbrom@ccg.unam.mx; Tel. +52 777 329 16 91; Fax. +52 777 317 55 81. †Present address: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-CONICET-La Plata, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

determine that in many species the nodulation and nitrogen fixation genes are localized on plasmids, and that some of them are conjugative. Later on, studies have addressed the transfer systems of rhizobial plasmids and their regulation, finding that many plasmids, both symbiotic and nonsymbiotic, are conjugative or mobilizable. Transfer has been shown to be regulated through diverse mechanisms, such as Quorum-Sensing (QS) (Fuqua *et al.*, 1994; Miller and Bassler, 2001; Tun-Garrido *et al.*, 2003; McAnulla *et al.*, 2007), similar to the regulation described for the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid (Piper *et al.*, 1993; Fuqua and Winans, 1994), regulators such as RctA (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2008), and the presence of other genes, whose functions are yet to be analysed (Ding *et al.*, 2013; Pistorio *et al.*, 2013; López-Fuentes *et al.*, 2015).

Rhizobium etli type strain CFN42 is able to nodulate and fix nitrogen in the roots of *Phaseolus vulgaris* (common bean). Its genome is constituted by one chromosome and six large plasmids ranging in size from 184 to 642 Kb (González *et al.*, 2006). These plasmids contain genes involved in a number of different functions, including nodulation and nitrogen fixation, biosynthesis of LPS, utilization of carbon and nitrogen sources, metabolite transport and conjugative transfer, to mention but a few (Brom *et al.*, 1992; Brom *et al.*, 2000; Landeta *et al.*, 2011; Villaseñor *et al.*, 2011; González-Sánchez *et al.*, 2017).

pRet42a from *R. etli* CFN42 has been identified as a conjugative plasmid. It contains all the necessary elements (an *oriT* site, Dtr and Mpf genes) for transfer. Expression of the transfer genes is regulated by a QS system, including a *tral* gene encoding an acyl homoserine lactone synthase, and two transcriptional regulators (TraR and CinR), which induce the transcription of the Dtr and Mpf genes in response to Tral (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Furthermore, pRet42a is able to cointegrate with the symbiotic plasmid pRet42d, both through site-specific recombination and through RecA-dependent homologous recombination, and thus promoting conjugative transfer of this plasmid (Brom *et al.*, 2004). Another interesting feature of pRet42a is that it contains a set of *vir* genes, homologous to those of the pTi from *Agrobacterium*. In *Agrobacterium* these genes allow the transfer of the T-DNA to plant cells and induce the formation of tumours (Piper *et al.*, 1993; Fuqua *et al.*, 1994). The *vir* genes localized in pRet42a have been shown to be functional, enabling T-DNA integration and plant transformation (Lacroix and Citovsky, 2016).

The conjugative transfer of other rhizobial plasmids is also regulated by QS or TraR-like regulators, for example: pSfr64a from *Sinorhizobium fredii* GR64 (Cervantes *et al.*, 2011), pLPU83a from *Rhizobium favelukesii* LPU83 (Torres Tejerizo *et al.*, 2014), pRL1JI from *R. leguminosarum* (Danino *et al.*, 2003; McAnulla *et al.*, 2007) and pAoF64/95 (Wetzel *et al.*, 2018), reviewed in (Ding and Hynes, 2009;

Brom *et al.*, 2014; Bañuelos-Vazquez *et al.*, 2017). All these analyses were done *ex planta*, under laboratory conditions. In the literature, there are reports regarding plasmid transfer in soil or on the surface of plant leaves, mainly using plasmids that carry antibiotic resistance genes, employing culture dependent and independent methods (Heuer *et al.*, 2012; Shintani *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2016). It has been shown that transfer occurs to many different recipients (Musovic *et al.*, 2014; Klumper *et al.*, 2015), including Gram-positive bacteria (Musovic *et al.*, 2006), as well as a positive effect on transfer of cocultured strains (Hall *et al.*, 2016). The transfer of symbiotic information in the rhizosphere was observed when a strain of *Mesorhizobium loti* was inoculated in a field, and native strains acquired the symbiotic island and the capacity to nodulate (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan and Ronson, 1998). This transfer was enhanced in the presence of plant nodulation inducers (Sullivan and Ronson, 1998) and activated by a QS system (Ramsay *et al.*, 2009). Transfer of a symbiotic island from *Azorhizobium caulinodans* was also shown to be enhanced in response to plant nodulation inducers (Ling *et al.*, 2016). Additionally, there is indirect evidence of rhizobial plasmid transfer by the isolation of strains from different geographical origins with similar plasmids or sections of them, suggesting that these strains arose through horizontal transfer of plasmids, and recombination among the incoming and host genetic information (Martínez-Romero and Caballero-Mellado, 1996; Herrera-Cervera *et al.*, 1999; Brom *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2011).

The natural habitat of rhizobia is the rhizosphere and the nodules developed during the symbiosis. In this work, we aimed to determine the ability of the bacteria to perform conjugative transfer in these conditions.

Results

pRet42a performs conjugative transfer in the rhizosphere and in nodules from bean plants

To determine if conjugative transfer is occurring in the rhizosphere and symbiotic structures, we used strain CFNX559 as donor and a recipient with no fluorescence (CFN2001). Strain CFNX559 is a derivative of *R. etli* CFN42 with a GFP marker in the conjugative plasmid pRet42a and an RFP marker in the chromosome. This allows differential detection of donors, which carry both markers and thus are yellow, and transconjugants, which only contain the GFP and present a green colour (Torres Tejerizo *et al.*, 2015). The experiments were done under hydroponic conditions, as described in Experimental Procedures.

The root surface, infection threads and nodules were visualized using confocal microscopy, 20 days post-inoculation (dpi). The results (Fig. 1) showed the presence of transconjugants in the three structures that are

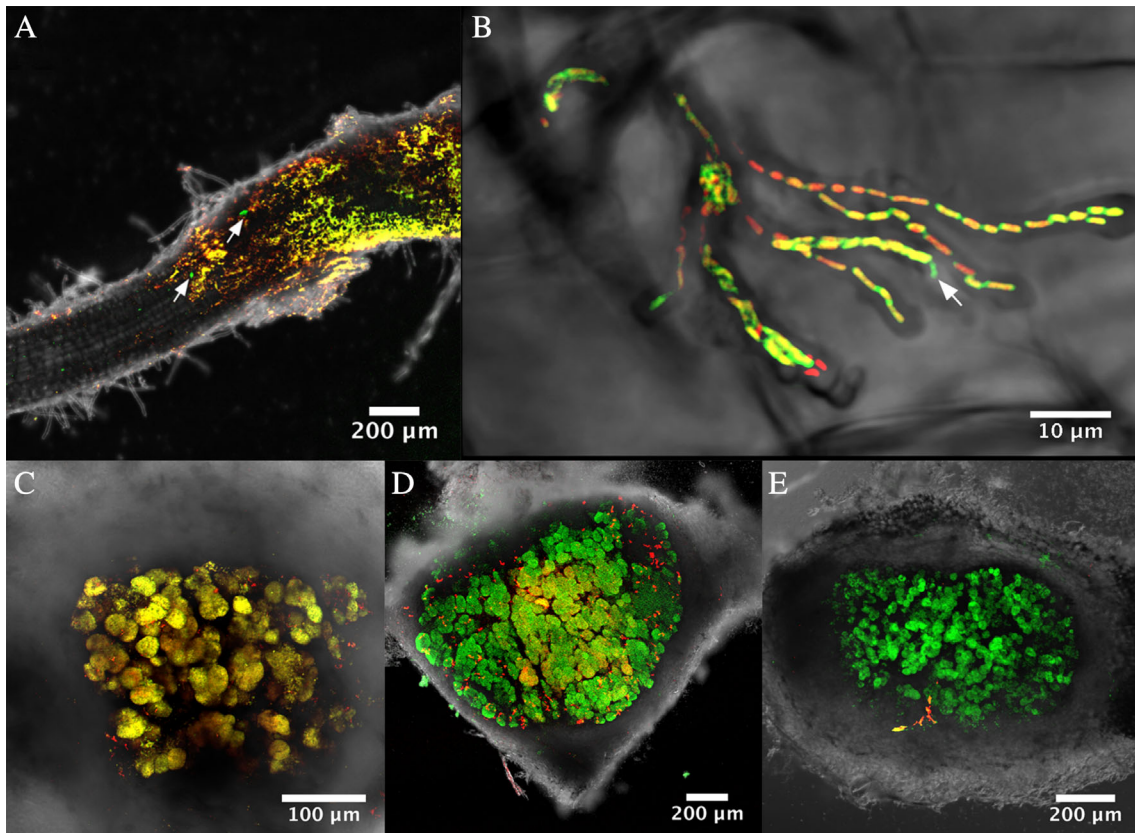


Fig. 1. Transconjugants containing pRet42a are present on the root surface, infection threads and nodules. Samples of roots, infection threads and nodules of plants inoculated with strains CFNX559 (donor) and CFN2001 (recipient) were analysed 20 dpi with a confocal microscope. Donor cells are yellow because they have RFP and GFP markers, and transconjugants are green because they only carry the GFP marker. Red cells are donors that lost the pRet42a plasmid. (A) root surface, (B) infection thread, (C), (D) and (E) nodules. Arrows indicate the location of some transconjugants.

analysed. Examples are shown in Fig. 1A (root surface), Fig. 1B (infection thread), Fig. 1C, D and E (nodules). Among 100 nodules analysed, we found 25% occupied by donor cells, 30% by transconjugants and 45% by a mixture of donors and transconjugants.

To have a quantitative measure of the occupation of nodules by the different cells, we recovered bacteria from nodules, and analysed the composition of the population using flow cytometry, as described in Experimental Procedures. The analysis (Fig. 2A) showed that the bacterial population occupying the nodules was formed mainly by transconjugants (60%), while the remaining 40%, was constituted by donors (30%), recipients (8%) and pRet42a-cured derivatives (2%). When plants were inoculated with the donor strain in the absence of the recipient, only 2% of the population corresponded to cells showing the pattern of transconjugants (Fig. 2G). It is interesting to notice that, although no recipient was introduced, there appears a population of unlabelled cells, which we consider to be possible endophytes (PE), which could be acting as recipients.

These results show that transconjugants are present on the root surface, and surprisingly, a very high number of transconjugants was found inside the nodules. The recipient strain CFN2001 lacks pRet42a and the symbiotic plasmid, and thus is unable to nodulate on its own. However, it is present in the nodules, indicating that it can take advantage of the nodulating donor strain to penetrate the nodules.

The high number of transconjugants present inside the nodules led us to propose that conjugation may be taking place inside these structures. In order to confirm or discard this hypothesis, we employed four different strategies, as described in the next sections.

Expression of ptral::GFP and ptraA::GFP fusions indicate that the conjugation machinery is active inside nodules

The first strategy was to determine if the conjugation machinery was turned on inside the plant structures. To study this we used two genes involved in transfer: *traA*,

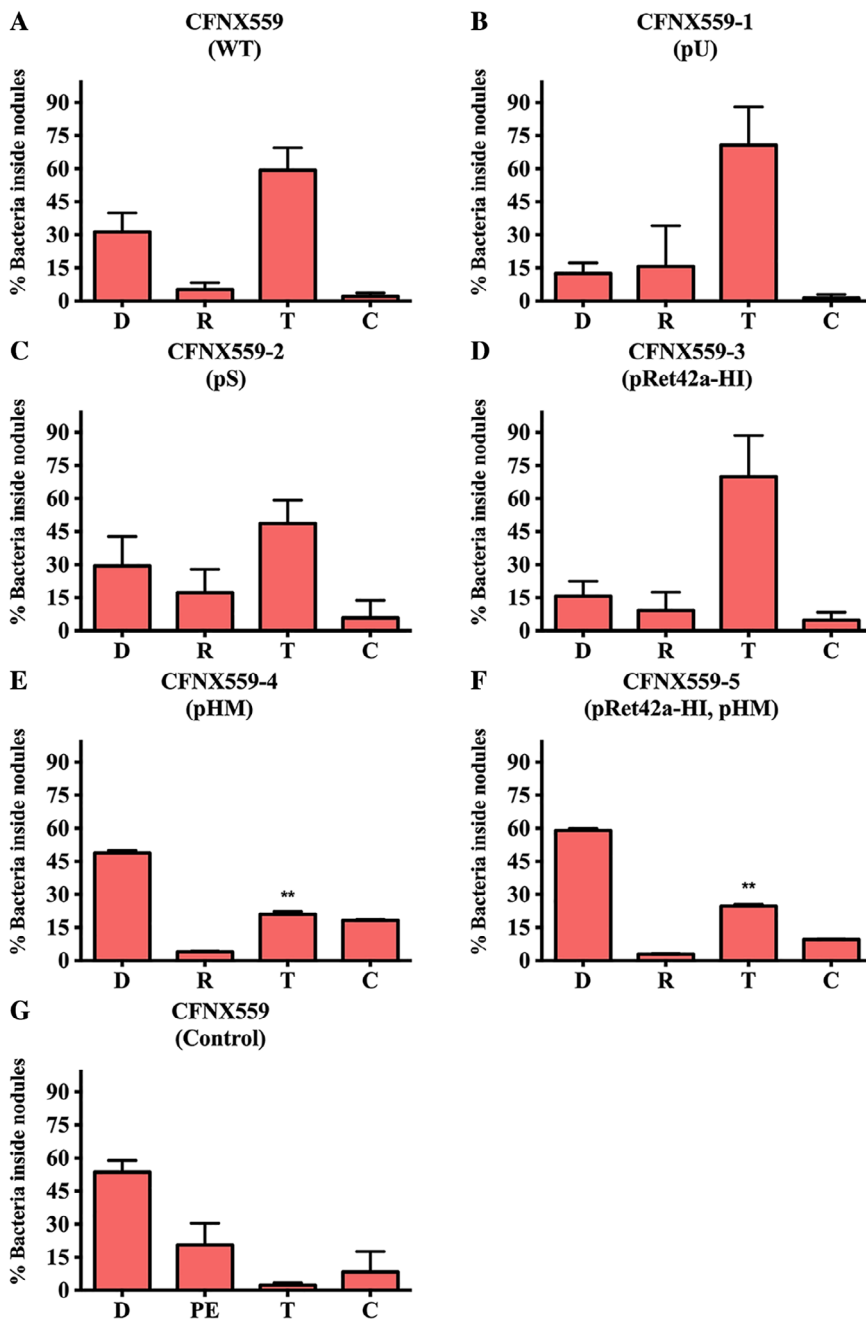


Fig. 2. Flow cytometry analysis of the populations isolated from nodules. Bacteria were isolated from nodules 20 dpi, from plants inoculated with: A. CFNX559 (wild type donor) and CFN2001 (recipient), B. CFNX559-1 (donor carrying pU) and CFN2001-1 (recipient carrying pU), C. CFNX559-2 (donor carrying pS) and CFN2001-2 (recipient carrying pS), D. CFNX559-3 (donor with pRet42a-HI) and CFN2001 (recipient), E. CFNX559-4 (donor with pHM) and CFN2001 (recipient), F. CFNX559-5 (donor with pRet42a-HI and pHM) and CFN2001 (recipient). G. CFNX559 (wild-type) without recipient (control). Percentage of populations corresponding to donors (D), recipients (R), transconjugants (T), pRet42a-cured derivatives (C) and probable endophytic bacteria (PE) are shown. (**) Significant difference in the number of transconjugants in comparison to the number obtained with the wild-type strain in Panel A), in a T test ($P < 0.01$).

which encodes the relaxase responsible for initiating the DNA processing and transfer, and *traI*, which forms a complex with the transcriptional regulators TraR and CinR to induce the expression of all the transfer genes (Tun-Garrido *et al.*, 2003). We fused the promoters of these two genes to a GFP reporter and introduced each of the resulting constructions into the wild-type CFN42 strain as described in Section Experimental Procedures. We determined the activity of the *ptral::GFP* and *ptrA::GFP* fusions inside the nodules in comparison to the transcriptional activity of the promoter of the nitrogenase reductase gene

(*nifH*), which is only induced inside the nodules. The results showed that *ptral::GFP* and *ptrA::GFP* were active on the root surface, in infection threads and in nodules (Fig. 3A-F), while *pnifH::GFP*, as expected, was only active inside nodules (Fig. 3G-I).

Also, we introduced the fusions into a *traI* mutant (strain CFNX669) and checked their activity. In this genomic background the *ptral::GFP* and *ptrA::GFP* were not expressed (Supporting Information Fig. S1A-F), while the *pnifH::GFP* promoter remained active (Supporting Information Fig. S1G-I). This indicates that the conjugation

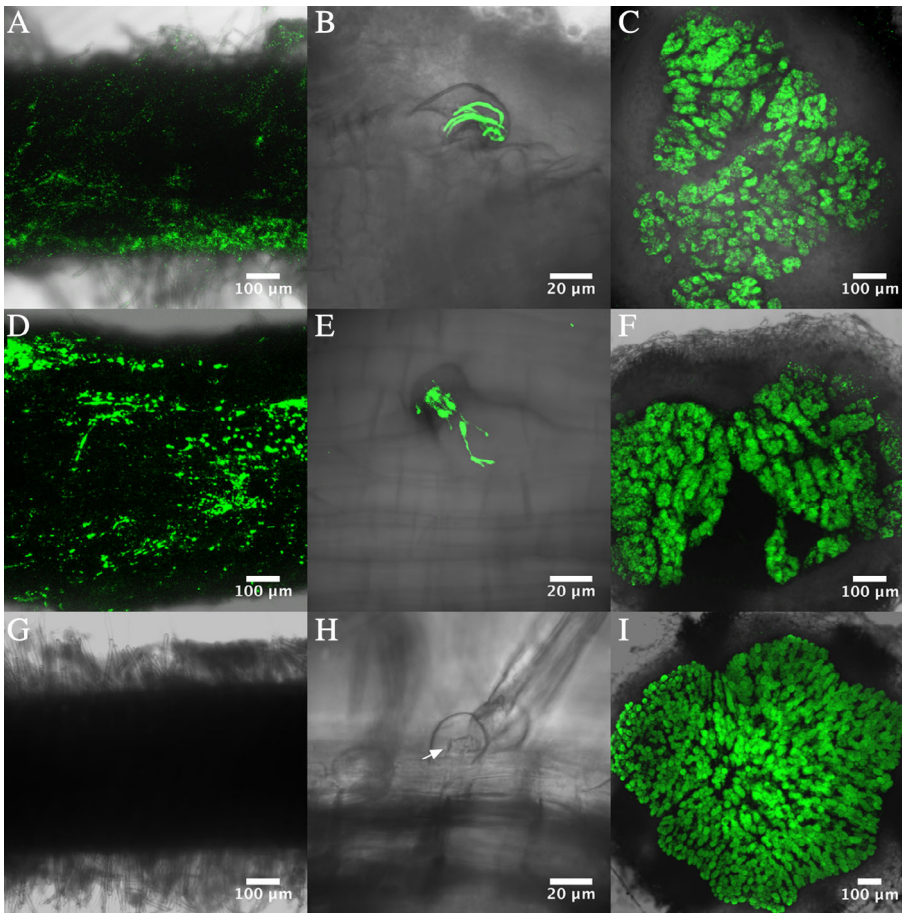


Fig. 3. The promoters of *tral* and *traA* are induced on the root surface, infection thread and nodules. Hydroponic cultures containing seedlings were inoculated with derivatives carrying a GFP marker under the control of the promoter of *tral* (panels A, B and C), the promoter of *traA* (panels D, E and F) and under control of the promoter of *nifH* (panels G, H and I). Samples were isolated 20 dpi, and the different structures analysed by confocal microscopy. Roots (panels A, D and G), infection threads (panels B, E and H) and nodules (panels C, F and I).

machinery is active inside the plant structures, subject to quorum-sensing regulation.

Inhibition of conjugation on the plant surface does not prevent appearance of transconjugants inside nodules

The second strategy consisted in inhibiting the conjugation on the plant surface, so that transconjugants could only be generated inside the plant. To do this, we used *traM*, which is an antiactivator of the TraR transcriptional inducer (Luo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004). Plasmid pRet42a contains an inactive *traM*, but introduction of a vector with the *traM* gene from *Sinorhizobium fredii* NGR234, decreases the conjugation frequency of pRet42a approximately 100 fold (Tun-Garrido *et al.*, 2003).

