

11281
43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE
NITROGENO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

MECANISMO DE REGULACION DE LA
TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO A DE *Rhizobium*
etli CEPA CFN42.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
CRISTINA SOLEDAD TUN GARRIDO

TUTOR: DRA. SUSANA BROM KLANNER

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MORELOS.

ENERO DEL 2003

A





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Cristina Salcedo

Tus Genes

FECHA: 20 de Enero de 2003

FIRMA: [Firma]

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM como parte de los estudios del Programa de Genética Molecular y Plásmidos Bacterianos, bajo la dirección de la Dra. Susana Brom Klanner.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y otra de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

Agradecimientos

A mis padres Juan y Soledad y a mis hermanos Cecy, Gaby y Juan por haber apoyado mis decisiones y por compartir todos mis sueños.

A Edgar por haber sido en los últimos años el principal apoyo, particularmente en los momentos más difíciles, por haberme enseñado a aprender de mis errores y sobre todo por compartir nuestra vida.

A Karina, Vero y Lucy, por haberme brindado su amistad incondicional, porque me han enseñado a crecer como ser humano y por tantos momentos felices e inolvidables que me han brindado.

A Laura y Javier por haber hecho que las largas horas en el laboratorio fueran tan divertidas y por todas aquellas ocasiones en que su intervención fue necesaria para el éxito del experimento.

A Susy Brom por sus enseñanzas, su apoyo, su confianza y su inagotable paciencia.

A la familia Valencia Morales por haberme abierto las puertas de su hogar y recibirme como un miembro más de su familia.

A la Dra. María de Lourdes Girard y al Dr. Jaime Martínez por sus valiosas e innumerables sugerencias durante la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial Dr. Luis Servín y Dr. Miguel Angel Cevallos por contribuir con sus críticas y sus conocimientos a la culminación de este trabajo.

A los miembros del jurado Dr. Fernando Bastarrachea, Dr. Miguel Angel Cevallos, Dra. Gloria Soberón, Dra. Guadalupe Espín, Dr. Guillermo Dávila y Dr. Otto Geiger por el tiempo dedicado para la revisión de esta tesis y por sus enriquecedores comentarios.

Al Dr. David Romero y a todos quienes forman parte del Programa de Genética Molecular y Plásmidos Bacterianos por compartir el espacio y las experiencias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

INDICE

	Página
Resumen	2
Abstract	3
Introducción	
Transferencia conjugativa	4
El Fenómeno de "Quorum sensing"	8
Transferencia del pTiC58 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
Generalidades de <i>Rhizobium</i>	15
Plásmidos movilizables en <i>Rhizobium</i>	16
El genoma de <i>Rhizobium etli</i>	17
Objetivos	19
Resultados	
1. Artículo. "THE CONJUGATIVE TRANSFER OF p42a FROM <i>Rhizobium etli</i> CFN42, WHICH IS REQUIRED FOR MOBILIZATION OF THE SYMBIOTIC PLASMID, IS REGULATED BY "QUORUM SENSING"	21
2. Resultados Adicionales	
Descripción de pC-13	33
Efecto de pC-13 en la transferencia del pSym	37
Análisis del origen de Transferencia	41
Discusión y Perspectivas	44
Conclusiones	48
Referencias	49

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La transferencia conjugativa es un proceso de movilización de DNA que requiere de contacto directo entre las superficies bacterianas. Frecuentemente, el material genético transferido es el que se encuentra en plásmidos.

Rhizobium etli CFN42 es una bacteria capaz de fijar nitrógeno y de nodular las raíces de *Phaseolus vulgaris*. El genoma de esta cepa se compone de un cromosoma y seis plásmidos (p42a-p42f). El p42d se ha definido como el plásmido simbiótico (pSym), ya que lleva la mayor parte de la información genética requerida para el establecimiento de una relación simbiótica eficiente. Solamente uno de estos plásmidos, el plásmido A o p42a, es capaz de autotransferirse en condiciones de laboratorio, su frecuencia de transferencia es alta y además este plásmido ayuda a la transferencia del pSym.