To perform the experiment, we constructed two clones carrying *traM*, as described in Experimental Procedures. One of them (pU) is unstable, because its stability region was removed as described in the section Experimental Procedures, and the other one (pS) is a stable vector. Using the hydroponic model, we inoculated 2-days old seedlings with the donor and recipient strains, both carrying the pU. Antibiotic (Tc₅) was added to the medium, to

prevent loss of the plasmid. The plants were maintained in this condition for three days, allowing the bacteria to enter the plant through the infection threads. At this time, the plants were changed to another tube with new medium (without antibiotic) allowing the bacteria that had entered the plant to lose the plasmid carrying the TraM that prevents conjugation. Also, the plants were reinoculated with the donor carrying the stable plasmid pS, in order to continue the inhibition of conjugation on the root surface. The different structures were visualized by confocal microscopy ten days after inoculation. The images show a high number of transconjugants inside the nodules generated with the donor carrying the unstable TraM vector (Fig. 4B), and some transconjugants scattered on the root surface (Fig. 4D). The number of transconjugants decreased in the structures inoculated with the donor carrying the stable TraM vector (Fig. 4A and C). Analysis of the composition of the population with flow cytometry confirmed the presence of transconjugants in the nodules. The percentage of transconjugants with the donor containing the unstable vector (Fig. 2B), or with the donor carrying the stable vector (Fig. 2C) was not significantly different from that obtained with the wild-type strain (Fig. 2A), suggesting that the

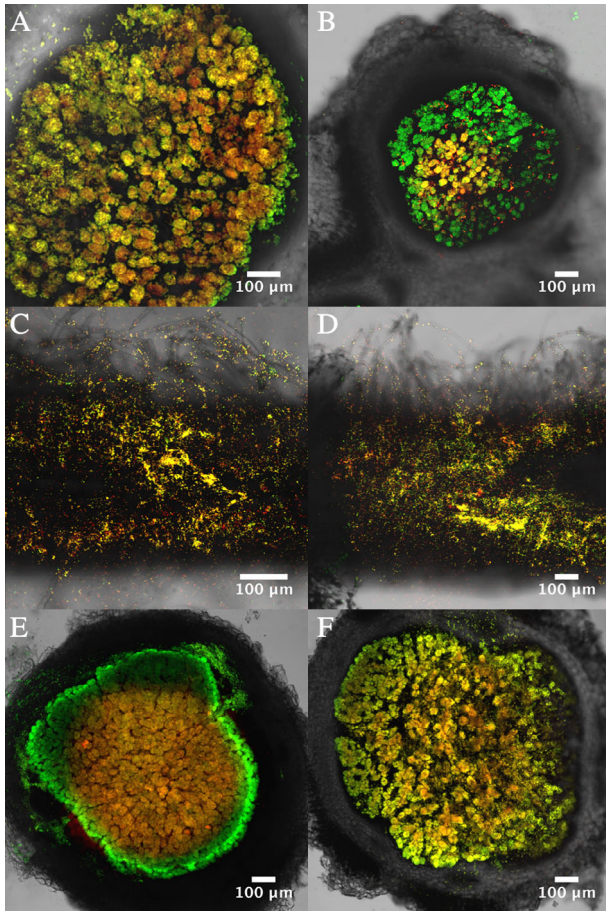


Fig. 4. Inhibition of conjugation on the root surface does not prevent appearance of transconjugants in nodules. Confocal microscopy of nodules (panels A, B, E and F) and root surface (panels C and D) from plants (10 dpi) inoculated with: (A) and (C) CFNX559-2 (donor carrying pS) and CFN2001-2 (recipient carrying pS), (B) and (D) CFNX559-1 (donor carrying pU) and CFN2001-1 (recipient carrying pU), (E) CFNX559-4 (donor with pHM) and CFN2001 (recipient), (F) CFNX559-5 (donor with pRet42a-HI and pHM) and CFN2001 (recipient).

inhibition caused by TraM is less efficient inside the nodule than in the rhizosphere. These results indicate that the conjugation machinery of pRet42a is active and functional in the nodules, discarding the possibility that conjugation only occurs on the plant surface.

Expression of tral under control of a nifH promoter allows transfer of pRet42a in nodules

To further confirm that conjugation is occurring inside the nodules, the third strategy consisted in placing the *tral* gene under the *nifH* promoter, assuring that the transfer genes were only turned on inside the nodules. Using the same scheme, seedlings were inoculated with the donor carrying this construction (pRet42a-HI) (see Experimental Procedures), and the plant structures were analysed

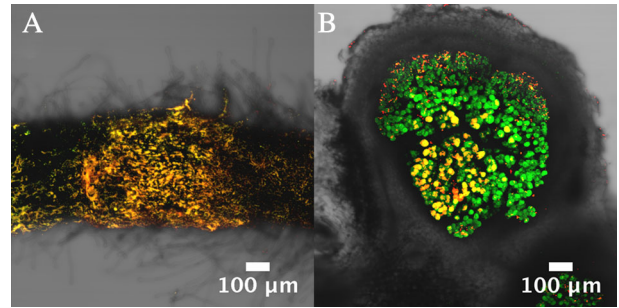


Fig. 5. When *tral* is under the control of the *nifH* promoter, transconjugants are generated only inside nodules. Confocal microscopy of roots (10 dpi) and nodules (20 dpi) of plants inoculated with CFNX559-3 (donor with pRet42a-HI) and CFN2001 (recipient).

20 days after inoculation. The data (Fig. 5) showed the appearance of transconjugants within the nodules, but not on the root surface, confirming that conjugation only occurred inside the nodules. Furthermore, the analysis using flow cytometry (Fig. 2D) showed a high proportion of transconjugants in the population occupying the nodules. The proportion was even higher than with the wild type strain, probably due to the strength of the *nifH* promoter. Finally, determination of the transfer frequency counting the CFUs of donor, recipient and transconjugants confirmed that transconjugants were not detected in the medium or root surface (Supporting Information Fig. S2). This experiment definitely shows that conjugative transfer of pRet42a takes place inside the nodules, while it is completely inhibited on the root surface.

Expression of traM under control of a nifH promoter reduces transfer of pRet42a in nodules

The last strategy employed, consisted in determining that, when transfer is inhibited inside nodules, the number of transconjugants decreases. To do this, we placed the *traM* gene under the *nifH* promoter (as described in Experimental Procedures section) and introduced this vector (pHM) in the wild type CFNX599, generating strain CFNX559-4. The vector was also introduced into the strain containing the pRet42a with *tral* under the *nifH* promoter, generating strain CFNX559-5. Roots were inoculated with each of these strains in combination with the unlabelled recipient. Nodules were analysed at 20 dpi. The results showed that nodules inoculated with the donors carrying this vector had a significant decrease in the number of transconjugants in the nodules (Fig. 4E and F). The decrease was more pronounced when the donor was CFNX559-5. This can be explained because strain CFNX559-4 is still able to perform CT on the root surface, and these transconjugants may enter the nodules, while strain CFNX559-5 only conjugates inside the

nodules, and when the process is inhibited, there is no possibility of introducing transconjugants generated outside the plant. Cytometry analysis confirmed the results showing a decrease in the number of transconjugants compared to their respective parental strain lacking the pHM (Fig. 2E vs Fig. 2A and Fig. 2F vs Fig. 2D). This approach also confirms that conjugation is taking place inside the nodules, as the number of transconjugants decreases when the process is inhibited in these structures.

Discussion

In this work, we show that plasmid pRet42a from *R. etli* is able to perform high-frequency conjugative transfer inside nodules formed during the establishment of the symbiosis between *R. etli* and the roots of *P. vulgaris*. We think that the recipients, which are unable to nodulate, take advantage of the nodulating donors to hitchhike into the nodule, as was proposed by Dudeja *et al.* (2012). Our results are supported by the use of different techniques: visualization of transconjugants using confocal microscopy and quantification of the number of transconjugants with cytometry; and by the implementation of different strategies to discard the possibility that all transconjugants were generated on the root surface and afterwards entered the infection threads and nodules. Two of the strategies were directed to inhibit the transfer on the root surface. In the first one, we used the *traM* gene, which encodes an antiactivator of TraR. In presence of TraM, transfer of pRet42a decreases about 100 times (Tun-Garrido *et al.*, 2003). We introduced an unstable vector containing the *traM* into the donor. The results showed that the conjugation frequency of pRet42a decreased to almost undetectable levels in the rhizosphere, where maintenance of the vector was ensured by selective pressure with antibiotic, while inside the nodules, where the pressure to maintain the vector was removed allowing its loss, transfer continued to be frequent. The second strategy was to place the *tral* gene under the promoter of the *nifH* nitrogenase gene. This promoter is only induced inside the nodules (Peralta *et al.*, 2004), so that conjugation in the rhizosphere was completely abolished. Using this donor, we also obtained transconjugants inside the nodules, further ascertaining that the conjugative process can take place inside these structures, using the conjugative transfer elements encoded in the nonsymbiotic plasmid analysed. Transfer of symbiotic information in nodules was suggested in a paper published by Pretorius-Güth *et al.* (1990). In contrast to our work, where transfer was conducted by the native transfer system of pRet42a, in the study by Pretorius-Güth *et al.*, the plasmid had an introduced *mob* region, and the possibility of conjugation occurring in the rhizosphere and that the transconjugants previously formed entered the nodules, could not be completely discarded. Also, we present evidence of

transfer on the surface of the roots. This expands the panorama of transfer in the rhizosphere, which had been evidenced for symbiotic information (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan and Ronson, 1998) and for plasmids carrying antibiotic resistance genes (Musovic *et al.*, 2006; Heuer and Smalla, 2012; Musovic *et al.*, 2014; Shintani *et al.*, 2014; Klumper *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2016). In the infection threads, we visualized transconjugants and determined that the transfer-related genes *traA* and *tral* are expressed. However, we cannot conclusively affirm that conjugation takes place there, because there is no technique available to isolate the bacteria from the infection threads, so that only a few could be analysed through microscopy. Another unexpected finding of this work was that derivatives cured of pRet42a were obtained, as viewed in the cytometry experiments. We have previously shown that the plasmids present in *R. etli* CFN42 are subject to different rearrangements, including loss of plasmids (Brom *et al.*, 1991). The highest proportion of plasmid-cured derivatives was observed in Fig. 2, Panels E and F, where the strains contained pHM, which has the TraM under the *nifH* promoter, and is highly expressed in nodules. Maybe these features are related.

Through time, nodules have been considered exclusive for hosting nitrogen-fixing rhizobia, and plant growth promoting bacteria, emphasizing the profit received by the plant, with the sole benefit for the bacteria of receiving a carbon source. Our results support a novel function for nodules, highlighting a clear benefit for the bacteria, regarding their diversification and evolution through conjugative transfer. Nodulation is usually a specific process, where certain bacteria interact with certain legumes (Gage, 2004; Popp and Ott, 2011; Westhoek *et al.*, 2017) however, nodules have been shown to contain other endogenous bacteria, including diverse rhizobial and non-rhizobial genera, such as *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, *Actinobacteria* and unclassified *Enterobacteriaceae* (Dudeja *et al.*, 2012; Mora *et al.*, 2014; De Meyer *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017). Nodules contain a high number of bacteria, about 10^9 (Downie, 2014); even if the most abundant are rhizobia, 10^5 – 10^8 may belong to other genera (Sturz *et al.*, 1997; Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). These bacteria may be natural recipients, or donors, in conjugative transfer events, contributing to evolution and diversification of bacteria, not restricted to symbiotic information. When we inoculated the donor strain CFNX559 in the absence of a recipient, 2% of the population showed a cytometry pattern corresponding to transconjugants (Fig. 2G). This population may contain transconjugants where the plasmid was transferred to native recipients, and/or donors lacking expression of the RFP marker. This issue needs to be further studied. The nodule environment may be enhancing conjugative transfer by providing a closed structure where the population of bacteria is high, establishing adequate conditions for the regulatory

mechanisms that turn on the transfer, such as QS, or through other mechanisms not yet described.

Bean plants produce determinate nodules, which lose the meristem and have a limited lifespan, while other legumes produce indeterminate nodules, which continue to grow due to a persistent meristem, and are divided into different zones: meristem growth, infection, nitrogen fixation and senescence (Popp and Ott, 2011). Does CT occur in both types of nodules? This will be another interesting aspect to explore. Also, inside nodules there is a mixture of bacteria and bacteroids, the differentiated form of bacteria able to fix nitrogen (Gage, 2004). Indeterminate nodules produce differentiated non-viable bacteroids, while determinate nodules produce bacteroids that are viable (Mergaert *et al.*, 2006). It is not probable that terminal bacteroids perform conjugative transfer, but it will be a challenge to try to determine if the viable bacteroids are able to perform conjugative transfer, or transfer is restricted to the bacterial forms present in the nodules.

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmids conditions

The bacterial strains and plasmids used in this work are described in Supporting Information Table 1. *Escherichia coli* strains were grown on lysogeny broth (LB) medium at 37 °C. *Rhizobium etli* strains were grown on PY medium at 30 °C. Antibiotic was added at the following concentrations (in µg/ml): For *E. coli*, Gentamicin (Gm) 10, Kanamycin (Km) 25, and tetracycline (Tc) 10. For Rhizobia: Nalidixic Acid (Nal) 20, Neomycin (Nm) 60, Rifampicin (Rif) 50, Spectinomycin (Sp) 100, Gm 30 and Tc 5. Solid media contained 1% agar.

Bacterial matings

Conjugation between the strains was done biparentally, using overnight cultures grown to stationary phase. Transconjugants were selected with the appropriate antibiotics. Donor and recipient were mixed in a 1:1 volume ratio and incubated overnight at 30 °C. The mixtures were collected and suspended in 1 ml of 10 mM MgSO₄ 0.01% tween 40 (vol/vol). Serial dilutions were plated on selective medium supplemented with the corresponding antibiotics, to quantify the number of donors, recipient, and transconjugant cells. The conjugation frequency is expressed as the number of transconjugants per donor cell. It represents the average of at least three experiments, and the standard deviation is shown. The plasmid pattern of the donors, recipients and transconjugants were checked using the Eckhardt technique (Eckhardt, 1978), as modified by Hynes and McGregor (1990).

Microscopy

Bacteria were visualized on plant roots using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope attached to an Axiovert 200 M. GFP excitation was performed at 488 nm, using an Ar/2 laser and a HFT UV 488/543/633 nm dual dichroic excitation mirror with a BP 500–530 IR emission filter for detection. DsRed was excited at 543 nm with a He/Ne1 laser, with the same dual dichroic excitation mirror and a BP 565–615 IR emission filter. We used objective EC 'Plan-Neofluar' 10 ×/0.30 Ph1 with DarkField and C-Apochromat 63 ×/1.2 W Korr, Ph3, DIC. The brightfield images were obtained with differential interference contrast (DIC). Also imaging of the cells was performed on an Olympus FV-1000 laser scanning confocal system, which was connected to an Olympus IX-81 inverted microscope (Tokyo, Japan). For GFP excitation, we used the 488-nm laser line of a multi-line Argon laser (Melles Griot Bensheim, Germany), a primary dichroic mirror DM 405/488 and a UPLSAPO 60×/1.35 oil LSM objective (Olympus). Emission was detected in the range of 500–600 nm. RFP were excited at 561 nm, with a dichroic mirror DM405/488/561/633. Emission was detected in the range of 600–700 nm. Images were processed using ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health) and Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Flow cytometry

In preparation for FC analysis, bacteria were isolated from nodules using the protocol described by Tsyganov *et al.* (2003). The bacteria collected from the nodules were resuspended in 500 µl of 10 mM MgSO₄. Acquisition was performed on an Imaging flow cytometer (ImageStream^x; Amnis/EMD Millipore, Seattle, WA). Images acquired include a brightfield image (Channels 1: 420–480 nm), GFP (Channel 2: 480–560 nm), RFP (Channel 4: 595–660 nm). For each sample, images were simultaneously collected for 20,000 events. Analysis was performed with IDEAS[®] software version 5.0 and individual cell images were created using IDEAS[®] software version 6.1 (Amnis Corp, Seattle, WA). All experiments were repeated at least three times, their average and standard deviations are shown.

Plant assays

Seeds from *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa were sterilized and germinated as previously described (Cárdenas *et al.*, 1995). Two-day-old germinated seedlings were introduced into tubes with Fahraeus medium (Fahraeus, 1957), inoculated with donor and/or recipient strains adjusted at 0.05 OD at 600 nm, in a 1:1 ratio. After 20 days, the roots were subjected to confocal

microscopy. To measure the transfer frequency, at the appropriate times, samples were taken from the medium. To obtain root samples, they were introduced in Falcon tubes with 30 ml of medium and subject to ultrasound for 20 min in a Branson 200 ultrasonic cleaner, at this time the roots were taken out, and the medium was centrifuged for 15 min at 5000 rpm, at 4°C to recover the bacteria attached to the roots surface.

Plasmid constructions

A 1022 bp PCR product containing the complete *trala* gene and the 5' end of *trbB* gene from *R. etli* CE3 under the control of the *nifHc* promoter was obtained by using overlap extension PCR methodology (Shevchuk *et al.*, 2004). To ascertain the fidelity of the fusion product, it was cloned by T-A annealing into pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) and sequenced. To construct a suicide plasmid useful for homogenization (pLG77), the *PnifHc-trala* was purified as a *BamHI*–*EcoRI* fragment and ligated with a *BamHI* – *HindIII* PCR product of *repAa* gene into a pK*mobsacB plasmid modified with an Ω Tc cassette (Schäfer *et al.*, 1994). This plasmid was modified, by inserting a Ω Km cassette in the *repAa-trala* intergenic region. All the restriction sites used to generate plasmid pLG77 were introduced into the primers. The specific primers used are shown in Supporting Information Table 2.

To introduce the *PnifHc-trala* allele into *R. etli*, *E. coli* DH5 α /pLG77 was mated in a triparental cross using *R. etli* CFNX559 as a recipient and DH5 α /pRK2013 as a helper. Double recombinants were selected as NaI^R , Sm^R , Km^R , and Tc^S . The result is a pRet42a derivative with the *tral* gene under the control of the *nifH* promoter (pRet42a-HI). The strain with this construction was called CFNX559-3.

Plasmid pTR102 was modified to obtain a derivative lacking the 3.2-kb RK2 stability region (Weinstein *et al.*, 1992). The pTR102 vector was digested with *HindIII*–*KpnI* to substitute the stability loci by inserting a *HindIII*–*KpnI* *loxSp* cassette (Martínez-Salazar and Romero, 2000). The *loxSp* cassette in the resulting plasmid was removed by *BamHI* digestion, giving rise to plasmid pTR102-U.

A PCR product containing the complete *traM* gene was generated with primers Up TraM- H3 and Lw-TraM-Bh. This product was ligated with pTR102, and pTR102-U, using the *HindIII* and *BamHI* restriction sites, to generate plasmids pS and pU.

Plasmid pHM, containing the *traM* gene under the promoter of *nifH* was constructed by generating 2 PCR products, one of the *nifH* promoter with primers Up-pHc-Bh-Xho and Lw1-ov-pHc-TraM, and the other of *traM*, with primers Up1-ov-traM-pHc and Lw-TraM-R1. These products were fused and cloned in pCR2.1 TOPO. Four

clones were checked to ascertain the sequence. pCR2.1 TOPO::p*nifHc-tram* was digested with *EcoRI*, using the restriction sites from primer Lw-TraM-R1 and from the vector. The R1 fragment (665 bp) was cloned in pFAJ1700, digested with *EcoRI*. Transformants were analysed by digestion with this restriction enzyme.