El objetivo de este trabajo fue conocer el mecanismo que regula la transferencia del p42a. Para lo cual se aisló y secuenció un cósmido nombrado como pC-13, que lleva todos los genes necesarios para la autotransferencia del p42a y para la movilización del pSym mediante la formación de cointegrados. El análisis de la secuencia mostró que los genes de transferencia del p42a tienen una alta similitud con los genes *tra* y *trb* del pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se localizaron cuatro genes reguladores, tres de los cuales (*traR*, *tral* y *cinR*) codifican para proteínas de la familia LuxI-LuxR. El cuarto gen, *traM*, que codifica para un antiactivador de los genes de transferencia no se expresa bajo las condiciones probadas, por lo que el p42a parece ser un plásmido desreprimido para transferencia conjugativa.

Para analizar los patrones de regulación, se construyeron derivadas con mutaciones en cada de los cuatro genes reguladores, así como derivadas con cada uno de ellos fusionados a un gen reportero.

Los experimentos realizados mostraron que la transferencia del p42a es un proceso dependiente de densidad celular. El gen *tral* codifica para una proteína responsable de la síntesis de la 3-oxo-homoserino lactona. *TraR* y *CinR* son reguladores transcripcionales que actúan a un mismo nivel de regulación, ambas proteínas son necesarias para que la transferencia se lleve a cabo.

Finalmente, se sugiere que entre los *oriT* del p42a y del pSym existen diferencias importantes que les impide ser reconocidos por una misma nicasa.

ABSTRACT

Conjugative transfer allows DNA exchange between bacteria. This process requires intercellular contact. Frequently, the transferred genetic material is localized in plasmids.

Rhizobium etli CFN42 is a bacterium able to fix nitrogen and to nodulate roots of *Phaseolus vulgaris*. This strain contains one chromosome and six plasmids (p42a-p42f). p42d has been identified as the symbiotic plasmid (pSym), since it carries most of the genetic information required to establish an efficient symbiotic relationship. Only one of these plasmids, plasmid A or p42a, is able to self-transfer under the experimental conditions tested, its transfer frequency is high, this plasmid also functions as helper for pSym transfer.

The objective of this work was to understand the regulation of the transfer mechanism of p42a. A cosmid clone was isolated and sequenced. This cosmid was named pC-13 and it was demonstrated that it carries all the genes required for self-transfer of p42a. It is also able to induce mobilization of the pSym through cointegrate formation. Sequence analysis showed that transfer genes of p42a are homologous to transfer genes of pTiC58 from *Agrobacterium tumefaciens*. Four putative regulatory genes were identified; three of these (*traI*, *traR* and *cinR*) belong to the LuxR-LuxI family. The fourth gene, *traM*, encodes for an antiactivator of transfer genes. TraM was not expressed under the experimental conditions tested. Thus, p42a seems to be depressed for conjugal transfer.

To analyze the regulatory patterns, we constructed derivatives carrying mutations in each one of the regulator genes and transcriptional fusions of the regulatory genes to a reporter gene. Results of these experiments showed that transfer of p42a is a cell density-dependent process. *traI* encodes a protein responsible of 3-oxo-homoserino lactone synthesis. TraR and CinR are transcriptional regulators; both of them act at the same regulatory level, and both are required for transfer.

Finally, we found that there are important differences between the *oriT* of p42a and the *oriT* of the pSym, and we suggest that these differences prevent them from being recognized by the same nickase.

INTRODUCCION

La Transferencia Conjugativa.

El intercambio de DNA entre bacterias puede darse a través de varios procesos como son conjugación, transformación y transducción. Estos procesos son de gran importancia ecológica y evolutiva ya que promueven el intercambio de información genética entre bacterias de la misma especie y en algunos casos entre especies o géneros diferentes.

El proceso de transferencia mejor caracterizado es el del plásmido F de *Escherichia coli* y los plásmidos relacionados cercanamente como R1, R100 o ColB2. El plásmido F tiene cerca de 100 kb de las cuales una tercera parte (33 kb) codifica para genes involucrados en su movilización (Firth *et al.*, 1996). En general este proceso es similar para todos los plásmidos autotransferibles aunque hay variaciones en los genes que participan en cada etapa, así como en el mecanismo que regula el inicio de la conjugación.

La transferencia conjugativa implica el contacto directo entre la célula donadora que contiene el DNA movilizable y la receptora, libre de este DNA. Este contacto se facilita gracias a una estructura específica llamada puente de conjugación o pilus el cual se produce en la célula donadora, uniendo a las dos células (donadora y receptora), lo que permite la transferencia del material genético como DNA de cadena sencilla, a partir de la cual se sintetiza la cadena complementaria en la célula receptora (Firth *et al.*, 1996) (Figura 1). El material genético movilizable puede ser de diferente naturaleza, desde pequeños plásmidos hasta fragmentos de cromosoma e incluso el cromosoma completo.