Acknowledgements

We thank Paz Salas, from the Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética from the Centro de Ciencias Genómicas (CCG) from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Adán Guerrero Cárdenas, Xóchitl Alvarado-Affantranger and Andrés Saralegui Amaro from the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada from the Instituto de Biotecnología, UNAM, for technical support; Alfonso Leija and Georgina Hernández from the Programa de Genómica Funcional de Eucariotes, CCG, UNAM, for providing *P. vulgaris* seeds. LAB is a doctoral student from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, and received Fellowship 384814 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. G.T.T. is member of the Research Career of CONICET and has received a fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation. This work was partially supported by grant IN203515 from PAPIIT, DGAPA, UNAM, and by grant 188967 for Bilateral Mexico-Argentina Cooperation, from CONACYT-CONICET.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bañuelos-Vazquez, L.A., Torres Tejerizo, G., and Brom, S. (2017) Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements. *Plasmid* **91**: 82–89.
- Beijerinck, M.W. (1888) Die Bacterien der Papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung* **46**: 725–734 741–750, 757–772, 781–790, 797–804.
- Beynon, J.L., Beringer, J.E., and Johnston, A.W.B. (1980) Plasmids and host-range in rhizobium leguminosarum and rhizobium phaseoli. *J Gen Microbiol* **120**: 421–429.
- Brom, S., García de los Santos, A., de Lourdes Girard, M., Dávila, G., Palacios, R., and Romero, D. (1991) High-frequency rearrangements in rhizobium leguminosarum bv. phaseoli plasmids. *J Bacteriol* **173**: 1344–1346.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. (1992) Different plasmids of rhizobium leguminosarum bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J Bacteriol* **174**: 5183–5189.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., and Romero, D. (2000) In rhizobium etli symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**: 34–43.
- Brom, S., Girard, L., García-de los Santos, A., Sanjuán-Pinilla, J.M., Olivares, J., and Sanjuán, J. (2002) Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating rhizobium species. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2555–2561.

- Brom, S., Girard, L., Tun-Garrido, C., García-de los Santos, A., Bustos, P., González, V., and Romero, D. (2004) Transfer of the symbiotic plasmid of rhizobium etli CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**: 7538–7548.
- Brom, S., Pistorio, M., Romero, D., and Torres Tejerizo, G. (2014) Boundaries for conjugative transfer of rhizobial plasmids: restraining and releasing factors. In *Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria*, Katsy, E.I. (ed). New York: Springer Science+Business Media, pp. 43–54.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J., Spaink, H.P., et al. (1995) Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from rhizobium etli. *Plant Mol Biol* **29**: 453–464.
- Cervantes, L., Bustos, P., Girard, L., Santamaría, R.I., Dávila, G., Vinuesa, P., et al. (2011) The conjugative plasmid of a bean-nodulating Sinorhizobium fredii strain is assembled from sequences of two rhizobium plasmids and the chromosome of a Sinorhizobium strain. *BMC Microbiol* **11**: 149.
- Chen, G., Malenkos, J.W., Cha, M.R., Fuqua, C., and Chen, L. (2004) Quorum-sensing antiactivator TraM forms a dimer that dissociates to inhibit TraR. *Mol Microbiol* **52**: 1641–1651.
- Danino, V.E., Wilkinson, A., Edwards, A., and Downie, J.A. (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1J1 in rhizobium leguminosarum bv. viciae is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**: 511–525.
- De Meyer, S.E., De Beuf, K., Vekeman, B., and Willems, A. (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* **83**: 1–11.
- Ding, H., and Hynes, M.F. (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can J Microbiol* **55**: 917–927.
- Ding, H., Yip, C.B., and Hynes, M.F. (2013) Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in rhizobium leguminosarum bv. Viciae strain VF39SM. *J Bacteriol* **195**: 328–339.
- Downie, J.A. (2014) Legume nodulation. *Curr Biol* **24**: R184–R190.
- Dudeja, S.S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., and Kothe, E. (2012) Interaction of endophytic microbes with legumes. *J Basic Microbiol* **52**: 248–260.
- Eckhardt, T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584–588.
- Fahraeus, G. (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* **16**: 374–381.
- Fuqua, W.C., and Winans, S.C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796–2806.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269–275.
- Gage, D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280–300.
- González, V., Santamaría, R.I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., et al. (2006) The partitioned rhizobium etli genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3834–3839.
- González-Sánchez, A., Cubillas, C.A., Miranda, F., Dávalos, A., and García-de Los Santos, A. (2017) The ropAe gene encodes a porin-like protein involved in copper transit in rhizobium etli CFN42. *Microbiologypopen* **7**: e00573. <https://doi.org/10.1002/mbo3.573>
- Haag, A.F., Arnold, M.F., Myka, K.K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., et al. (2013) Molecular insights into bacteroid development during rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 364–383.
- Hall, J.P., Wood, A.J., Harrison, E., and Brockhurst, M.A. (2016) Source-sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 8260–8265.
- Hellriegel, H., and Wilfarth, H. (1886). Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote. *Tageblatt der 59 Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte in Berlin 18-24 Sept.*
- Herrera-Cervera, J., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H., Requena, N., Amarger, N., et al. (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 87–97.
- Heuer, H., and Smalla, K. (2012) Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 1083–1104.
- Heuer, H., Binh, C.T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krogerrecklenfort, E., et al. (2012) IncP-1epsilon plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: diversification driven by class 1 integron gene cassettes. *Front Microbiol* **3**: 2.
- Higashi, S. (1967) Transfer of clover infectivity of rhizobium trifolii to rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor. *J Gen Appl Microbiol* **13**: 391–403.
- Hirsch, P., R. (1979) Plasmid-determined Bacteriocin production by rhizobium leguminosarum. *J Gen Microbiol* **113**: 219–228.
- Hooykaas, P.J.J., Van Brussel, A.A.N., den Dulk-Ras, H., Van Slogteren, G.M.S., and Schilperoord, R.A. (1981) Sym plasmid of rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and agrobacterium tumefaciens. *Nature* **291**: 351–353.
- Hynes, M.F., and McGregor, N.F. (1990) Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by rhizobium leguminosarum. *Mol Microbiol* **4**: 567–574.
- Johnston, A.W.B., and Beringer, J.E. (1975) Identification of the rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers. *J Gen Microbiol* **87**: 343–350.
- Johnston, A.W., Beynon, J., Buchanan-Wollaston, A., Setchel, S., Hirsch, P., and Beringer, J. (1978) High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of rhizobium. *Nature* **276**: 634–636.
- Klumper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., and Smets, B.F. (2015) Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME J* **9**: 934–945.
- Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C.E., Broughton, W.J., and Banfalvi, Z. (1982) Mobilization of a

- rhizobium meliloti Megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation Genes into other rhizobia and agrobacterium. *Mol Gen Genet* **188**: 433–439.
- Lacroix, B., and Citovsky, V. (2016) A functional bacterium-to-plant DNA transfer machinery of rhizobium etli. *PLoS Pathog* **12**: e1005502.
- Landeta, C., Dávalos, A., Cevallos, M.A., Geiger, O., Brom, S., and Romero, D. (2011) Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J Bacteriol* **193**: 1317–1326.
- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L.F., Fernandes-Junior, P.I., Hofmann, A., Kublik, S., et al. (2016) Cowpea Nodules Harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Front Plant Sci* **7**: 2064.
- Ling, J., Wang, H., Wu, P., Li, T., Tang, Y., Naseer, N., et al. (2016) Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of Azorhizobium caulinodans symbiosis Island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 13875–13880.
- López-Fuentes, E., Torres-Tejerizo, G., Cervantes, L., and Brom, S. (2015) Genes encoding conserved hypothetical proteins localized in the conjugative transfer region of plasmid pRet42a from rhizobium etli CFN42 participate in modulating transfer and affect conjugation from different donors. *Front Microbiol* **5**: 793.
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., and Chen, Y. (2017) Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the Rhizosphere and nodules of Dalbergia odorifera seedlings inoculated with Bradyrhizobium elkanii, rhizobium multihospitium-like and Burkholderia pyrrocinia-like strains. *Front Microbiol* **8**: 2255.
- Luo, Z.Q., Qin, Y., and Farrand, S.K. (2000) The anti-activator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J Biol Chem* **275**: 7713–7722.
- Martínez-Hidalgo, P., and Hirsch, A.M. (2017) The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes* **1**: 70–82.
- Martínez-Romero, E., and Caballero-Mellado, J. (1996) Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci* **15**: 113–140.
- Martínez-Salazar, J.M., and Romero, D. (2000) Role of the ruvB gene in homologous and homeologous recombination in rhizobium etli. *Gene* **243**: 125–131.
- McAnulla, C., Edwards, A., Sánchez-Contreras, M., Sawers, R.G., and Downie, J.A. (2007) Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in rhizobium leguminosarum biovar viciae. *Microbiology* **153**: 2074–2082.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., et al. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5230–5235.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165–199.
- Mora, Y., Díaz, R., Vargas-Lagunas, C., Peralta, H., Guerrero, G., Aguilar, A., et al. (2014) Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5644–5654.
- Musovic, S., Oregaard, G., Kroer, N., and Sorensen, S.J. (2006) Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6687–6692.
- Musovic, S., Klumper, U., Dechesne, A., Magid, J., and Smets, B.F. (2014) Long-term manure exposure increases soil bacterial community potential for plasmid uptake. *Environ Microbiol Rep* **6**: 125–130.
- Peralta, H., Mora, Y., Salazar, E., Encarnación, S., Palacios, R., and Mora, J. (2004) Engineering the nifH promoter region and abolishing poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in rhizobium etli enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3272–3281.
- Pérez-Mendoza, D., Sepúlveda, E., Pando, V., Muñoz, S., Nogales, J., Olivares, J., et al. (2005) Identification of the rctA gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol* **187**: 7341–7350.
- Piper, K.R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. (1993) Conjugation factor of agrobacterium tumefaciens regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448–450.
- Pistorio, M., Torres Tejerizo, G.A., Del Papa, M.F., Giusti Mde, L., Lozano, M., and Lagares, A. (2013) rptA, a novel gene from Ensifer (Sinorhizobium) meliloti involved in conjugal transfer. *FEMS Microbiol Lett* **345**: 22–30.
- Popp, C., and Ott, T. (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 458–467.
- Pretorius-Güth, I.M., Pühler, A., and Simon, R. (1990) Conjugative transfer of megaplasmid 2 between rhizobium meliloti strains in alfalfa nodules. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2354–2359.
- Quinto, C., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., Montiel, J., Arthikala, M.K., Nava, N., and Santana, O. (2014) The symbiosis between Phaseolus vulgaris and rhizobia. *Legume Perspectives* **2**: 35–37.
- Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Jambari, N., Ortori, C.A., Heeb, S., Williams, P., et al. (2009) A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the Mesorhizobium loti strain R7A symbiosis Island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol Microbiol* **73**: 1141–1155.
- Romero, D., and Brom, S. (2004) The symbiotic plasmids of the Rhizobiaceae. In *Plasmid Biology*, Phillips, G., and Funnell, B. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 271–290.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73.
- Sepúlveda, E., Pérez-Mendoza, D., Ramírez-Romero, M.A., Soto, M.J., López-Lara, I.M., Geiger, O., et al. (2008) Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of rhizobium etli. *J Bacteriol* **190**: 4189–4197.
- Shevchuk, N.A., Bryksin, A.V., Nusinovich, Y.A., Cabello, F. C., Sutherland, M., and Ladisch, S. (2004) Construction of

- long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* **32**: e19–e119.
- Shintani, M., Matsui, K., Inoue, J., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., et al. (2014) Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **80**: 138–145.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., and Nowak, J. (1997) Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fertil Soils* **25**: 13–19.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5145–5149.
- Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B., and Ronson, C.W. (1995) Nodulating strains of rhizobium loti arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8985–8989.
- Torres Tejerizo, G., Pistorio, M., Althabegoiti, M.J., Cervantes, L., Wibberg, D., Schluter, A., et al. (2014) Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS Microbiol Ecol* **88**: 565–578.
- Torres Tejerizo, G., Bañuelos, L.A., Cervantes, L., Gaytán, P., Pistorio, M., Romero, D., and Brom, S. (2015) Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J Microbiol Methods* **117**: 155–163.
- Tsyganov, V.E., Voroshilova, V.A., Herrera-Cervera, J.A., Sanjuán-Pinilla, J.M., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., et al. (2003) Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum*. *New Phytol* **159**: 521–530.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V., and Brom, S. (2003) Conjugative transfer of p42a from rhizobium etli CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**: 1681–1692.
- Villaseñor, T., Brom, S., Dávalos, A., Lozano, L., Romero, D., and Los Santos, A.G. (2011) Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in rhizobium etli and rhizobium leguminosarum. *BMC Microbiol* **11**: 66.
- Weinstein, M., Roberts, R.C., and Helinski, D.R. (1992) A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in planta inheritance of plasmids in rhizobium meliloti cells isolated from alfalfa root nodules. *J Bacteriol* **174**: 7486–7489.
- Westhoek, A., Field, E., Rehling, F., Mulley, G., Webb, I., Poole, P.S., and Turnbull, L.A. (2017) Policing the legume-rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. *Sci Rep* **7**: 1419.
- Wetzel, M.E., Asenstorfer, R.E., Tate, M.E., and Farrand, S. K. (2018) Quorum-dependent transfer of the opine-catabolic plasmid pAoF64/95 is regulated by a novel mechanism involving inhibition of the TraR antiactivator TraM. *MicrobiologyOpen* **8**: e00625. <https://doi.org/10.1002/mbo3.625>

Supporting Information

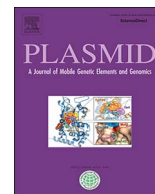
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. The promoters of *tral* and *traA* are not induced in a *tral* background. Hydroponic cultures containing bean seedlings were inoculated with *tral*⁻ derivatives carrying a GFP marker under the control of the promoter of *tral* (panels A, B and C), the promoter of *traA* (panels D, E and F), and under control of the promoter of *nifH* (panels G, H and I). Samples were isolated 20 dpi, and the different structures analysed by confocal microscopy. Roots (panels A, D and G), infection threads (panels B, E and H), and nodules (panels C, F and I). Arrows indicate the location of infection threads.

Fig. S2. pRet42a transfer frequency in medium, root surface and nodules, with donors carrying *tral* under control of the *nifH* promoter. Colony forming units (CFU) corresponding to donors (D), recipients (R) and transconjugants (T) were obtained from the medium, root surface and nodules of plants inoculated with CFNX559-3 (donor with pRet42a-HI) and CFN2001 (recipient). Conjugation frequency, expressed as T/D, was determined at 1, 10 and 20 dpi.

Table S1. Strains and plasmids used in this work.

Table S2. Oligonucleotides used in this work.



Review

Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements

Luis Alfredo Bañuelos-Vazquez^a, Gonzalo Torres Tejerizo^{b,c}, Susana Brom^{a,*}^a Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico^b Center for Biotechnology (CeBiTec), Bielefeld University, Universitätsstrasse 27, 33615 Bielefeld, Germany^c IBBM (Instituto de Biotecnología y Biología Molecular), CCT-CONICET-La Plata, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina.

ARTICLE INFO

Keywords:

Plasmid
Conjugative transfer
Regulation
Ice

ABSTRACT

Horizontal gene transfer has been recognized as one of the principal contributors to bacterial evolution and diversification. One of the mechanisms involved in this process is conjugative transfer of plasmids and Integrative Conjugative Elements (ICEs). Plasmids and ICEs often encode traits beneficial for bacterial survival in specific environments, or for the establishment of symbiosis or pathogenesis, in addition to genes allowing conjugative transfer. In this review, we analyze the mechanisms that regulate the expression of conjugative transfer genes. For traits such as antibiotic or metal resistance, the compounds involved may induce conjugative transfer directly, while symbiosis and pathogenesis are modulated by quorum-sensing and/or signal molecules released by the host. However, multiple layers of regulation are usually involved in modulating transfer. In addition to the plasmid-encoded regulatory elements, conjugation seems to be regulated by what we have labeled as the “internal environment”, defined by the interaction between the host chromosome and the plasmids or ICEs. Another regulatory level depends on the “external environment”, which affects conjugative transfer due to the composition and conditions of the community.

1. Introduction

For many years bacterial diversification and evolution were thought to be due to mutations, which are inherited vertically through cellular division. This is partially true, although, with the aid of molecular biology and genomics, a substantial contribution of horizontal gene transfer (HGT) events to this phenomenon has been uncovered (Koonin, 2016). This started with the discovery of conjugation in the 1950s, in addition to transformation and transduction. At present, the literature contains experimental evidence for conjugation in many microorganisms (Reviewed in Aminov, 2011). The wealth of information provided by the sequencing of genomes also shows ample bioinformatic evidence for a high proportion of horizontally transferred genetic information in bacteria (Ochman et al., 2000).

Plasmids can vary greatly in size, copy number and in the traits they encode (Thomas and Summers, 2008). They may contain genes conferring resistance to antibiotics and metals, the utilization of carbon compounds, virulence or symbiosis determinants (Dejonghe et al., 2000; Heuer and Smalla, 2012; Top et al., 1995; Wyrsh et al., 2016). These features are also present in Integrative Conjugative Elements

(ICEs) (Johnson and Grossman, 2015; Wozniak and Waldor, 2010).

Plasmids and ICEs are often able to perform conjugative transfer, by themselves, or with the aid of other genomic elements. Conjugative transfer requires the expression of transfer (*tra*) genes involved in DNA transfer and replication (*Dtr*) and in Mating pair formation (*Mpf*). *Dtr* genes are required for processing the DNA with a relaxase, which cuts the DNA molecule at the *nic* site of the origin of transfer (*oriT*), and remains attached to the single strand of DNA, which will be transferred responding to an undefined signal (Koraimann and Wagner, 2014). This complex, together with other proteins, makes up the relaxosome, which directs the strand to the type 4 secretion system (T4SS), a multiprotein complex located in the membrane of the cell. The *Mpf* encodes the genes that are responsible for synthesis of the T4SS. The relaxase, with the DNA strand attached, transfers to the recipient cell through the pore formed by the T4SS, finally the plasmid needs to be established in the recipient, with the help of ssDNA binding, anti-restriction and SOS inhibition proteins to generate stable transconjugants. (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Ding and Hynes, 2009; Frost et al., 2005; Koraimann and Wagner, 2014). It is interesting to note that expression of transfer genes is induced in a subset of the bacterial

* Corresponding author.

E-mail addresses: gatt@biol.unlp.edu.ar (G. Torres Tejerizo), sbrom@ccg.unam.mx (S. Brom).

population, maybe diminishing the negative effects of the associated energy cost (Koraimann and Wagner, 2014).

Conjugative plasmids and ICEs from Gram-negative bacteria usually carry all the structural genetic elements required to perform transfer (an *oriT* site, Dtr and Mpf genes) (Frost et al., 2005). In Gram-positive bacteria, there are two different systems (Goessweiner-Mohr et al., 2014). The first one, which is widely distributed, is similar to that present in Gram-negative bacteria, where a single stranded DNA is transferred through a T4SS (Goessweiner-Mohr et al., 2014; Li et al., 2013; Wisniewski and Rood, 2017). In the second one, present in *Streptomyces*, the double stranded plasmid molecule is transferred through the walls of the hyphae, suggesting that conventional Mpf genes are not required, indicating important differences in the transfer mechanisms (Thoma and Muth, 2016). In a recent review by Thoma and Muth (2016), the conjugative transfer in *Streptomyces* was shown to require a DNA-translocase, namely TraB. TraB resembles a protein involved in chromosome segregation during cell division, FtsK (Sepulveda et al., 2011).

Also, some plasmids or ICEs can be mobilized by other genetic elements. The mobilization may be due to the participation of proteins, which can act *in trans* (O'Brien et al., 2015; Ramsay et al., 2016; Torres Tejerizo et al., 2014), or through cointegration of the different elements (Brom et al., 2004; Haskett et al., 2016). The expression of transfer genes may be regulated through diverse mechanisms in different plasmids and ICEs. In this review, we survey different regulatory mechanisms present on plasmids and/or ICEs, aiming to discern if there is a correlation between the environmental conditions, the traits that are encoded in the mobile genetic elements, and their transfer regulation mechanisms.