La interacción entre la punta del pilus y la superficie de la célula receptora parece inducir el contacto entre ambas células. En el plásmido F se sabe que la proteína TraA es una precursora de la pilina llamada prepilina que requiere para su procesamiento los productos de *traQ* y *traX* (Maneewannakul *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1993). Los genes *traB*, *traC*, *traE*, *traF*, *traH*, *traK*, *traL*, *traU*, *traV*, *traW*, *trbY* y *trbC* participan en el ensamblaje de las subunidades de pilina para formar el pilus (Anthony *et al.*, 1996, Frost *et al.*, 1994).

La retracción sucesiva del pilus ocasionada por la despolimerización de la subunidad de pilina, lleva al acercamiento y eventualmente a la formación de agregados

entre donadora y receptora (pareja conjugativa). En dichos agregados, la superficie de ambas se encuentra en contacto directo y llegan a ser lo suficientemente estables para resistir fuerzas de ruptura. Para la estabilización de la pareja conjugativa, se requieren las proteínas TraG y TraN que interactúan con la superficie de la célula receptora (Maneevannakul *et al.*, 1992).

La movilización del DNA se inicia en respuesta a alguna señal generada por el contacto entre la pareja conjugativa. Para iniciar la transferencia, el DNA de cadena doble debe cortarse en un sitio específico llamado *nic* que comprende alrededor de 10 pb. El sitio de corte, es un sitio de reconocimiento de la proteína relaxasa/helicasa, que en el caso particular del plásmido F es Tral (Sherman & Matson, 1994). Las helicasas suelen ser muy específicas para cada sitio *nic* y catalizan la unión covalente del extremo 5' a sí misma para iniciar la transferencia hacia la célula receptora en dirección 5'-3'. Se sugiere que durante la transferencia esta proteína debe asociarse con el sitio de conexión intercelular a través del cual se moviliza la cadena sencilla de DNA. Como está unida al extremo 5' del sitio *nic*, también puede catalizar la recircularización de la cadena transportada al terminar la transferencia. La síntesis de la cadena reemplazada en la donadora y la cadena complementaria en la receptora depende de las enzimas del huésped y no es esencial para la transferencia por sí misma.

El sitio de corte se localiza dentro de una región llamada origen de transferencia u *oriT*, en la cual se unen todas las proteínas necesarias para permitir el reconocimiento y unión de la helicasa al sitio *nic*. Este complejo DNA-proteínas se conoce como relaxosoma. En el plásmido F se sabe que participan TraM, TraD y TraY en la formación del relaxosoma (Firth *et al.*, 1996).

La región del *oriT* sólo está conservada en plásmidos relacionados cercanamente; sin embargo, la secuencia del sitio de corte o *nic* está muy conservada aun en plásmidos distantes y es una región rica en AC. La región del *oriT* típicamente contiene un número de secuencias repetidas inversas o directas cuya función no se conoce aún con certeza, pero se cree que algunas de las proteínas que forman el relaxosoma podrían identificarlas (Firth *et al.*, 1996).

Un proceso conocido como exclusión de superficie impide el contacto entre superficies de células que llevan el mismo plásmido conjugativo. La expresión del gen

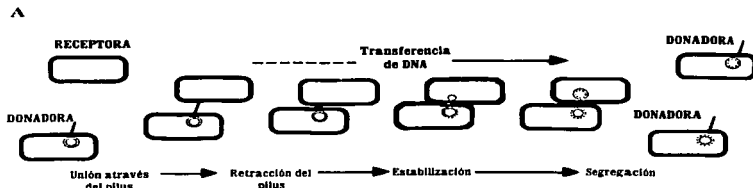
traT del plásmido F impide que se formen los agregados mediante el bloqueo de la unión del pílus al receptor. Mientras que el producto de *traS* previene que la proteína TraI efectúe el corte (Frost *et al.*, 1994).