2. Conjugative transfer of plasmids

Plasmids constitute part of the genomes of many different bacteria. Their sizes can vary from a few kilobases to about 2 megabases and can amount to 45% of the genome (Gonzalez et al., 2010; Romero and Brom, 2004; Thomas and Summers, 2008; Torres Tejerizo et al., 2011). Generally, they are thought to carry dispensable genetic information, useful only under very specific conditions, where they confer an advantage for maintenance of the population carrying them (Frost et al., 2005). However, some plasmids have been shown to carry essential genes (Landeta et al., 2011), allowing us to picture them as secondary chromosomes. The main feature distinguishing plasmids is that they replicate independently from the chromosome. They differ in the enzymes employed and in how the copy number is regulated (Thomas and Summers, 2008). Another relevant feature is the ability of plasmids to perform conjugative transfer, by themselves, when carrying all required elements (*oriT* site, Dtr and Mpf), sharing functions *in trans*, or through cointegration with other plasmids or ICEs, and they may also aid in the transfer of chromosomal markers (Frost et al., 2005). Plasmids contain genes required for their replication, and, many of them carry genes involved in conjugation (Frost et al., 2005; Thomas and Nielsen, 2005). In addition, they may carry an enormous variety of genes, conferring diverse phenotypic traits (Thomas and Summers, 2008). Since the 1960s, plasmids carrying antibiotic resistance genes have continuously gained interest (Wyrsh et al., 2016), moreover, pollution in different regions of the planet has led to the discovery and description of plasmids involved in metal resistance (Aminov, 2011). Plasmids involved in pathogenic (Aviv et al., 2016; Lang and Faure, 2014) and symbiotic interactions are also widely known (Romero and Brom, 2004). Similar to chromosomal genetic information, a high proportion of genes encoding proteins with unknown function is also found in plasmids (Koonin, 2016). In order to better understand the mechanisms leading to bacterial diversification through conjugative transfer, we decided to study whether the observed modes of plasmid transfer regulation can be correlated to the traits encoded by the plasmids.

2.1. Symbiosis and pathogenicity plasmids

The genomes of rhizobial strains are usually composed of a high number of large plasmids, in addition to the chromosome. Some of these plasmids are involved in plant virulence, others in the establishment of nitrogen-fixing symbiosis with the roots of leguminous plants (symbiotic plasmids or pSyms), and others carry diverse genes involved in the utilization of carbon sources, transport systems, and unknown functions (Brom et al., 2000; Brom et al., 2014; Ding and Hynes, 2009; Lang and Faure, 2014). The transfer capacity of a number of these plasmids has been studied. In this section, we show that in many of them conjugation is regulated by different variations of quorum-sensing (QS). Briefly, QS is a regulatory mechanism that depends on the density of the population. The cells produce a signal molecule, usually a homoserine-lactone, which is excreted to the media and accumulates in a cell density-dependent manner. When the cellular population increases, the homoserine-lactone diffuses back into the cells and forms a complex with transcriptional regulators. This complex is able to induce different responses, such as the expression of the genes required for plasmid transfer (Nealson et al., 1970). The pTi plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* was the first rhizobial plasmid described to regulate its conjugative transfer by QS. Plasmid pTi, so called for tumor induction, has two functionally distinct regions involved in transfer (Gelvin, 2000). The first one is related to the transfer of the T-DNA region to the host plant, through the action of the *vir* genes (for virulence). During the infection process, *A. tumefaciens* responds to phenolic compounds that are present at wound sites in the plant (Subramoni et al., 2014). *A. tumefaciens* is able to transfer a segment of the plasmid (T-DNA) to the host plant and integrate it into its chromosomal DNA, causing production of tumors (Kado, 2014). The T-DNA integrated in the plant's genome leads to the production of two classes of hormones: the first one corresponds to cytokinins and auxins that stimulate uncontrolled plant cell proliferation, allowing formation of the crown gall (Gohlke and Deeken, 2014). The second class comprises genes for the production of novel carbon compounds called opines. Opines can be used as carbon source by agrobacteria. Furthermore, they are required for induction of the second transfer system present in pTi, which allows transfer of the whole plasmid to other bacterial cells (Veluthambi et al., 1989). Opines control the expression of QS elements, which are required for the expression of the genes involved in conjugative transfer (Piper et al., 1993). This feature may be interpreted as that the utilization of specific carbon compounds contributes to the conjugative transfer of the plasmid. The whole system is very similar to the model LuxI-LuxR QS system described in *Vibrio fischeri* (Eberhard, 1972; Nealson et al., 1970). The main QS regulators in *A. tumefaciens* are encoded by pTi, including *traI*, *traR* and *traM* genes. *TraI* synthesizes a homoserine lactone, which binds to, and activates the *TraR* transcriptional regulator. *TraR* activates the transfer genes. *traM* encodes an antiactivator, which is able to bind to *TraR* when homoserine lactone levels are low, decreasing the conjugation levels (Lang and Faure, 2014).

In addition to pTi, the conjugative transfer of other rhizobial plasmids is also subject to regulation by QS, i.e.: the symbiotic plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* 8401 (Danino et al., 2003; McAnulla et al., 2007), and of *Sinorhizobium fredii* NGR234 (He et al., 2003). Furthermore, non-symbiotic plasmids such as pRet42a of *Rhizobium etli* CFN42 (Brom et al., 2000; Tun-Garrido et al., 2003), pSfr64a from a bean-nodulating *S. fredii* GR64 strain (Cervantes et al., 2011) and pLPU83a from *Rhizobium favelukesii* LPU83, isolated from acid soils in Argentina, are also regulated by QS. pLPU83a shows functional versatility: it is able to use its own machinery, but also the transfer machinery encoded in other plasmids. Interestingly, although pLPU83a requires a *traR* gene to induce transfer in a QS-dependent manner, it lacks a homoserine lactone encoding gene, indicating the presence of a different regulatory network (Torres Tejerizo et al., 2014). In an indirect manner, transfer of the symbiotic plasmid of *R. etli* CFN42

is also subject to QS, because it may be transferred through cointegration with the QS-regulated plasmid pRet42a (Brom et al., 2004).

Another mechanism for conjugative transfer regulation that is present in various rhizobial plasmids depends on the RctA-RctB system. RctA is a repressor, structurally related to winged-helix DNA-binding transcriptional regulators. In pSym of *R. etli*, *rctA* is transcribed divergently from the *virB* operon, which encodes the Mpf system that participates in conjugation. RctA binds specifically to a site in the *virB* promoter, repressing its transcription. Additionally, the divergent localization of *rctA* and the *virB* operon generates transcriptional interference between them, modulating the expression of *rctA* (Pérez-Mendoza et al., 2005; Sepúlveda et al., 2008). Conjugative transfer is achieved in the presence of overexpressed *rctB*, because this regulator inhibits expression of *rctA*, allowing induction of the Dtr and Mpf genes. To date, an environmental signal allowing the induction of transfer of plasmids regulated by RctA-RctB has not been identified.

pSymA of *Ensifer meliloti* is also subject to regulation by RctA-RctB, however, the regulatory circuit presents some differences compared to the one operating in the *R. etli* pSym. In the *E. meliloti* plasmid, *rctA* represses transfer genes, but the *rctB* ortholog activates transcription of conjugal genes without affecting *rctA* transcription. The expression of *rctB* in *E. meliloti* is controlled by *rctR* and *rctC*, which are absent in *R. etli*. While RctR represses *rctB*, *rctC* encodes a response regulator that binds to *rctR*, relieving transcription of *rctB* (Blanca-Ordóñez et al., 2010; Nogales et al., 2013). Unfortunately, the compound that activates *rctC* is still unknown.

Bioinformatic data have shown the presence of *rctA* and *rctB* homologues in the *A. tumefaciens* pAT plasmid, and recent transcriptomic data suggest that, at least in the pAT plasmid of strain P4, the regulation by RctA-RctB is under QS control (Mhedbi-Hajri et al., 2016; Nogales et al., 2013).

A different regulatory system has been described for pESI from *Salmonella enterica* sv infantis (Aviv et al., 2016). This plasmid is responsible for foodborne infections and confers multidrug resistance and virulence. Interestingly, transfer of this plasmid is modulated by conditions reminiscent of those present in the intestines of animals, such as temperature, oxidative stress and moderate osmolarity. The elements involved in the transcriptional regulation of pESI transfer are TraB and an oxygen homeostasis regulator, Fnr (Aviv et al., 2016).

2.2. Plasmids with antibiotic and metal resistance, and carbon compounds utilization

The discovery of antibiotics led to important medical advances in the fight against a number of bacterial diseases. However, it also led to an indiscriminate use of the antimicrobials. This has had a negative impact on the benefits of the use of antibiotics due to the rapid emergence of strains that have acquired resistance to the antibiotics. A “positive” aspect of this issue is that it has also allowed researchers to study how these resistance markers are distributed among the bacterial populations. Different studies propose that the presence of antimicrobial residues contaminating in groundwater, healthcare wastewater, etc., can provide a selective pressure for horizontal gene transfer (Baquero et al., 2013).

For instance, it has been shown that the combination of two antibiotics had a positive effect on the transmission of some conjugative plasmids that carry resistance genes to these antibiotics. Transfer of plasmids pRK2013, pSU2007, and RP4 from *Escherichia coli* DH5 α to HB101 responds to low concentrations of kanamycin and streptomycin, which induce the transcription of two genes, *oppA* (oligopeptide-binding protein) and *rbsB* (ribose-binding protein), that participate in the conjugation process (Zhang et al., 2013), clearly evidencing the relation between the plasmid encoded genes and its conjugative regulation.

Biofilms are complex structures formed by microbial communities associated with different kinds of surfaces, and may facilitate conjuga-

tive transfer. In *Pseudomonas putida*, biofilm formation increases when bacteria are exposed to sublethal doses of different antibiotics (kanamycin, ciprofloxacin and norfloxacin), which, in turn, allows the transfer of plasmids carrying the different resistance cassettes. If this increase in conjugative transfer is solely due to the augmented population, or to a specific regulatory mechanism remains an open question, but also in this case, there seems to be a relation between the plasmid-encoded genes and transfer regulation. Furthermore, specificity in the effect is suggested by a new non-invasive method for the quantification of plasmid conjugation in biofilms. The use of fluorescent proteins, has shown an increase in conjugative transfer in biofilms exposed to sub-inhibitory concentrations of antibiotics for which some of the bacteria forming the biofilm are resistant, in contrast to the application of other antibiotics (Ma and Bryers, 2013). In recent work, Hu et al. (2016) made a comprehensive study of the effects of phylogeny and ecological distribution on the recent transfer of the mobile antibiotic resistance genes of 23,425 bacterial genomes. Their results showed a high proportion of the antibiotic resistance genes in Proteobacteria, and that these genes seem to transfer preferentially to phylogenetically close bacteria. The authors propose that the presence of antibiotics allows selection, while ecology and physical localization of the bacteria set limits to the conjugative transfer. How these items interact to achieve regulation of conjugative transfer is, at present unknown.

In a study directed to the evolution of plasmid host-range, Loftie-Eaton et al. (2016) showed that the transposition of Tn6231 from the native mercury resistance plasmid pR28, encoding a putative toxin-antitoxin system, in combination with host mutations, significantly improved the persistence of antibiotic resistance plasmid pMS0506, in *Pseudomonas moraviensis*. This phenomenon shows evolutionary effects due to inter-plasmid events, and also may influence the spread of these mobile elements to other Beta and Gamma-Proteobacteria, when the resistance markers are moved to broad-host range plasmids, and consequently, they will be subject to different host-encoded regulators affecting their conjugative transfer.

Plasmids belonging to the IncA/C group are widely distributed among enterobacteria and have also been found in *Vibrio cholerae* strains. They have been shown to carry multidrug resistance elements, and are usually conjugative. Transfer of these plasmids is induced by AcaCD, whose expression is repressed by proteins Acr1 and Acr2. At present, the biological signal for relieving the repression and allowing AcaCD to induce transfer has not been identified (Carraro et al., 2016; Poulin-Laprade et al., 2015). AcaCD has been labeled as “master regulator” because it modulates the expression of about two thirds of the plasmid genes (Carraro et al., 2015). Additionally, AcaCD has been shown to control the excision and transfer of a number of ICEs, linking the transfer of plasmids with that of genomic islands. (Carraro et al., 2015; Carraro et al., 2016; Poulin-Laprade et al., 2015).

Some Gram-positive bacteria use secreted peptides for intercellular communication. Dunny et al. (1978), reported the efficient conjugative transfer of a tetracycline resistance plasmid (pCF10) from *Enterococcus faecalis*. The mechanism leading to transfer is complex. It involves a signaling peptide (cCF10) encoded in the bacterial chromosome, which is ultimately responsible for induction of transfer, by allowing transcription of the *prg* operon. Conjugation only takes place in the presence of adequate recipients, this is ensured by the action of genes encoded in the plasmid, namely *prgQ*, whose product (iCF10) competitively inhibits cCF10, and by *prgY*, which reduces production of the peptide. In the recipients lacking pCF10, the peptide is synthesized and exported to the media. From there, it is transported into the donor by an oligopeptide permease. Both the inducer cCF10 and the inhibitor iCF10 are able to bind to the protein encoded by *prgX*, which is the regulator of the operon encoding transfer functions. The balance between cCF10 and iCF10 will determine whether the operon is induced or not. Additional control of the system is conferred by post-transcriptional modulation (Cook and Federle, 2014; Dunny, 2007; Dunny and

Berntsson, 2016).

In another Gram-positive bacterium, *Clostridium perfringens*, toxin and antibiotic resistance genes are localized on conjugative plasmids closely related to pCW3, which has an atypical relaxase (Wisniewski and Rood, 2017; Wisniewski et al., 2016). The *tcp* region of pCW3 comprises 10 genes, and has been identified as the transfer region, showing some similarity to transfer genes of the conjugative transposon Tn916 (Bannam et al., 2006). This region is present in all known conjugative plasmids of *C. perfringens*. The study of an avian necrotic enteritis strain of *C. perfringens* showed the presence of a plasmid that contains genes conferring bacitracin resistance. The *bcr* genes were localized on an ICE related to Tn916 (Han et al., 2015). The identification of new genes involved in transfer, and of new combinations of phenotype conferring genes with ICEs, leads us to question how the distribution of these elements is regulated.

Regarding metals, different plasmids carrying genes conferring resistance have been described, for example, in *Cupriavidus metallidurans* CH34, pMOL28 contains genes involved in resistance to Co(II), Cr (VI), Hg(II), and Ni(II); while pMOL30 confers resistance to Ag(I), Cd (II), Co(II), Cu(II), Hg(II), Pb(II), and Zn(II). These genes are localized in three putative genomic islands, one in pMOL28 and two in pMOL30. Transcriptomic data indicates that, among others, conjugative transfer proteins are upregulated (83 genes in pMOL28 and 143 genes in pMOL30) in the presence of high metal concentrations, suggesting that these conditions might be related to transfer of the plasmids (Monchy et al., 2007). A study of nonconjugative IncQ plasmids pMOL187 and pMOL222, encoding resistance to Cd, Zn, and Co and to Ni, Cd, and Co, respectively, demonstrated that persistence of the plasmids was dependent on coinfection of the mobilizing RP4 plasmid in the microcosm, and that high metal concentrations, seemed to enhance transfer (Smets et al., 2003).

As early as 1993, it was shown that mercury released from dental amalgam fillings, contributed to the generation of strains carrying plasmids with multiple antibiotic resistance and mercury resistance genes (Summers et al., 1993). A more recent report of coexistence and possible dissemination of multidrug and metal resistant plasmids was published by Fang et al. (2016). In a very elegant manner, Klumper et al. (2017) have shown that the presence of low concentrations of metal stressors such as Zn, Cd, Cu, Ni and As decreased the transfer of a broad-host-range IncP-type plasmid (pKJK5) to potential recipients extracted from an agricultural soil, however, transconjugants were distributed among 12 different bacterial phyla, indicating that the distribution pattern was unaffected. Also, although the general tendency was to decrease transfer, for some specific OTUs transfer did actually increase. Overall, these results indicate a profound effect of metal-caused stress on conjugative transfer, measured as permissiveness, which has been defined as “the ability of a community to receive a plasmid, both in terms of transfer frequency and phylogeny” (Klumper et al., 2017).

Several mobile genetic elements have been described to have properties for utilization of carbon compounds (Don and Pemberton, 1981; Kinkle et al., 1993; Ohtsubo et al., 2012; Top et al., 1995). Plasmids pEMT1 and pEMT3 carry genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Top et al., 1995). Top et al. (1998) showed that the presence of this compound increases the number of transconjugants in soil experiments.

3. Conjugative transfer of integrative and conjugative elements

ICEs are usually found integrated in the chromosomes of bacteria. Their replication is linked to chromosomal replication; nevertheless, some ICEs have *rep* proteins, and can replicate as circular elements after excision from the chromosome. Vertical inheritance is assured by the chromosome's replication and segregation. These elements are also able to conjugate, spreading genes horizontally. Details of ICEs and excision mechanisms have been reviewed elsewhere (Johnson and Grossman,

2015; Wozniak and Waldor, 2010). ICEs are not restricted to specific taxa. Usually, they encode the whole machinery for the Dtr and Mpf, and thus, they are self-transmissible. For conjugative transfer, the ICEs must excise, re-circularize, transfer to the recipient cell, and there integrate into the “new” host genome. The regulation of the transfer of some ICEs has been described; in some cases, the traits encoded are involved in this regulation. Antimicrobials, stress-response and QS, among others, are indicated as regulators of gene expression of ICEs and their subsequent transfer. The molecular mechanisms of this phenomenon represent an interesting theme for relationships among bacteria in an ecological context, so, new cascades have been found for different elements. We aim to point out the general relationship among these traits.

3.1. Symbiosis and pathogenicity islands

Large ICEs are usually found in rhizobia, for example, ICEM_{sym}^{R7A} was identified after a field experiment in which non-symbiotic rhizobia evolved to symbiotic rhizobia through the acquisition of a 500 Kbp genomic island (Sullivan et al., 1995; Sullivan and Ronson, 1998). This genomic island was described as ICEM_{sym}^{R7A} (Ramsay et al., 2006). ICEM_{sym}^{R7A} excision depends on an integrase called IntS and a factor that ensures recombination directionality, RdfS, while the integration of ICEM_{sym}^{R7A} requires only IntS. Moreover, it was observed that the excision of ICEM_{sym}^{R7A} changes depending on the growth phase of the bacteria, increasing at high cell densities (Ramsay et al., 2006). Later on, it was described that this event was QS-induced. Excision and transfer depends on the presence of *msi171* and *msi172*, whose expression relies on the promoter of *tra2* because all these genes are encoded in an operon (*tra2-msi171-msi172*). As ICEM_{sym}^{R7A} encoded two homoserine lactone synthase genes, *tra11* and *tra12*, and a LuxR-family transcriptional regulator, *traR*, QS regulation through homoserine lactones as in *Agrobacterium* pTi plasmid is present for the expression of *msi171* and *msi172* (Ramsay et al., 2009). Therefore, the transfer of nodulation genes carried by ICEM_{sym}^{R7A} increases with high cellular density.

Recently, ICE^{Ac} was found in *Azorhizobium caulinodans*. This ICE^{Ac} of 87.6 Kbp harbors the nodulation genes needed to induce nodulation in *Sesbania rostrata*. Establishment of the nodulation process requires cross-talk between the plant and the bacteria, where the plant secretes flavonoids that induce the expression of nodulation genes in the bacteria (Jones et al., 2007). These nodulation genes are involved in the production of nodulation factors, which are small molecules that trigger several changes in the plant roots, preparing it for the infection. Surprisingly, flavonoids from *Sesbania rostrata* induce not only the expression of the nodulation genes present on the ICE^{Ac}, but also the conjugative transfer of this element (Ling et al., 2016).

The phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 harbors 17 genomic islands. One of them, horizontally acquired island 2 (HAI2) has genes involved in pathogenesis (*cfa*-like polyketide phytotoxin clusters) (Bell et al., 2004). Excision and transfer of HAI2 is induced *in planta* by unknown compounds and is also modulated by QS (Vanga et al., 2015). In *Pseudomonas aeruginosa*, it was described that the self-transmissible pathogenicity island PAPI-1 carries over one hundred genes with several virulence features (Qiu et al., 2006). The transfer of this island required integrase gene *soj* and the *pil* operon encoding determinants of type IV pili (Carter et al., 2010; Qiu et al., 2006). Carter et al. (2010) observed that in stationary growth-phase the expression of the *pil* operon and *soj* is increased. This could mean that the transfer of PAPI-1 is also regulated by QS. Nevertheless, a more detailed analysis is needed.

3.2. ICEs with antibiotic or metal resistance, or carbon compounds utilization

As previously mentioned, several plasmids increase their transfer

frequency when exposed to antimicrobials. In the case of some ICEs, the behavior is similar. Tn916, Tn925 and CTnDOT are regulated by tetracycline. Tn916 harbors a tetracycline resistance gene, when exposed to this antimicrobial, conjugative transfer increases 19-fold in *B. subtilis*; moreover, this frequency also increases when the element is transferred from other host strains (Showsh and Andrews, 1992). Ensuing studies showed that only the transfer frequency increases in the presences of tetracycline, while the excision frequency is not changed (Celli et al., 1997; Celli and Trieu-Cuot, 1998). Torres et al. (1991) demonstrated that Tn925 also increased its transfer under tetracycline exposure. In *Bacteroides* sp., CTnDOT encodes for resistance to tetracycline and erythromycin (*tetQ* and *ermF*). When donor strains are grown in presence of tetracycline, regulatory genes *rteA*, *rteB* and *tetQ* are induced. *rteB* induces the transcription of *rteC*, which, in turn, activates the expression of the excision operon causing an increase in the excision frequency of the ICE, and thus, also in the transfer rate (Cheng et al., 2001; Johnson and Grossman, 2015; Sutanto et al., 2004; Whittle et al., 2001; Whittle et al., 2002; Wood and Gardner, 2015).

ICE_{clc} from *Pseudomonas* sp. strain B13 carries genes involved in the degradation of carbon sources, such as 3-chlorobenzoic acid (Ravati et al., 1998). As mentioned above, transfer of ICEs starts with the excision of the element; ICE_{clc} integration and excision is catalyzed by the IntB13 integrase. The expression of this integrase is regulated by growth conditions and environmental compounds, specifically, 3-chlorobenzoate. This reinforces the idea that the same compound that is able to induce the ICEs transfer, is also metabolized by the bacteria, through genes carried in the ICE (Johnson and Grossman, 2015; Sentschilo et al., 2003a; Sentschilo et al., 2003b).

3.3. ICEs with unknown functions

ICEBs1 from *Bacillus subtilis* does not carry symbiosis, pathogenicity or antibiotic resistance determinants. It is conjugative and is regulated by two modes. One of these is by DNA damage, involving the RecA protein; RecA promotes activity of ImmA, an anti-repressor which cleaves ImmR allowing excision and transfer (Auchtung et al., 2016; Bose and Grossman, 2011). The second mechanism relies on the cell density of potential donors. It involves protein the RapI, which is negatively regulated by the small peptide PhrI. Both, *rapI* and *phrI*, are encoded in ICEBs1. PhrI is released to the media by the bacteria. When only a few bacteria harbor ICEBs1 (potential donors) but the total bacterial density is high (many potential recipients), the concentration of PhrI in the media is low, thus, it is not able to repress RapI and the transfer of ICEBs1 increases. When most of the bacteria harbor ICEBs1, the concentration of PhrI in the media is high, hence RapI is repressed and the transfer of ICEBs1 is repressed. This mechanism prevents the transfer of the ICE to cells that already contain the element (Auchtung et al., 2016). A similar mechanism of attenuation of conjugative transfer was observed in *A. tumefaciens* (Cho et al., 2009), where entry exclusion prevents the acquisition of similar plasmids to the one already present in the strain. Another interesting feature of ICEBs1, is its ability to promote transfer of some plasmids, previously considered to be non-mobilizable. The lack of a clear phenotype conferred by ICEBs1, has led researchers to hypothesize that the advantage it provides to hosts carrying it is an increase in genome plasticity (Auchtung et al., 2016).

4. Other regulatory elements

High-throughput sequencing technologies and bioinformatic tools have allowed researchers to discover new genes, analyze genome arrangements and helped to understand the evolution of organisms. Nevertheless, this knowledge is restricted because of the high proportion of genes encoding hypothetical proteins, where no precise information related to their function is available. In recent years, several plasmid (and ICE) -encoded hypothetical genes have been shown to affect the regulation of conjugative transfer. The regulatory mechan-

isms have been thoroughly analyzed in some cases, however, the regulatory signals have still not been identified. In this section we survey some of them.

Ensifer meliloti LPU88 harbors pSmeLPU88a and pSmeLPU88b. pSmeLPU88b is able to transfer in the presence of pSmeLPU88a (Pistorio et al., 2003). *rptA* is a gene found in pSmeLPU88a, that regulates the transfer of pSmeLPU88b, but, the molecular mechanisms of its activation is not understood (Pistorio et al., 2013).

In *R. etli* CFN42 another modulator of conjugative transfer (RHE_PA00163) was recently described. This gene encodes a conserved hypothetical protein, which has orthologs distributed in a number of Proteobacteria. Mutations affecting this gene result in an increase in conjugative transfer of pRet42a (Lopez-Fuentes et al., 2015). Furthermore, Ding et al. (2013) and Lopez-Fuentes et al. (2015) described genes with XRE-domains, which regulate conjugative transfer. In *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM, pRleVF39b is regulated by *trbR*. A mutation in this gene leads to a 1000-fold increase in pRleVF39b transfer from a *Rhizobium* donor strain and a 100-fold increase from *Agrobacterium* donors (Ding et al., 2013). Also, gene RHE_PA00165 is harbored in pRet42a from *R. etli* CFN42. Mutations in this gene showed unaltered transfer frequencies when transferred from *R. etli*, but when *Agrobacterium* was used as donor, the frequency increased at least 10-fold (Lopez-Fuentes et al., 2015). Both genes have a helix-turn-helix XRE-domain. Furthermore, on ICE_MSym^{R7A} a gene (*qseC*) was found that also encodes a protein with an XRE domain. This protein modulates the excision and conjugative transfer of ICE_MSym^{R7A} through regulation of *qseM*, which is involved in the modulation of the master regulator, *traR* (Ramsay et al., 2013).

5. Host regulatory elements

Different stresses that instigate a SOS response in bacteria are also able to increase the transfer rates of ICEs. The SOS response can be induced by UV exposure, some antimicrobials (i.e. fluoroquinolones) and DNA damaging compounds, among others (Aminov, 2011). The induction of transfer in SXT-R391 and ICEBs1 occur through RecA-dependent excision (Auchtung et al., 2016; Johnson and Grossman, 2015; Wozniak and Waldor, 2010). In these examples, transfer of the ICEs is not modulated by an isolated trait, but by an integrated regulatory network, that assures the prevalence of the ICE in the environment.

Host-encoded elements also participate in the conjugation of diverse plasmids. Transfer of pSym of *R. leguminosarum* bv *viciae*, is induced by a chromosomally encoded homoserine lactone synthase, produced in the plasmid-lacking recipient, that is able to diffuse into the donor and activate the transfer system (Danino et al., 2003). In Gram-positive bacteria transfer is often induced by plasmid-less recipients, using chromosome-encoded factors (Dunny and Berntsson, 2016; Goessweiner-Mohr et al., 2014). Transfer of *E. coli* plasmid F is influenced by the extracellular response element CpxA (Gubbins et al., 2002). In plasmid RA3 from the IncU group, the segregation proteins KorB and KorC repress the *mobC-nic* operon, which is required for DNA transfer (Kulinska et al., 2016; Ludwiczak et al., 2013). Also, both the virulence plasmid pSLT from *S. enterica* and the antibiotic resistance plasmid R100, originally isolated from *Shigella*, are conjugative in response to host-encoded regulators, such as Dam methylation and Lrp protein (Camacho and Casadesus, 2002; Camacho et al., 2005). Even in systems where a clear description of the participation of host-encoded factors is lacking, it is probable that this participation exists, and limits the transfer ability of plasmids and integrative elements.

6. Conclusions

In this review, we surveyed plasmids and ICEs encoding antibiotic and/or metal resistance, carbon compounds degradation, symbiosis or pathogenicity determinants. Although knowledge is still scarce regard-

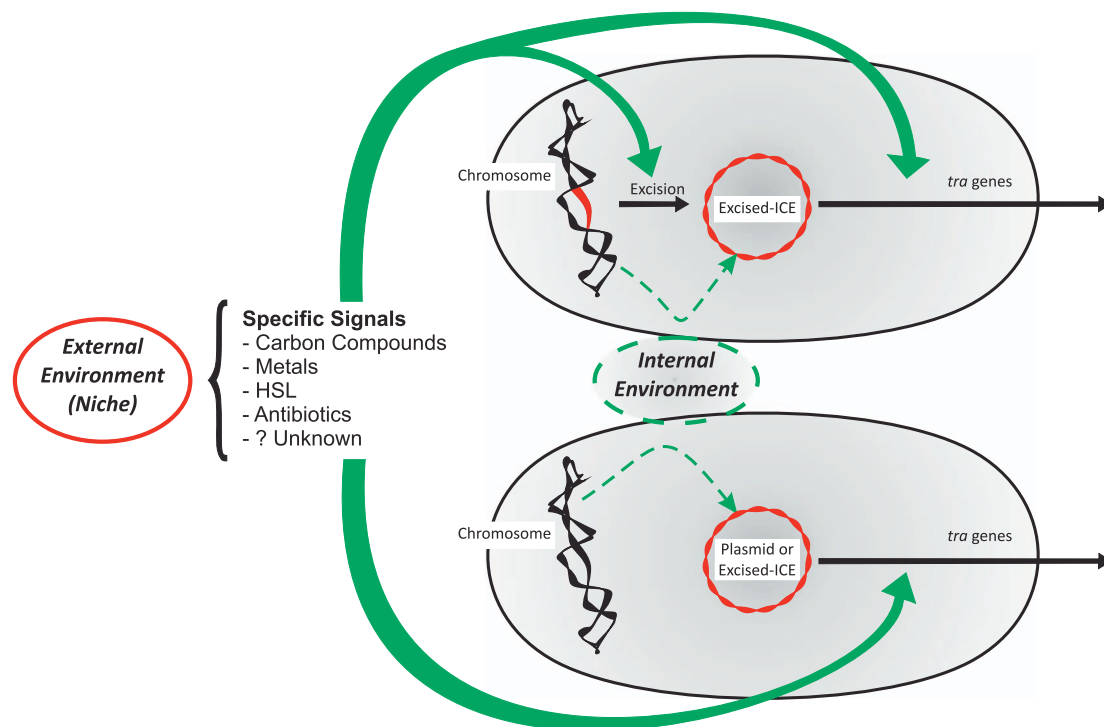


Fig. 1. Different levels modulate CT regulation. The upper drawing represents a cell containing an ICE inserted in the chromosome. The two points for regulation are excision and expression of transfer genes. The first level of regulation concerns the “internal environment” (interaction between the different genetic elements), the second level may be mediated by specific effectors related to the traits contained in the transmissible element, and the third level is the setting of limits by the external environment, due to the composition of the populations occupying the niche. The lower drawing represents a cell with a plasmid replicating autonomously or an excised-ICE. The levels of regulation are similar to those of the upper drawing, differing only in that there is no excision.

ing the environmental cues that trigger conjugation events, there are reports showing that specific antibiotics may induce conjugative transfer of some plasmids and ICEs. Many elements encoding features that involve interaction with other organisms, either beneficial (symbiotic) or harmful (pathogenic), are regulated by quorum sensing, a mechanism that is characterized by taking into account the impact of whole populations. Generally, the regulators are encoded in the transmissible structures. However, host features often participate in regulation of conjugative transfer by ICEs. This may be a consequence of their genomic localization. As they integrate into the host's chromosome, it can be speculated that ICEs temporarily form part of the cells background. This can also be applied to some plasmids, the classic example being *E. coli* plasmid F. Nevertheless, non-integrative plasmids also will affect bacterial fitness, and chromosomally encoded functions. Plasmids can be conjugative or mobilizable, helped *in trans* or through cointegration with other plasmids. The same applies to ICEs. Furthermore, there are plasmids that may help to mobilize ICEs, and vice versa, blurring the limits between these two kinds of elements. The examples presented here show the complexity of transfer regulation in many different plasmids/ICEs, generated by multiple layers of control.

Bacterial fitness can be defined as the relation between the capacity of the bacteria to use the environmental energy sources, its growth and the genes that are expressed during their life cycle. When a bacterial population colonizes a niche, the metabolism should be ameliorated to improve the colonization. In this context, it is logical that the genes needed for transfer are not expressed continuously, explaining their tight regulation.

The recent comprehensive analyses mentioned above point to a phylogenetic selection, implying that, above the specific regulatory elements, there is a higher regulation level, which depends on the “internal environment”, defined as the interactions of the bacterial host's chromosome with the plasmids or ICEs, and the “external environment”, corresponding to the habitat conditions and inhabitants. A scheme summarizing these ideas is presented in Fig. 1.

Currently, genomics constitute a huge source of information that allows the discovery of new genes, with unknown functions. Experimental work is needed to determine the function of these genes. In a kind of “back to the future” fashion, we should go back to the “wet” laboratory, to characterize new genes. In the context of this review, we propose that the unknown genes encoded in mobile genetic elements will be related to the conditions in the environment from which the elements were isolated, providing a cornerstone for the characterization of new molecules and mechanism of conjugative transfer regulation.

Funding

This work was partially supported by grant IN203515, from PAPIIT, DGAPA, UNAM to S.B. and PICT-2013-0113 and PIP 2014–11220130100420CO to G.T.T. LABV is a doctoral student from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and receives a fellowship from CONACYT. G.T.T. is a member of the Research Career of CONICET and has a fellowship of the Alexander von Humboldt Foundation.

References

- Alvarez-Martinez, C.E., Christie, P.J., 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 775–808.
- Aminov, R.I., 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 158.
- Auchtung, J.M., et al., 2016. Biology of ICEBsI, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 86, 14–25.
- Aviv, G., et al., 2016. Horizontal transfer of the *Salmonella enterica* serovar infantis resistance and virulence plasmid pESI to the gut microbiota of warm-blooded hosts. *MBio* 7.
- Bannam, T.L., et al., 2006. Functional identification of conjugation and replication regions of the tetracycline resistance plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 188, 4942–4951.
- Baquero, F., et al., 2013. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 15.
- Bell, K.S., et al., 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia*

- carotovora* subsp. atroseptica and characterization of virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 11105–11110.
- Blanca-Ordóñez, H., et al., 2010. pSymA-dependent mobilization of the *Sinorhizobium meliloti* pSymB megaplasmid. J. Bacteriol. 192, 6309–6312.
- Bose, B., Grossman, A.D., 2011. Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease. J. Bacteriol. 193, 22–29.
- Brom, S., et al., 2000. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. Plasmid 44, 34–43.
- Brom, S., et al., 2004. Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires coinfection with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. J. Bacteriol. 186, 7538–7548.
- Brom, S., et al., 2014. Boundaries for conjugative transfer of rhizobial plasmids: restraining and releasing factors. In: Katsy, I.E. (Ed.), Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria. Springer New York, New York, NY.
- Camacho, E.M., Casadesu, J., 2002. Conjugal transfer of the virulence plasmid of *Salmonella enterica* is regulated by the leucine-responsive regulatory protein and DNA adenine methylation. Mol. Microbiol. 44, 1589–1598.
- Camacho, E.M., et al., 2005. Regulation of conjugal transfer by Lrp and Dam methylation in plasmid R100. Int. Microbiol. 8, 279–285.
- Carraro, N., et al., 2015. Unraveling the regulatory network of IncA/C plasmid mobilization: when genomic islands hijack conjugative elements. Mob. Genet. Elem. 5, 1–5.
- Carraro, N., et al., 2016. IncA/C conjugative plasmids mobilize a new family of multidrug resistance islands in clinical *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolates from Haiti. MBio 7.
- Carter, M.Q., et al., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. J. Bacteriol. 192, 3249–3258.
- Celli, J., Trieu-Cuot, P., 1998. Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. Mol. Microbiol. 28, 103–117.
- Celli, J., et al., 1997. Use of an excision reporter plasmid to study the intracellular mobility of the conjugative transposon Tn916 in gram-positive bacteria. Microbiology 143 (Pt 4), 1253–1261.
- Cervantes, L., et al., 2011. The conjugative plasmid of a bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain is assembled from sequences of two *Rhizobium* plasmids and the chromosome of a *Sinorhizobium* strain. BMC Microbiol. 11, 149.
- Cheng, Q., et al., 2001. Identification of genes required for excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposon. Mol. Microbiol. 41, 625–632.
- Cho, H., et al., 2009. Transsexuality in the rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium tumefaciens* from phenotypically female to male. J. Bacteriol. 191, 3375–3383.
- Cook, L.C., Federle, M.J., 2014. Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. FEMS Microbiol. Rev. 38, 473–492.
- Danino, V.E., et al., 2003. Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRLJ1 in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. Mol. Microbiol. 50, 511–525.
- Dejonghe, W., et al., 2000. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3297–3304.
- Ding, H., Hynes, M.F., 2009. Plasmid transfer systems in the rhizobia. Can. J. Microbiol. 55, 917–927.
- Ding, H., et al., 2013. Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM. J. Bacteriol. 195, 328–339.
- Don, R.H., Pemberton, J.M., 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 145, 681–686.
- Dunny, G.M., 2007. The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 362, 1185–1193.
- Dunny, G.M., Bertsson, R.P., 2016. Enterococcal sex pheromones: evolutionary pathways to complex, two-signal systems. J. Bacteriol. 198, 1556–1562.
- Dunny, G.M., et al., 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 3479–3483.
- Eberhard, A., 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. J. Bacteriol. 109, 1101–1105.
- Fang, L., et al., 2016. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. Sci. Rep. 6, 25312.
- Frost, L.S., et al., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat. Rev. Microbiol. 3, 722–732.
- Gelvin, S.B., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 223–256.
- Goessweiner-Mohr, N., et al., 2014. Conjugation in gram-positive bacteria. Microbiol. Spectr. 2 (PLAS-0004-2013).
- Gohlke, J., Deeken, R., 2014. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. Front. Plant Sci. 5, 155.
- Gonzalez, V., et al., 2010. Conserved symbiotic plasmid DNA sequences in the multireplicon pangenomic structure of *Rhizobium etli*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1604–1614.
- Gubbins, M.J., et al., 2002. The positive regulator, TraJ, of the *Escherichia coli* F plasmid is unstable in a *cpxA** background. J. Bacteriol. 184, 5781–5788.
- Han, X., et al., 2015. Functional analysis of a bacitracin resistance determinant located on ICE $Cp1$, a novel Tn916-like element from a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6855–6865.
- Haskett, T.L., et al., 2016. Assembly and transfer of tripartite integrative and conjugative genetic elements. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 12268–12273.
- He, X., et al., 2003. Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. J. Bacteriol. 185, 809–822.
- Heuer, H., Smalla, K., 2012. Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. FEMS Microbiol. Rev. 36, 1083–1104.
- Hu, Y., et al., 2016. The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes. Appl. Environ. Microbiol. 82, 6672–6681.
- Johnson, C.M., Grossman, A.D., 2015. Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work. Annu. Rev. Genet. 49, 577–601.
- Jones, K.M., et al., 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nat. Rev. Microbiol. 5, 619–633.
- Kado, C.I., 2014. Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. Front. Microbiol. 5, 340.
- Kinkle, B.K., et al., 1993. Plasmids pJP4 and r68.45 can be transferred between populations of *Bradyrhizobia* in nonsterile soil. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1762–1766.
- Klumper, U., et al., 2017. Metal stressors consistently modulate bacterial conjugal plasmid uptake potential in a phylogenetically conserved manner. ISME J. 11, 152–165.
- Koonin, E.V., 2016. Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. In: F1000Res. 5.
- Koraimann, G., Wagner, M.A., 2014. Social behavior and decision making in bacterial conjugation. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4, 54.
- Kulinska, A., et al., 2016. Global transcriptional regulation of backbone genes in broad-host-range plasmid RA3 from the IncU group involves segregation protein KorB (ParB family). Appl. Environ. Microbiol. 82, 2320–2335.
- Landeta, C., et al., 2011. Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. J. Bacteriol. 193, 1317–1326.
- Lang, J., Faure, D., 2014. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. Front. Plant Sci. 5, 14.
- Li, J., et al., 2013. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 208–233.
- Ling, J., et al., 2016. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 13875–13880.
- Loftie-Eaton, W., et al., 2016. Evolutionary paths that expand plasmid host-range: implications for spread of antibiotic resistance. Mol. Biol. Evol. 33, 885–897.
- Lopez-Puentes, E., et al., 2015. Genes encoding conserved hypothetical proteins localized in the conjugative transfer region of plasmid pRet42a from *Rhizobium etli* CFN42 participate in modulating transfer and affect conjugation from different donors. Front. Microbiol. 5, 793.
- Ludwiczak, M., et al., 2013. Global transcriptional regulator KorC coordinates expression of three backbone modules of the broad-host-range RA3 plasmid from IncU incompatibility group. Plasmid 70, 131–145.
- Ma, H., Bryers, J.D., 2013. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 317–328.
- McAnulla, C., et al., 2007. Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Microbiology 153, 2074–2082.
- Mhedbi-Hajri, N., et al., 2016. Transcriptome analysis revealed that a quorum sensing system regulates the transfer of the pAt megaplasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. BMC Genomics 17, 661.
- Monchy, S., et al., 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. J. Bacteriol. 189, 7417–7425.
- Nealson, K.H., et al., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol. 104, 313–322.
- Nogales, J., et al., 2013. Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. Environ. Microbiol. 15, 811–821.
- O'Brien, F.G., et al., 2015. Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res. 43, 7971–7983.
- Ochman, H., et al., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 405, 299–304.
- Ohtsubo, Y., et al., 2012. Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax* sp. strain KKS102, which are located on an integrative and conjugative element. J. Bacteriol. 194, 4237–4248.
- Pérez-Mendoza, D., et al., 2005. Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. J. Bacteriol. 187, 7341–7350.
- Piper, K.R., et al., 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature 362, 448–450.
- Pistorio, M., et al., 2003. Identification of a transmissible plasmid from an Argentine *Sinorhizobium meliloti* strain which can be mobilised by conjugative helper functions of the European strain *S. meliloti* GR4. FEMS Microbiol. Lett. 225, 15–21.
- Pistorio, M., et al., 2013. *rptA*, a novel gene from *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti* involved in conjugal transfer. FEMS Microbiol. Lett. 345, 22–30.
- Poulin-Laprade, D., et al., 2015. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. Front. Microbiol. 6, 837.
- Qiu, X., et al., 2006. Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 19830–19835.
- Ramsay, J.P., et al., 2006. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS,