La transferencia está controlada por los productos de los genes *traJ*, *traY*, *finO* y *finP*. TraJ es un regulador positivo de la transcripción que activa el operón *tra* cuyo primer producto es *traY* y que incluye todos los genes que intervienen en la transferencia, excepto *traM* el cual es activado por TraY. *finO* y *finP* han sido definidos como inhibidores de la fertilidad. La proteína FinO se une al transcrito de *finP* para estabilizar su estructura secundaria, este transcrito a su vez se une a TraJ impidiendo su actividad. Por esta razón la transferencia de muchos plásmidos cercanamente relacionados a F está reprimida, sin embargo, en el plásmido F, *finO* se encuentra interrumpido por una secuencia IS3 y como consecuencia la transferencia de este plásmido está desreprimida (Firth *et al.*, 1996).

La transferencia conjugativa de DNA requiere de dos tipos de elementos: 1) elementos en "trans" que involucran los productos de los genes *tra* y *trb*, requeridos para el corte y movilización del DNA, para la formación del puente de conjugación y los genes reguladores y 2) elemento en "cis" que consiste en la región, ya descrita, denominada *oriT*.

De acuerdo a su capacidad de movilización, los plásmidos pueden clasificarse en tres categorías (Porter, 1991):

1. Plásmidos conjugativos: Poseen los genes necesarios para que la cepa donadora efectúe el contacto específico indispensable para la transferencia del DNA a la célula receptora (genes *tra* y *trb*) pero no poseen la región del *oriT*. A estos plásmidos también se les conoce como "helpers" ya que son capaces de complementar la función de transferencia de los plásmidos movilizables.
2. Plásmidos movilizables: Son aquellos cuyo DNA posee la región necesaria para ser transferido o movilizado a una célula receptora, o sea el origen de transferencia u *oriT*, pero no los genes necesarios para iniciar dicha transferencia.
3. Plásmidos autotransferibles: Son capaces de promover su transferencia autónoma, es decir, son conjugativos y movilizables.



B

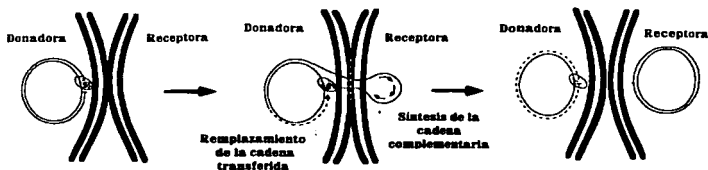


Figura 1. Etapas de la transferencia conjugativa. A) El contacto intercelular comienza cuando la punta del pilus producido por la célula donadora interactúa con la superficie de la célula receptora, la retracción del pilus acerca progresivamente ambas células. La interacción entre las superficies estabiliza la asociación entre ambas células durante la transferencia de DNA. Después de que la transferencia de DNA se ha concluido, un proceso activo separa el par conjugativo. Ahora ambas son donadoras. B) El evento de la transferencia de DNA comienza cuando el contacto establecido por el pilus, transmite una señal de conjugación a un complejo proteínico que incluye la relaxasa. Este estimula el desplazamiento de una cadena sencilla de DNA, la cual pasa a la célula receptora. Después del corte, la relaxasa permanece adherida al extremo 5' del *oriT*. La transferencia termina cuando la cadena transferida se recirculariza de nuevo (Tomado de Firth *et al.*, 1996).

El fenómeno de "Quorum sensing".

Las bacterias tienen la habilidad para detectar y adaptarse a las constantes fluctuaciones ambientales. A través de la evolución han desarrollado la capacidad de detectar las variaciones del medio donde se desarrollan, e iniciar cascadas de señales moleculares que llevan a cambios en la expresión de los genes. Uno de los parámetros que las bacterias perciben y controlan es su densidad poblacional. A altas densidades de población las bacterias producen, liberan, detectan y responden a ciertas moléculas conocidas como autoinductores.

En 1970, Nelson *et al.*, describieron por primera vez un proceso controlado por autoinducción, en este caso fue un fenómeno de luminiscencia en una bacteria marina que coloniza órganos de algunos peces marinos y cefalópodos: *Vibrio fischeri*. Esta bacteria produce un compuesto difusible llamado autoinductor, que secreta al ambiente y se acumula a medida que la población crece. Cuando la población alcanza cierta densidad, la concentración de autoinductor es la suficiente para activar los genes responsables de producir la luminiscencia (*lux*) entre los cuales se encuentra el propio *luxI*, el gen responsable de la síntesis del autoinductor, como consecuencia el autoinductor aumenta su propia síntesis, es decir, se autoinduce.

Este tipo de respuesta ha sido encontrado en muchos otros sistemas en los últimos años, el esquema general parece estar conservado: Las bacterias producen cantidades basales de "señales moleculares" o autoinductores que se liberan al exterior. La acumulación de estos compuestos les permite detectar su propia densidad de población y cuando alcanzan cierto umbral, el autoinductor interactúa con un activador transcripcional para activar la expresión de genes específicos involucrados en una gran variedad de procesos tales como bioluminiscencia, producción de antibióticos, transferencia conjugativa, etc. y además aumenta la expresión de los genes involucrados en la síntesis del autoinductor y del regulador transcripcional. A este proceso se le conoce como regulación de genes dependientes de densidad celular o "Quorum sensing" (Figura 2).

El proceso de "Quorum sensing" es muy común en la naturaleza particularmente en proteobacterias que se relacionan con hospederos eucariontes. En *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno humano oportunista, se han descrito dos sistemas jerárquicos de

“Quorum sensing”: el primero llamado LasI-LasR controla al segundo sistema RhlI-RhlR y ambos regulan la expresión de genes involucrados en la producción de una gran variedad de factores de virulencia como son: proteasas, hemolisinas, exotoxinas, elastasa, etc., así como la formación y manutención de biofilms (Pesci *et al.*, 1997).

Erwinia carotovora, un patógeno de plantas emplea un sistema de “Quorum sensing” llamado CarR-CarI, para la producción de un antibiótico que le permite eliminar la competencia de otras bacterias por el sitio de infección en la planta. Este sistema también regula la producción de exotoxinas (Reverchon *et al.*, 1998).

Serratia liquefaciens, es un oportunista patógeno de animales. El sistema de “Quorum sensing” de esta bacteria induce en las células una diferenciación que les permite moverse por “swarming” sobre superficies sólidas. Presumiblemente, este comportamiento les permite una óptima diseminación cuando la población llega a ser demasiado grande para ocupar un solo sitio y las bacterias requieren movilizarse para colonizar nuevos sitios. Este sistema SwrR-SwrI, también regula la expresión de al menos 28 proteínas (Givskov *et al.*, 1997; Eberl *et al.*, 1996).

Este tipo de sistemas se han hallado en varias especies de Rhizobiaceas. En *Rhizobium leguminosarum*, se han localizado los genes *cinR* y *cinI* en el cromosoma los cuales iniciar una compleja cascada regulatoria; el producto de *cinI* es responsable de la síntesis de la 7-*cis*-C₁₄-homoserino lactona que a su vez regula otro sistema, RhlR-RhlI, localizado en el plásmido autotransferible pRL1JI (Lithgow *et al.*, 2000).

El Autoinductor. En las proteobacterias el tipo de autoinductor más común es alguna homoserino lactona acilada o acil-HSL (Fuqua *et al.*, 1996). La estructura general de estos compuestos consiste en una cadena de acilos unida mediante un enlace amido a una homoserina lactonizada.

Las acil-HSLs producidas por diferentes bacterias pueden diferir con respecto a la longitud de la cadena de acilos, la naturaleza de la sustitución en el carbono 3 y/o la presencia o ausencia de una o más insaturaciones en dicha cadena. Algunas bacterias producen solo un tipo de compuestos acil-HSL, mientras que otras producen varias como el caso de *Rhizobium etli* CNPAF512 que produce 7 compuestos (Rosemeyer *et al.*, 1998).

Para la síntesis de acil-HSL, se requiere una proteína miembro de la familia LuxI. Todas las proteínas de la familia LuxI dirigen la síntesis de acil-HSL específicas. Su función es catalizar la ligación de S-adenosilmetionina (SAM) y una cadena de ácidos grasos derivada de una proteína acarreadora de grupos acilos (ACP). Los estudios de la expresión de *luxI* y los genes homólogos de diversas especies han demostrado que LuxI es necesario y suficiente para dirigir la síntesis de acil-HSL, esto implica que los sustratos para la síntesis son intermediarios de las rutas metabólicas comunes, al menos en las proteobacterias. La cadena de acilos se obtiene del acil-ACP de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos (More *et al.*, 1996). Esto se sabe porque compuestos que inhiben esta ruta, también bloquean la síntesis de acil-HSL y no así compuestos que bloquean la vía de la β -oxidación. En cuanto al anillo de HSL, este es proporcionado por una molécula SAM, que a su vez es intermediario en la interconversión treonina-metionina. Se sabe que solamente mutaciones que bloquea la síntesis de metionina ocasionan que la cepa no sintetice acil-HSL. Las mutaciones en cualquier otro intermediario distinto de SAM no tienen ningún efecto (Val and Cronan, 1998).