- and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol.* 62, 723–734.
- Ramsay, J.P., et al., 2009. A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol. Microbiol.* 73, 1141–1155.
- Ramsay, J.P., et al., 2013. A widely conserved molecular switch controls quorum sensing and symbiosis island transfer in *Mesorhizobium loti* through expression of a novel antiactivator. *Mol. Microbiol.* 87, 1–13.
- Ramsay, J.P., et al., 2016. An updated view of plasmid conjugation and mobilization in *Staphylococcus*. *Mob. Genet. Elem.* 6, e1208317.
- Ravatt, R., et al., 1998. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2126–2132.
- Romero, D., Brom, S., 2004. In: Phillips, G., Funnell, B. (Eds.), *The Symbiotic Plasmids of the Rhizobiaceae*. Plasmid Biology ASM Press, Washington DC.
- Sentchilo, V., et al., 2003a. Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 185, 4530–4538.
- Sentchilo, V., et al., 2003b. Characterization of two alternative promoters for integrase expression in the *clc* genomic island of *Pseudomonas* sp. strain B13. *Mol. Microbiol.* 49, 93–104.
- Sepúlveda, E., et al., 2008. Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 190, 4189–4197.
- Sepúlveda, E., et al., 2011. A septal chromosome segregator protein evolved into a conjugative DNA-translocator protein. *Mob. Genet. Elem.* 1, 225–229.
- Showsh, S.A., Andrews Jr., R.E., 1992. Tetracycline enhances Tn916-mediated conjugal transfer. *Plasmid* 28, 213–224.
- Smets, B.F., et al., 2003. Plasmid introduction in metal-stressed, subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4087–4097.
- Subramoni, S., et al., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front. Plant Sci.* 5, 322.
- Sullivan, J.T., Ronson, C.W., 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5145–5149.
- Sullivan, J.T., et al., 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8985–8989.
- Summers, A.O., et al., 1993. Mercury released from dental “silver” fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 825–834.
- Sutanto, Y., et al., 2004. Factors required in vitro for excision of the *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT. *Plasmid* 52, 119–130.
- Thoma, L., Muth, G., 2016. Conjugative DNA-transfer in *Streptomyces*, a mycelial organism. *Plasmid* 87–88, 1–9.
- Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 711–721.
- Thomas, C.M., Summers, D., 2008. *Bacterial Plasmids*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Top, E.M., et al., 1995. Characterization of diverse 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids isolated from soil by complementation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1691–1698.
- Top, E.M., et al., 1998. Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 87–94.
- Torres Tejerizo, G., et al., 2011. First genomic analysis of the broad-host-range *Rhizobium* sp. LPU83 strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like *Rhizobium* sp. group. *J. Biotechnol.* 155, 3–10.
- Torres Tejerizo, G., et al., 2014. Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 565–578.
- Torres, O.R., et al., 1991. The conjugative transposon Tn925: enhancement of conjugal transfer by tetracycline in *Enterococcus faecalis* and mobilization of chromosomal genes in *Bacillus subtilis* and *E. faecalis*. *Mol. Gen. Genet.* 225, 395–400.
- Tun-Garrido, C., et al., 2003. Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 185, 1681–1692.
- Vanga, B.R., et al., 2015. Mobilization of horizontally acquired island 2 is induced in planta in the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 and involves the putative relaxase ECA0613 and quorum sensing. *Environ. Microbiol.* 17, 4730–4744.
- Veluthambi, K., et al., 1989. Opines stimulate induction of the *vir* genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol.* 171, 3696–3703.
- Whittle, G., et al., 2001. Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3488–3495.
- Whittle, G., et al., 2002. Characterization of genes involved in modulation of conjugal transfer of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* 184, 3839–3847.
- Wisniewski, J.A., Rood, J.I., 2017. The Tc_p conjugation system of *Clostridium perfringens*. *Plasmid* 91, 28–36.
- Wisniewski, J.A., et al., 2016. Tc_pM: a novel relaxase that mediates transfer of large conjugative plasmids from *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 99, 884–896.
- Wood, M.M., Gardner, J.F., 2015. The integration and excision of CTnDOT. *Microbiol Spectr.* 3 (MDNA3-0020-2014).
- Wozniak, R.A., Waldor, M.K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 552–563.
- Wyrsh, E.R., et al., 2016. Genomic microbial epidemiology is needed to comprehend the global problem of antibiotic resistance and to improve pathogen diagnosis. *Front. Microbiol.* 7, 843.
- Zhang, P.Y., et al., 2013. Combined treatment with the antibiotics kanamycin and streptomycin promotes the conjugation of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 149–156.



Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia



Gonzalo Torres Tejerizo ^{a,*}, Luis Alfredo Bañuelos ^b, Laura Cervantes ^b, Paul Gaytán ^c, Mariano Pistorio ^a, David Romero ^b, Susana Brom ^b

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

^b Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2015

Received in revised form 5 August 2015

Accepted 6 August 2015

Available online 10 August 2015

Keywords:

Rhizobia

Plasmid

Conjugative transfer

Fluorescent cassettes

ABSTRACT

Evolution of bacterial populations has been extensively driven by horizontal transfer events. Conjugative plasmid transfer is considered the principal contributor to gene exchange among bacteria. Several conjugative and mobilizable plasmids have been identified in rhizobia, and two major molecular mechanisms that regulate their transfer have been described, under laboratory conditions. The knowledge of rhizobial plasmid transfer regulation in natural environments is very poor. In this work we developed molecular tools to easily monitor the conjugative plasmid transfer in rhizobia by flow cytometry (FC) or microscopy. 24 cassettes were constructed by combining a variety of promoters, fluorescent proteins and antibiotic resistance genes, and used to tag plasmids and chromosome of donor strains. We were able to detect plasmid transfer after conversion of non-fluorescent recipients into fluorescent transconjugants. Flow cytometry (FC) was optimized to count donor, recipient and transconjugant strains to determine conjugative transfer frequencies. Results were similar, when determined either by FC or by viable counts. Our constructions also allowed the visualization of transconjugants in crosses performed on bean roots. The tools presented here may also be used for other purposes, such as analysis of transcriptional fusions or single-cell tagging. Application of the system will allow the survey of how different environmental conditions or other regulators modulate plasmid transfer in rhizobia.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rhizobia are Gram-negative bacteria able to grow in the soil under free-living conditions and in symbiosis associated with the roots of legumes, as nitrogen-fixing organisms. A general feature of rhizobia is the presence of a large amount of plasmid DNA in their genomes. Among the major evolutionary forces that have shaped microbial diversity is horizontal gene transfer (HGT); conjugative transfer (CT) has been proposed as one of the crucial mechanisms for HGT. CT of rhizobial plasmids has been well documented since decades ago, and a variety of regulatory mechanisms affecting this function have been described, which include *quorum-sensing* (Danino et al., 2003; Tun-Garrido et al., 2003), repression by RctA (Nogales et al., 2013), and other regulators or mechanisms (Ding et al., 2013; Lopez-Fuentes et al., 2015; Pistorio et al., 2013; Torres Tejerizo et al., 2014). Specifically in *Rhizobium etli* CFN42, we have previously described that plasmid pRet42a (194 kbp) carries a cluster of transfer genes, whose expression is regulated by *quorum-sensing* elements (Tun-Garrido et al., 2003), while transfer of the symbiotic plasmid pRet42d (371 kbp) depends on its cointegration

with pRet42a (Brom et al., 2004). Additionally, transfer of pRet42d has been shown to occur independently of pRet42a when the RctA repressor is inactivated (Pérez-Mendoza et al., 2005). However, the experiments for evaluating rhizobial CT have been performed under laboratory conditions, where plasmid transfer can be easily detected by growing bacteria in selective media (after tagging the plasmids with antibiotic resistance genes). Nevertheless, there are only a few reports that analyze CT in soils, resembling natural conditions (Klumper et al., 2015; Musovic et al., 2010; Shintani et al., 2014; van Elsas et al., 1988, 1989), but they are focused mainly on transfer of antibiotic resistance markers by *Pseudomonas* spp. or *Escherichia* spp. strains. In order to evaluate if the frequency and regulatory mechanisms affecting CT in rhizobia present in their natural environments are the same as those described in laboratory conditions, we designed a system to specifically detect the transfer of tagged plasmids from known-donor rhizobia, avoiding the need for lethal selections. The system was modified from a report originally set up for *Pseudomonas* (Nanchaiah et al., 2003). A schematic figure of how the system works is shown in Fig. 1. The donor strain was tagged in the chromosome with a Red Fluorescent Protein (RFP) gene and the plasmid was tagged with a Green Fluorescent Protein (GFP) gene. Donor strains show both fluorescent tags while transconjugants that inherit the plasmid display only the green tag.

* Corresponding author.

E-mail address: gatt@biol.unlp.edu.ar (G. Torres Tejerizo).

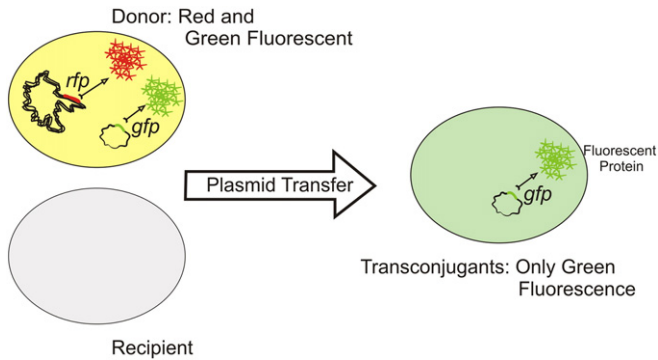


Fig. 1. Schematic representation of the plasmid transfer detection-system. A donor strain (red fluorescence in the chromosome and green fluorescence in the plasmid) showing both tags simultaneously is mixed with a non-fluorescent recipient strain. Conjugative transfer of the plasmid converts the non-fluorescent recipient into a green fluorescent transconjugant; thus discerning donors, recipients and transconjugants by their fluorescence.

Tagging bacteria with fluorescent protein is a widely used technique, but sometimes the overproduction of a fluorescent protein can be toxic for the bacteria. To avoid this, we examined the usefulness of different promoters by constructing several cassettes harboring fluorescent proteins (*mCherry* or *gfpmut3**) under diverse promoters and containing different combinations of antibiotic resistance genes (Gentamicin, Spectinomycin and Tetracycline). The combination of promoters, fluorescent proteins and antibiotic resistance enables the users to select the one appropriate for their purpose. To apply this approach in rhizobia, we developed derivatives of *R. etli* CFN42 containing different promoters and fluorescent proteins, evaluated them using microscopy and optimized cell counting by flow cytometry to detect plasmid transfer.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and plasmids

The strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* was grown on Luria-Bertani (LB; Miller, 1972) medium at 37 °C. *Rhizobium* spp. and *Agrobacterium tumefaciens* strains were grown on PY (Noel et al., 1984) at 30 °C. For solid media 15 g of agar per liter of medium were added. The final concentration of antibiotics used was (in $\mu\text{g ml}^{-1}$): gentamicin (Gm) 10, kanamycin (Km) 25, and tetracycline (Tc) 10 for *E. coli*. For *Rhizobia* and *A. tumefaciens*: streptomycin (Sm) 400, nalidixic acid (Nal) 20, neomycin (Nm) 60, rifampicin (Rif) 100, spectinomycin (Sp) 100, Gm 30, and Tc 5.

2.2. Bacterial matings

Conjugation experiments were performed as described by Cervantes et al. (2011). Briefly, overnight cultures were grown to stationary phase. Donor and recipient strains were mixed in a 1:2 volume ratio and incubated overnight on PY plates at 30 °C. The mixtures were resuspended in 1 ml of 10 mM MgSO_4 –0.01% Tween 40 (vol/vol). Serial dilutions were plated on selective PY medium supplemented with the corresponding antibiotics to quantify the number of donor, recipient, and transconjugant cells. The conjugation frequencies are expressed as the number of transconjugants per donor cell. The visualization of plasmids in the transconjugants (plasmid profiles) was evaluated by Eckhardt-gels (Eckhardt, 1978) as modified by Hynes & McGregor (Hynes and McGregor, 1990). Donor and recipient strains were included as controls.

2.3. DNA manipulation and genetic constructs

Procedures to obtain total DNA, plasmid purification, restriction-enzyme analysis, cloning, and *E. coli* transformation, were performed according to previously established techniques (Sambrook et al., 1989). When necessary, plasmids were isolated with a High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) and DNA from agarose gels was obtained with a GeneJet extraction kit (Fermentas).

Oligonucleotides (Supplementary Table 1) were purchased from “Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA. IBT-UNAM”. PCR amplification was carried out with recombinant *Taq* DNA polymerase or *Pfu* DNA polymerase as specified by the manufacturers in a Mastercycler 5330 (Eppendorf) or in an iCycler (Bio-Rad) thermocycler.

2.3.1. Construction of a new vector harboring Gm resistance

Vector pGX90 allows the release of the Gm resistance gene as a blunt *SspI* fragment with few restriction sites. For the construction of pGX90, pGX82 was digested with *XbaI* and ligated with a 1.5 kbp *NheI*-fragment containing the gentamicin (*accCI*) resistance gene from pBSL142 (Alexeyev et al., 1995). pGX82 was constructed by excising the polylinker of pK18mob (Schäfer et al., 1994) with *EcoRI* and *HindIII*; and substituting it by a new linker containing the following restriction sites “*HindIII*, *EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *SspI*, *XbaI*, *SspI*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI*, and *HindIII*”, using oligonucleotides “linkerEXba” and “linkerHXba”.

2.3.2. Construction of a new vector harboring the mCherry gene

The *mCherry* gene was assembled with 24 oligonucleotides of 60 bases via the Simplified Gene Synthesis approach (Wu et al., 2006) and was cloned in the non-commercial plasmid vector pJOQ kindly donated by Dr. Joel Osuna-Quintero (IBT-UNAM) yielding pJOQ_mCherry. This vector (2726 bp) was constructed from a fragment of plasmid pET-28a and a fragment from the plasmid pTRC99a. This plasmid contains the kanamycin-resistance gene, the pBR322 origin of replication and all genes cloned as *NdeI/XhoI* inserts are transcribed from the *trc* promoter.

2.4. Microscopy set up for evanescence field illumination

For the analyses of free-living cells, Epi-fluorescence and total internal reflection fluorescence (TIRF) measurements were performed on an Olympus IX-81 inverted microscope (Olympus, cell[^]TIRF™ Illuminator). For TIRF measurements the critical angle was set up such that the evanescence field had a penetration depth of ~100 nm (xcellence software v1.2, Olympus soft imaging solution GMBH). The samples were continuously illuminated using excitation sources depending of the fluorophore used. Green- and Red-absorbing fluorescent proteins were either excited with a 488-nm or a 561-nm diode-pumped solid-state laser. Beam selection and modulation of laser intensities were controlled via xcellence software v1.2. A full multiband laser cube set was used to discriminate the selected light sources (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). Fluorescence was collected using an Olympus UApo N 100 \times /1.49 numerical aperture oil-immersion objective lens with an extra 1.6 \times intermediate magnification lens. All images were recorded with an electron-multiplying charge couple device (EMCCD) camera (iXon 897, Model No: DU-897E-CS0-#BV; Andor) at 100 nm per pixel. Fifteen images were collected at ~100 ms for each imaging field, which were averaged to reduce noise.

The analysis of bacteria on plant roots was performed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope attached to an Axiovert 200 M. GFP excitation was performed at 488 nm, using an Ar/2 laser and a HFT UV 488/543/633 nm dual dichroic excitation mirror with a BP 500–530 IR emission filter for detection. DsRed was excited at 543 nm with a He/Ne1 laser, with the same dual dichroic excitation mirror and a BP 565–615 IR emission filter. We used Objective EC “Plan-Neofluar” 10 \times /0.30 Ph1 with DarkField and C-Apochromat 63 \times /1.2 W Korr, Ph3, DIC. The Brightfield images were obtained with differential

Table 1
Bacterial strains and plasmids.

Name	Description	Resistance	Reference
Strains			
<i>Rhizobium</i> CFN42	Wild type	Nal	Quinto et al. (1982)
<i>Rhizobium</i> CFN42-RFP	Derivative of CFN42 containing MiniTn7-RFP-Gm in the chromosome	Nal, Gm	This work
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GMI9023	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid free	Rif	Rosenberg and Huguet (1984)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>hsdR171</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>		Bethesda Res. Lab.
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294::[RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)] <i>thi pro hsdR hsdM</i> Δ <i>recA</i>		Simon et al. (1983)
Plasmids			
MiniTn7(Gm)-dsred-a	P _{A1,04/03} - <i>dsred</i> cloned into <i>NotI</i> site of pBK-miniTn7- Ω Gm	Gm	Lambertsen et al. (2004)
pBSL142	Vector with Gm cassette flanked by transcription and translation terminators.	Gm	Alexeyev et al. (1995)
pFAJ1708	Low copy number vector harboring <i>NptII</i> promoter	Amp, Tc	Dombrecht et al. (2001)
pGX143	Derivative of pGX166, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX144	Derivative of pGX166, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX166	Derivative of pGX30, carrying pR of lambda phage as <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> fragment from pSJ5 instead of P _{A1,04/03}	Km	This work
pGX173	Derivative of pGX30, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX185	Derivative of pGX194, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX186	Derivative of pGX166, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX194	Derivative of pGX30, carrying <i>mCherry</i> as <i>SphI</i> - <i>HindIII</i> fragment instead of <i>gfpmut3*</i>	Km	This work
pGX195	Derivative of pGX166, carrying <i>mCherry</i> as <i>SphI</i> - <i>HindIII</i> fragment instead of <i>gfpmut3*</i>	Km	This work
pGX207	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX64	Km, Sp	This work
pGX210	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX144	Km, Sp	This work
pGX212	Derivative of pGX194, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX241	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX212	Km, Sp	This work
pGX245	Derivative of pGX195, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX251	Derivative of pGX195, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX252	Derivative of pGX194, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX298	Derivative from pRet42a with pRet42a-p _{A1,04/03} :: <i>mCherry</i> :: <i>Sp</i> , obtained by double crossover with pGX241	Sp	This work
pGX30	Derivative from pGX84 carrying a 2 Kbp- <i>NotI</i> cassette (P _{A1,04/03} -RBSII- <i>gfpmut3*</i> -T0-T1) from pJBA28.	Km	This work
pGX384	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX533	Km, Sp	This work
pGX412	Derivative from pRet42a with pRet42a-pR:: <i>gfpmut3*</i> :: <i>Sp</i> obtained by double crossover with pGX210	Sp	This work
pGX421	Derivative from pRet42a with pRet42a-pNptII:: <i>mCherry</i> :: <i>Sp</i> obtained by double crossover with pGX384	Sp	This work
pGX474	Derivative of pGX30, carrying promoter <i>NptII</i> wild-type as <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> fragment substituting P _{A1,04/03}	Km	This work
pGX475	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX529	Km, Sp	This work
pGX477	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX534	Km, Sp	This work
pGX485	Derivative of pGX30, carrying promoter Lac wild-type as <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> fragment substituting P _{A1,04/03}	Km	This work
pGX493	Derivative of pGX474, carrying <i>mCherry</i> as <i>SphI</i> - <i>HindIII</i> fragment substituting <i>gfpmut3*</i>	Km	This work
pGX494	Derivative of pGX485, carrying <i>mCherry</i> as <i>SphI</i> - <i>HindIII</i> fragment substituting <i>gfpmut3*</i>	Km	This work
pGX507	Derivative from pRet42a with pLAC _{WT} :: <i>gfpmut3*</i> :: <i>Sp</i> obtained by double crossover with pGX477	Sp	This work
pGX508	Derivative from pRet42a with pLAC _{WT} :: <i>mCherry</i> :: <i>Sp</i> obtained by double crossover with pGX475	Sp	This work
pGX527	Derivative of pGX493, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX528	Derivative of pGX493, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX529	Derivative of pGX494, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX530	Derivative of pGX195, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX531	Derivative of pGX485, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX533	Derivative of pGX493, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX534	Derivative of pGX485, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX535	Derivative of pGX494, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX536	Derivative of pGX485, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX537	Derivative of pGX474, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Tc	This work
pGX538	Derivative of pGX474, carrying Ω Tc- <i>SmaI</i> fragment from pHP45-Tc in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX539	Derivative of pGX494, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX540	Derivative of pGX474, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX541	Derivative of pGX78 harboring the <i>NotI</i> -cassette from pGX537	Km, Sp	This work
pGX557	Derivative from pRet42a with pRet42a-pNptII:: <i>gfpmut3*</i> :: <i>Sp</i> obtained by double crossover with pGX541	Sp	This work
pGX580	Derivative from pRet42a with pRet42a-p _{A1,04/03} :: <i>gfpmut3*</i> :: <i>Sp</i> obtained by double crossover with pGX207	Sp	This work
pGX64	Derivative of pGX30, carrying Ω Sp- <i>SmaI</i> fragment from pHP45- <i>Sp</i> in the <i>Sspl</i> site	Km, Sp	This work
pGX66	Derivative of pGX30, carrying Gm resistance- <i>Sspl</i> fragment from pGX90 in the <i>Sspl</i> site	Km, Gm	This work
pGX78	Derivative of pK18mob-SacB with a fragment from pRet42a in the <i>SmaI</i> site	Km	This work
pGX82	Derivative of pK18mob with a new polylinker <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sspl</i> , <i>XbaI</i> , <i>Sspl</i> , <i>BamHI</i> , <i>SmaI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> substituting the <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> original linker	Km	This work
pGX84	Derivative from pK18mob with a polylinker with a single <i>NotI</i> site instead of the <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> original linker	Km	This work
pGX90	Derivative of pGX82 carrying the Gm resistance gene from pBSL142, as a <i>NheI</i> fragment, cloned in the <i>XbaI</i> site	Km, Gm	This work
pHP45- <i>Sp</i>	Vector carrying a DNA cassette for <i>Sp</i> ^R flanked by transcription and translation terminators	Amp, Sp	Fellay et al. (1987)
pHP45-Tc	Vector carrying a DNA cassette for Tc ^R flanked by transcription and translation terminators	Amp, Tc	Fellay et al. (1987)
pJBA28	Delivery plasmid for mini-Tn5-Km-P _{A1,04/03} -RBSII- <i>gfpmut3*</i> -T0-T1	Km, Amp	Andersen et al. (1998)
pJOO- <i>mCherry</i>	High copy number cloning vector, harboring <i>mCherry</i> gene	Km	This work
pK18mob	High copy number cloning vector	Km	Schäfer et al. (1994)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Name	Description	Resistance	Reference
pK18mob-sacB	Cloning vector, mobilizable	Km	Schäfer et al. (1994)
pRK600	ori ColE1 RK2-Mob+ RK2-Tra+; helper plasmid in triparental matings	Cm	Kessler et al. (1992)
pSJ5	Derivative of pUJ9 vector, with lambda promoter Right (pR) promoter and 5'-leader region of <i>tnp</i>	Amp	Jaenecke et al. (1996)
pUX-BF13	Helper plasmid, providing the Tn7 transposase proteins	Amp	Bao et al. (1991)

Nal, Rif, Nm, Sp, Tc, Gm, Km, Amp, and Cm = nalidixic acid, rifampicin, neomycin, spectinomycin, tetracycline, gentamicin, kanamycin, ampicillin, and chloramphenicol resistance, respectively.

interference contrast (DIC). Images were processed using ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) and Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA).

2.5. Flow cytometry

In preparation for FC analysis, aliquots of overnight cultures (donor and recipient strains) were incubated overnight on PY plates at 30 °C. Samples (controls and matings) were resuspended in 1 ml of 10 mM MgSO₄-0.01% Tween 40 (vol/vol). Serial dilutions were performed in NaCl 0.9%. All the solutions were filtered by 0.2 µm pore filters. Flow cytometric detection of cells was carried out using a FACS Cantoll (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). The forward (FSC) and side scatter (SSC) photomultiplier voltages were set at 951 V and 720 V, respectively. Threshold levels were set at 1000 in FSC and 3000 in SSC were set up. The detectors for green (GFP) and red fluorescence (Texas-Red) were set at 868 V and 819 V, respectively. For optimal count, a flow rate of 1 µl/s was chosen, where 500 to 3000 events/s were counted.

Bacterial populations were gated according GFP vs. Texas-Red plots. The high voltages used detect background events. A buffer solution was used as a negative control in order to exclude non-bacterial particles (non fluorescence events). In each case, the noise produced by the buffer was subtracted from samples. The BD FACS Diva software was used for data acquisition, and FlowJo v10 software was used for subsequent analysis.

2.6. Plant assays

To prepare Negro Jamapa *Phaseolus vulgaris* seeds, they were first washed thrice with sterile water, incubated for 1 min in ethanol, for 5 min in 20% sodium hypochlorite, and washed 5 times with sterile water. The seeds were then germinated as previously described (Cardenas et al., 1995), in agar plates. Two-day germinated plantlets were introduced into tubes with Fähræus medium (Fähræus, 1957), inoculated with donor and/or recipient strains adjusted at 0.05 OD at 600 nm. After 20 days, the roots were subjected to confocal microscopy.

3. Results

3.1. Construction of adaptable *NotI*-cassettes and fluorescence evaluation in *E. coli*

We developed a set of versatile cassettes carrying different promoters, fluorescent proteins and antibiotic resistance genes, to use them according to the requirements. The first step for the constructions was to remove the polylinker of pK18mob (Schäfer et al., 1994) with *EcoRI* and *HindIII*, and substitute it with a new linker with a single *NotI* site using oligonucleotides “linkerENot” and “linkerHNot”, the resulting plasmid was designated pGX84.

Next, plasmid pJBA28 (Andersen et al., 1998) was digested with *NotI* and a 2 kbp cassette containing the synthetic lac promoter P_{A1/04/03}, a

synthetic ribosome binding site (RBSII), a fluorescent protein (*gfpmut3**) and two transcriptional terminators, T0 and T1, was cloned into the single *NotI* site of pGX84, yielding plasmid pGX30. This plasmid harbors the backbone of the cassettes employed for the next steps. To exchange them, the synthetic lac promoter was replaced with an *EcoRI*-*SphI* fragment from pSJ5 (Jaenecke et al., 1996) containing the *Pr* promoter of bacteriophage lambda, yielding pGX166. Similarly, a wild-type copy of the lac promoter was obtained by PCR with oligonucleotides “plac-wt-fw-eco” and “plac-wt-rv-xba”, digested with *EcoRI* and *XbaI* and used to replace the synthetic lac promoter of pGX30, for the construction of pGX485. Finally, the *NptII* promoter was obtained by PCR with primers “pNPT-Fw-*EcoRI*” and “pNPT-Rv-*XbaI*”, digested with *EcoRI* and *XbaI*, and cloned to replace the synthetic lac promoter, for the construction of pGX474.

With the goal of using a different fluorescent protein for dual tagging, in each vector containing the different promoters and the *gfpmut3** (pGX30, pGX166, pGX485 and pGX474), the fluorescent protein was substituted with a *SphI*-*HindIII* fragment containing a copy of the *mCherry* protein, obtained by PCR with oligos “cherryNSphI” and “cherryCHind” using pJOQ_mCherry as template, yielding plasmids pGX194, pGX195, pGX494 and pGX493, respectively (Supplementary Fig. 1). The eight combinations of promoters and Fluorescent Proteins were digested in the single *SspI* site, and the following antibiotic resistance genes were introduced: ΩTc as a *SmaI* fragment from pHP45Ω-Tc (Fellay et al., 1987), ΩSp as a *SmaI* fragment from pHP45Ω (Prentki and Krisch, 1984) and Gm as a *SspI* fragment from pGX90. The constructions are listed in Table 1. All the cassettes were restricted with *NotI* to corroborate their correct excision.

To evaluate the expression of GFP and *mCherry* proteins, we visualized the *E. coli* strains carrying the cassettes by microscopy. The cassettes were harbored in multi-copy based-vectors, and fluorescence was observed (Supplementary Fig. 2). The analysis showed that the Lac promoters, the wild type as well as the synthetic one, and the *NptII* promoter exhibit a similar intensity, while expression from the *Pr* promoter was very weak. It is noteworthy that these evaluations were performed in *E. coli*, thus the expression in rhizobia could be different.

3.2. Tagging pRet42a of *R. etli* CFN42 with the cassettes

Aiming to evaluate our cassettes in *R. etli* we tagged plasmid pRet42a as follows: first we amplified a fragment of 602 bp (primers “p42a_left_in” and “p42a_rigth_in”) and cloned it in the *SmaI* site of the pK18mob-sacB vector, generating plasmid pGX78. The criteria for the selection of the fragment to be amplified were that it should contain a region with two genes arranged tail to tail and a *NotI* site in the middle, to avoid effects on CT properties of pRet42a. Next, we introduced the different cassettes with promoter-*gfpmut3**-Sp into the *NotI* site of pGX78. The resulting vectors were introduced into *R. etli* and substitution events were selected, thus generating CFN42 derivatives containing the cassettes integrated in pRet42a. The correctness of the integration was evaluated by PCR, using primers internal to the cassette (see Supplementary Fig. 1) and external primers from pRet42a for each

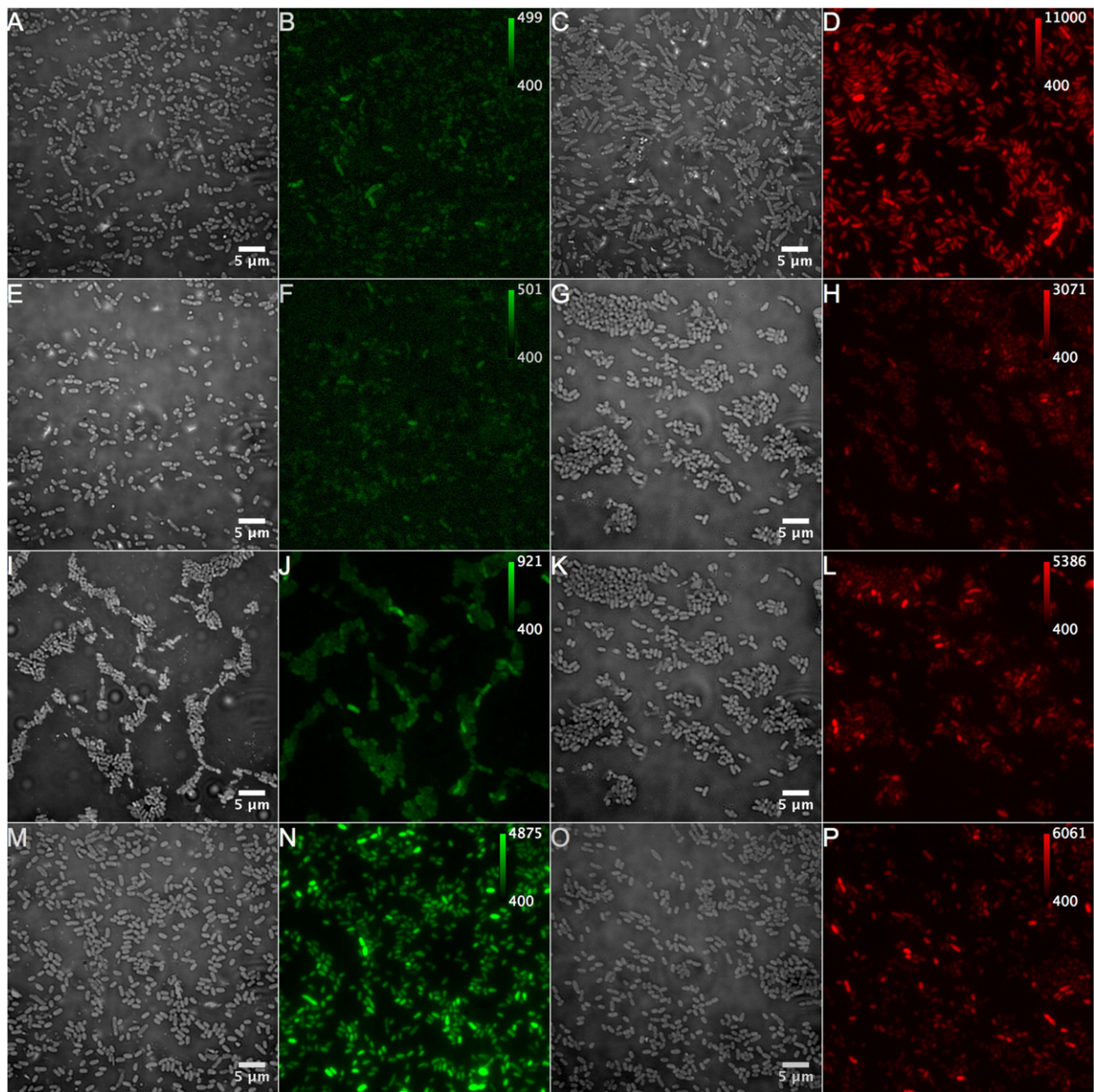


Fig. 2. Confocal microscopic observations of cassette expressions in *R. etli*. *R. etli* CFN42 derivatives expressing fluorescent proteins under control of different promoters were observed. As some proteins displayed very weak fluorescence, different settings were chosen; to compare them, the scale of intensity of the fluorescence is included in each photo. For Visible Field-Green fluorescence: A–B, *Pr* promoter-GFP; E–F, synthetic lac promoter $P_{A1/04/03}$ -GFP; I–J, wild-type lac promoter-GFP; M–N, *NptII* promoter-GFP. For Visible Field-Red fluorescence: C–D, dsRED; G–H synthetic lac promoter $P_{A1/04/03}$ -mCherry; K–L, wild-type lac promoter-mCherry; O–P, *NptII* promoter-mCherry.

side, “p42a_left_out” and “p42a_rigth_out”. Fluorescence expression was evaluated by confocal microscopy. We observed that expression of GFP was almost undetectable with the *Pr* promoter. The *NptII* promoter was the strongest promoter, while the Lac promoters were weaker than *NptII*. The same procedure was performed to introduce the promoter-*mCherry*-Sp cassettes (with the exception of *Pr* that was very weak) into pRet42a. Analysis of their fluorescence showed similar results, with *NptII* being the strongest promoter (Fig. 2).

Subsequently we evaluated the fluorescence by flow cytometry. We were able to detect GFP fluorescence with three out of four promoters; expression induced by the Lac promoters was not strong enough to separate the tagged derivatives from the wild type, while those under control of *NptII* promoter showed a satisfactory separation (Supplementary Fig. 3A). Also, we transferred each plasmid to an *Agrobacterium* plasmid free strain by conjugation, and observed similar results (Supplementary Fig. 3B).

3.3. Tagging of the chromosome of *R. etli* CFN42 with RFP cassettes and construction of donor strains

Unfortunately, the *mCherry* was not detected with the cytometer we used (data not shown) and thus we tagged *R. etli* in the chromosome by means of a Mini-Tn7-dsRED (Lambertsen et al., 2004). Expression from this insertion was detected by microscopic observation (Fig. 2D) and in the FC, and the derivative carrying it showed a separate fluorescence peak from the wild type *R. etli* (Supplementary Fig. 3C). Mini-Tn7 integration has been described to occur downstream of the gene encoding glucosamine-6-phosphate synthetase (*glmS*) (Lambertsen et al., 2004). To check the correctness of the integration, PCR amplification was performed with primers Tn7-*glms* and Tn7R109 as described in Lambertsen et al. (2004).

For the construction of a derivative containing markers in the chromosome and in pRet42a, plasmid pGX557 (labeled with

Table 2
Comparison of CFU and FC count of rhizobial strains and evaluation of conjugative transfer frequencies.

Experiment	Donor Strain ($\times 10^{08}$) CFN42-RFP/pCX557		Recipient Strain ($\times 10^{06}$) GMI9023		Transconjugants ($\times 10^{06}$)		Conjugation Frequency (Transconjugants per donor cell) ($\times 10^{-01}$)		Conjugation Frequency (Transconjugants per recipient cell) ($\times 10^{-03}$)	
	CFU	FC	CFU	FC	CFU	FC	CFU	FC	CFU	FC
1	5.63 \pm 0.95	3.95 \pm 0.73	11.93 \pm 1.50	4.67 \pm 0.96	7.93 \pm 0.78	6.00 \pm 3.61	0.14 \pm 0.02	0.15 \pm 0.06	0.67 \pm 0.06	1.22 \pm 0.49
2	1.26 \pm 0.13	2.48 \pm 1.06	9.27 \pm 1.59	3.61 \pm 2.22	80.67 \pm 10.07	19.67 \pm 4.04	6.40 \pm 0.33	0.89 \pm 0.34	8.76 \pm 0.79	7.32 \pm 4.84
3	5.73 \pm 0.60	5.17 \pm 1.36	11.90 \pm 1.30	8.97 \pm 2.15	13.07 \pm 4.00	16.00 \pm 7.00	0.23 \pm 0.05	0.30 \pm 0.05	1.09 \pm 0.25	1.74 \pm 0.36

Statistics test performed: Wilcoxon rank sum test. (non-parametric).
ns, non-significant (p-value > 0.055).

promoter *NptII*-GFP-Sp) was introduced by conjugation into the strain tagged with dsRED in the chromosome, CFN42-RFP. This construct was also analyzed by fluorescence under the microscope and by flow cytometry.

3.4. Optimization of parameters for FC, evaluation in rhizobia and detection of transconjugants by FC

Counting bacteria by FC is not an easy task, especially because of their size. Ferrari et al. (2004) have recommended that the cell flow and the voltage setting should be optimized for each species. To establish the parameters to obtain similar cell numbers when counted by the FC or by colony forming units (CFU) in plates, we tested different conditions until a satisfactory count was reached. The final settings were FSC = 951, SSC = 720, GFP = 868 and Texas-Red = 819, with threshold levels of 1000 in FSC and 3000 in SSC. Table 2 shows the comparison of the data obtained by CFU and FC counts for different strains and experiments, where similar results were obtained.

After the adequate settings were established, we performed mating experiments to determine if we could detect transconjugants. Matings were performed, and cells were counted by CFU and by FC. An example of the dot plots obtained (Fig. 3) clearly shows the separation of the donor, recipient and transconjugant populations. Dot plots of controls utilizing similar gates are also presented. In a donor population the red intensity was lower than in the mating experiment, but this did not perturb our results. To validate our approach, from the conjugation experiments we also counted bacteria by CFU. Table 2 shows that similar transfer frequencies were observed with both methods, FC or CFU.

3.5. In vivo evaluation of the system on plant surfaces

To visualize the *in vivo* appearance of transconjugants, we performed matings on plant roots. Germinated *P. vulgaris* seeds were inoculated with donor and recipient strains. As controls, roots were also inoculated separately with the mentioned strains. After 20 days, fluorescence microscopy was performed and transconjugants were detected on the plant roots inoculated simultaneously with the donors and recipients (Fig. 4).

4. Discussion

HGT has largely been studied using two approaches, evaluating directly how bacteria acquire genes or by analysis of genomic sequences, looking for incongruent phylogenetic relationships (Sorensen et al., 2005). CT has been studied mainly by tagging plasmids with antibiotics to assess their transfer under laboratory conditions. Attempts to visualize plasmid transfer by GFP expression in cultivable bacteria were first performed by Christensen et al. (1996). Jaenecke et al. (1996) described a system to analyze gene transfer between bacteria, using a *lacZ* reporter gene under the control of a synthetic promoter, constructed by fusing the *Pr* promoter of phage Lambda and an antisense RNA of the *tnp* gene from IS10. This promoter is repressed by chromosomally encoded regulators in the donor strain. Repression is relieved upon plasmid transfer to a recipient, allowing expression of the *lacZ* reporter in the transconjugants. However, the detection of plasmid transfer still needed cultivable bacteria. To get a deeper insight into the *in situ* evaluation of CT, Sorensen et al. (2003) proposed a genetic system to detect plasmid transfer events by tagging plasmids with a GFP marker whose expression is regulated by a repressible Lac promoter, and inserting the gene encoding the LacI repressor in the bacterial chromosome, resulting in cells that are non-fluorescent. When plasmid transfer is achieved, the recipient strain becomes fluorescent, as it inherits the plasmid carrying the GFP, but not the chromosome encoded repressor. More recently, Nanchaiah et al. (2003) adapted the system with a two fluorescent protein set; in this case, red fluorescence is encoded in the chromosome

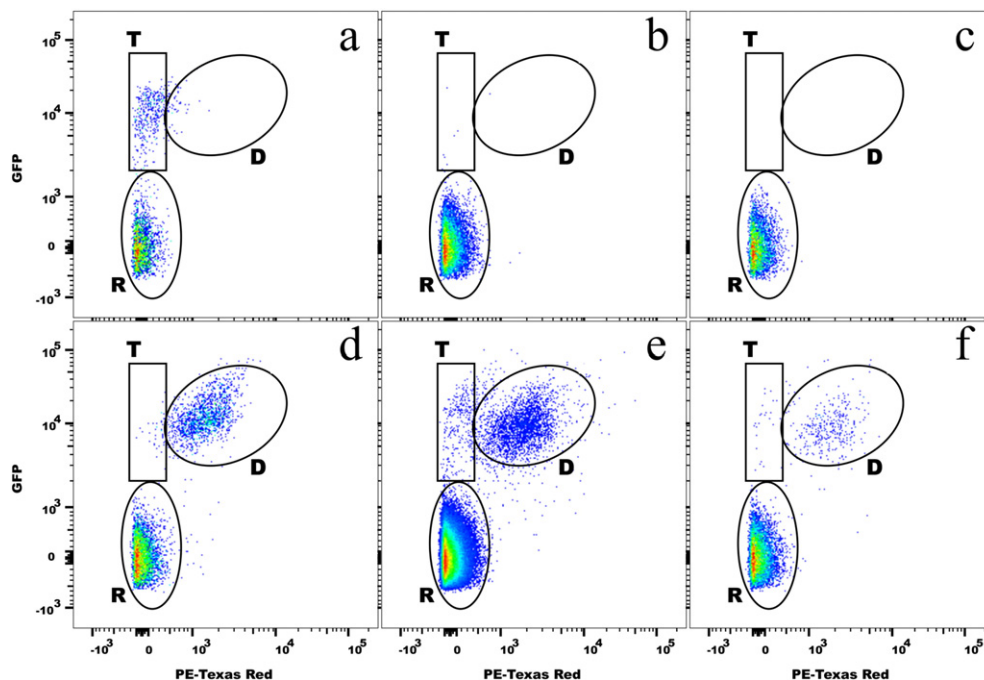


Fig. 3. Evaluation of rhizobial matings by FC. Dot plot of matings evaluated in the flow cytometer by PE-Texas Red and GFP parameters. Gates set up were T for transconjugants, D for donors and R for recipients and background events. The events counted were a) GMI (pRetA-pNptII-GFP) 2508, b) GMI 11,001, c) Blank solution 4047, d) CE3-RFP (pRetA-pNptII-GFP) 5985, e) 100 μ l of Mating among GMI and CE3-RFP (pRetA-pNptII-GFP), and f) 10 μ l of mating among GMI and CE3-RFP (pRetA-pNptII-GFP). Two dilutions of a mating are shown. Donor, recipient and transconjugant populations can be distinguished.

of the donor strain while GFP is expressed from the plasmid. After plasmid transfer, transconjugants express only the GFP, while donors express both fluorescent tags. A few studies appeared in the last year, which use FISH or FC to detect plasmid transfer (Klumper et al., 2015; Musovic et al., 2006, 2010; Shintani et al., 2014). All these studies have been performed using *Pseudomonas*, *Escherichia* or *Enterobacter* strains as donors.

In our laboratory, we have been interested in studying plasmid transfer in rhizobia. In order to test the effect of environmental conditions on rhizobial conjugation, we constructed a set of cassettes that contain a fluorescent protein gene under the control of different promoters, in addition to diverse antibiotic resistance genes. This allows the combination of different tags, maximizing the versatility of the system. The constructions were based on the previously described systems, but adapted for rhizobia. The cassettes developed here could also be used with other purposes as analyses of transcriptional fusions or single-cell tagging.

Our results show that in *E. coli* the Lac promoters and the *NptII* promoter presented a similar intensity, while the *Pr* promoter was very weak. Here, a dose-effect could be present, as fluorescent proteins are expressed from multi-copy plasmids. In contrast, in *R. etli* background only the *NptII* promoter showed a strong enough intensity to separate the GFP bacteria from the control by FC (Supplementary Fig. 3A). Hence, we discarded the system based on a repressible promoter for rhizobia because of the impossibility to separate donors from transconjugants, and focused on the dual tag system. Regarding the *mCherry*, even if its red fluorescence was detectable by microscopy, we could not detect it with the FC, and thus we used a MiniTn7-dsRED to tag the bacterial chromosome. The construction containing a MiniTn7-dsRED in the chromosome and promoter *NptII*-GFP in pRet42 was finally chosen and employed to check transfer in rhizobia.

Ferrari et al. (2004) previously reported that for cell counts in the FC special settings and a low flow has to be used. Also, recent studies (Klumper et al., 2015; Loftie-Eaton et al., 2014) used FC to count

bacteria, but neither of them employed rhizobial strains. Rhizobia are smaller than *E. coli* and *Pseudomonas*, and so, the optimization of FC settings became harder; high voltages have to be set, which implies a higher noise by the buffers employed. Nevertheless, after iteration of optimization cycles, settings allowing us to obtain similar cell counts by FC and by CFU were established, validating the system for counting single cell cultures of rhizobia. Also, analysis of mating experiments using this approach revealed that conjugation frequencies obtained by counting CFU in selective media or through FC were similar, validating the system for CT analysis by FC. This approach allowed us to measure CT in a few hours, instead of the usual 2–3 days required to grow bacteria in selective media. Finally, we evaluated our system *in situ*. We inoculated *P. vulgaris* plant roots with the donor and recipient strains, 20 days after inoculation fluorescence microscopy of the roots was performed, revealing the presence of transconjugants and a potential use to assess these events with different plants or under different conditions.

Two recent publications have used FC to detect and characterize CT in different environments (Klumper et al., 2015; Shintani et al., 2014). Shintani et al. (2014) used broad and narrow host range plasmids from incompatibility group IncP. They were able to detect non-cultivable transconjugants, and showed that the host range was broader than previously thought. New analysis by cell sorting and 16S rRNA gene pyrosequencing indicated that broad host range plasmids are able to transfer to very diverse bacteria from soils, reinforcing the importance of plasmids as mobile genetic pools (Klumper et al., 2015). Our future aim focuses on the evaluation of the natural host range of rhizobial plasmids, which have usually been described as being of narrow host range. The system presented here will also allow us to analyze different environments (e.g., plants, soil conditions) that may affect CT, under diverse laboratory or natural conditions, easily and in a faster way. This system is a valuable tool for the study of the mechanisms involved in the evolution and diversification of rhizobia, by measuring the impact of CT in natural environments, and detecting the factors that influence CT of the plasmids.

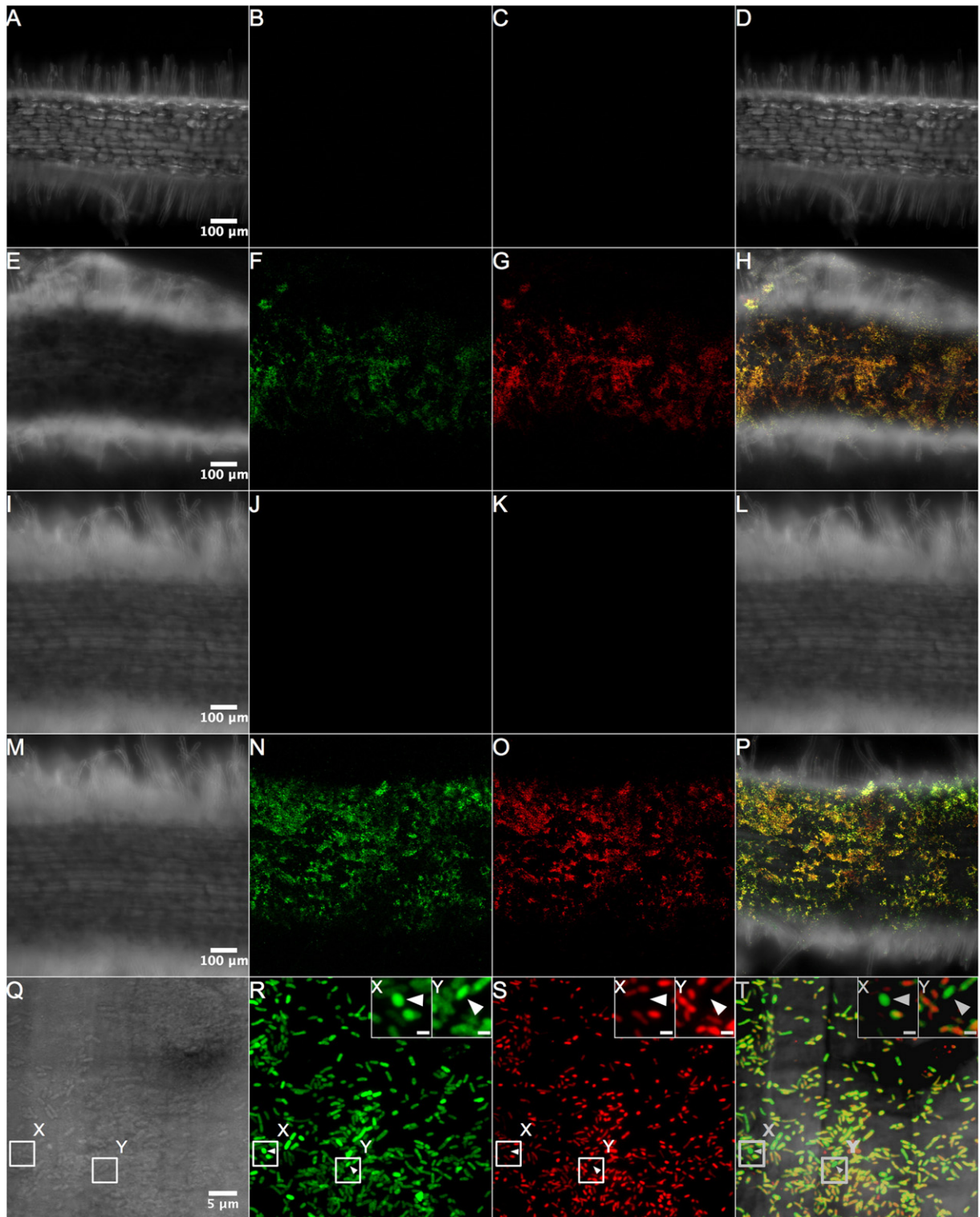


Fig. 4. Evaluation of rhizobial plasmid transfer on roots of *Phaseolus vulgaris*. Roots were inoculated with buffer (A–D), donor strain (E–H), recipient strain (I–L) and co-inoculated with donor and recipient (M–P). A zoom from image P is shown in Q–T and transconjugants are marked (X–Y). The columns are: first: visible field, second: green fluorescence, third: red fluorescence and fourth: merge. Bars indicate the size, except for X–Y that is 1 µm.

Acknowledgments

To Yvonne Rosenstein and Erika Melchy for use of the flow cytometer, to the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, UNAM and Xóchitl Alvarado for the confocal microscopy images, and to Fabiola Miranda-

Sánchez for help with the statistical analysis. This work was partially supported by PICT-2013-0113 to G. T. T., PICT-2012-0518 to M. P., grant IN203515 from DGAPA, UNAM to S. B. and by grant 188967 of a Bilateral Mexico–Argentina Cooperation, from CONACYT–CONICET. G. T. T. and M. P. are members of the Research Career of CONICET, Argentina.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.005>.

References

- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., Croughan, T.P., 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160, 63–67.
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., Molin, S., 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2240–2246.
- Bao, Y., Lies, D.P., Fu, H., Roberts, G.P., 1991. An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of Gram-negative bacteria. *Gene* 109, 167–168.
- Brom, S., Girard, L., Tun-Garrido, C., García-de los Santos, A., Bustos, P., González, V., Romero, D., 2004. Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J. Bacteriol.* 186, 7538–7548.
- Cardenas, L., Dominguez, J., Quinto, C., Lopez-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E., 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29, 453–464.
- Cervantes, L., Bustos, P., Girard, L., Santamaría, R.I., Dávila, G., Vinuesa, P., Romero, D., Brom, S., 2011. The conjugative plasmid of a bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain is assembled from sequences of two *Rhizobium* plasmids and the chromosome of a *Sinorhizobium* strain. *BMC Microbiol.* 11, 149.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Molin, S., 1996. Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker. *Gene* 173, 59–65.
- Danino, V.E., Wilkinson, A., Edwards, A., Downie, J.A., 2003. Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1J1 in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol. Microbiol.* 50, 511–525.
- Ding, H., Yip, C.B., Hynes, M.F., 2013. Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM. *J. Bacteriol.* 195, 328–339.
- Dombrecht, B., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2001. Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in Gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 426–430.
- Eckhardt, T., 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584–588.
- Fähraeus, G., 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381.
- Fellay, R., Frey, J., Krisch, H., 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52, 147–154.
- Ferrari, B.C., Oregaard, G., Sorensen, S.J., 2004. Recovery of GFP-labeled bacteria for culturing and molecular analysis after cell sorting using a benchtop flow cytometer. *Microb. Ecol.* 48, 239–245.
- Hynes, M.F., McGregor, N.F., 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4, 567–574.
- Jaenecke, S., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., Diaz, E., 1996. A stringently controlled expression system for analysing lateral gene transfer between bacteria. *Mol. Microbiol.* 21, 293–300.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., 1992. A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of Gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* 233, 293–301.
- Klumper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., Smets, B.F., 2015. Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME J.* 9, 934–945.
- Lambertsen, L., Sternberg, C., Molin, S., 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* 6, 726–732.
- Loftie-Eaton, W., Tucker, A., Norton, A., Top, E.M., 2014. Flow cytometry and real-time quantitative PCR as tools for assessing plasmid persistence. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5439–5446.
- Lopez-Fuentes, E., Torres-Tejerizo, G., Cervantes, L., Brom, S., 2015. Genes encoding conserved hypothetical proteins localized in the conjugative transfer region of plasmid pRet42a from *Rhizobium etli* CFN42 participate in modulating transfer and affect conjugation from different donors. *Front. Microbiol.* 5, 793.
- Miller, J.H., 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Musovic, S., Oregaard, G., Kroer, N., Sorensen, S.J., 2006. Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among Gram-positive and Gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6687–6692.
- Musovic, S., Dechesne, A., Sorensen, J., Smets, B.F., 2010. Novel assay to assess permissiveness of a soil microbial community toward receipt of mobile genetic elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4813–4818.
- Nancharaiyah, Y.V., Wattiau, P., Wuertz, S., Bathe, S., Mohan, S.V., Wilderer, P.A., Hausner, M., 2003. Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for *in situ* monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4846–4852.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A., 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158, 148–155.
- Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Olivares, J., Sanjuán, J., 2013. Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environ. Microbiol.* 15, 811–821.
- Pérez-Mendoza, D., Sepúlveda, E., Pando, V., Muñoz, S., Nogales, J., Olivares, J., Soto, M.J., Herrera-Cervera, J.A., Romero, D., Brom, S., Sanjuán, J., 2005. Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J. Bacteriol.* 187, 7341–7350.
- Pistorio, M., Torres Tejerizo, G.A., Del Papa, M.F., de Los Angeles Giusti, M., Lozano, M., Lagares, A., 2013. *rptA*, a novel gene from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* involved in conjugal transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* 345, 22–30.
- Prentki, P., Krisch, H.M., 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303–313.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernandez, L., Ballado, T., Soberon, G., Palacios, R., 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* 299, 724–726.
- Rosenberg, C., Huguet, T., 1984. The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumour induction. *Mol. Gen. Genet.* 196, 533–536.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A., 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73.
- Shintani, M., Matsui, K., Inoue, J., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., Nojiri, H., Kimbara, K., Ohkuma, M., 2014. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 138–145.
- Simon, R., Prierer, U., Pühler, A., 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Sorensen, S.J., Sorensen, A.H., Hansen, L.H., Oregaard, G., Veal, D., 2003. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and GFP as a reporter gene. *Curr. Microbiol.* 47, 129–133.
- Sorensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N., Wuertz, S., 2005. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 700–710.
- Torres Tejerizo, G., Pistorio, M., Althabegoiti, M.J., Cervantes, L., Wibberg, D., Schluter, A., Puhler, A., Lagares, A., Romero, D., Brom, S., 2014. Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 565–578.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V., Brom, S., 2003. Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 185, 1681–1692.
- van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Starodub, M.E., 1988. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Lett.* 53, 299–306.
- van Elsas, J.D., Nikkel, M., Van Overbeek, L.S., 1989. Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and the occurrence of homology to RP4 in soil bacteria. *Curr. Microbiol.* 19, 375–381.
- Wu, G., Wolf, J.B., Ibrahim, A.F., Vadasz, S., Gunasinghe, M., Freeland, S.J., 2006. Simplified gene synthesis: a one-step approach to PCR-based gene construction. *J. Biotechnol.* 124, 496–503.