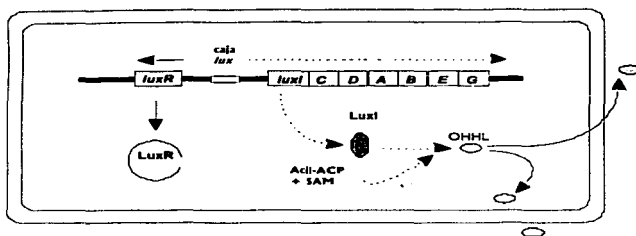
El Activador Transcripcional. En los últimos años se han descrito varios homólogos de LuxR. Todas ellas poseen una región de interacción con la acil-HSL en el extremo amino terminal y un dominio hélice-vuelta-hélice de unión a DNA en el extremo carboxilo terminal. LuxR es un polipéptido esencialmente citoplásmico aunque se ha sugerido que podría estar asociado a membrana y que al pegarse, las moléculas de acil-HSL alteran esta asociación y LuxR se separa de la membrana. Las proteínas tipo LuxR, requieren de GroL y GroES para poder doblarse y adquirir su conformación activa. Sus carboxilos terminales son homólogos a dominios de unión al DNA de un grupo de reguladores transcripcionales entre los que se incluyen FixJ, NarL, etc. (Fuqua *et al.*, 1994).

En la mayoría de los casos, la unión de la acil-HSL a las proteínas de la familia LuxR, causa en estas últimas cambios conformacionales y estimula la multimerización. La proteína requiere estar en forma de dímero para poder unirse a DNA, por lo tanto la unión de la acil-HSL se necesita para la activación mediada por las proteínas de la familia LuxR.

Las cajas *lux*. Un tercer elemento requerido para este tipo de autoinducción es un elemento de DNA que actúa en "*cis*". Los miembros de la familia LuxR requieren una

secuencia de DNA asociada al gen blanco para activar la transcripción. La caja *lux* es una secuencia invertida repetida de aproximadamente 20 pb localizada corriente arriba del inicio de transcripción del operón. Esta caja se ha encontrado en la mayoría de los genes regulados por proteínas de la familia LuxR y su tamaño varía entre 18 y 22 pb. La secuencia de estas cajas esta conservada en la mayoría de los casos, sin embargo existen algunos genes cuya regulación claramente depende de un miembro de la familia LuxR pero sus cajas no son fácilmente identificables (Whitehead *et al.*, 2001).

A. Baja Densidad



B. Alta densidad.

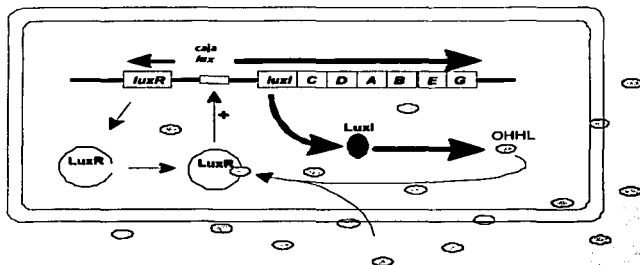


Figura 2. Como ejemplo se presenta la regulación de la bioluminiscencia de *V. fischeri*: A) A baja densidad celular, la transcripción de los genes para la bioluminiscencia (*luxICDABEG*) es baja e insuficiente para la emisión de la luz debido a los bajos niveles del autoinductor *N*-(3-oxohexanoyl-L-homoserino lactona (OHHL). B) A alta densidad celular, se alcanza una concentración crítica del autoinductor. El autoinductor se une a LuxR y estimula la transcripción de *luxICDABEG*, lo que lleva a un rápido aumento en la producción del autoinductor y a la emisión de luz (Tomado de Whitehead *et al.*, 2001): ACP=Proteína acarreadora de grupos acilos, SAM=S-adenosilmetionina.

Transferencia de pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens*.

A. tumefaciens es una bacteria de la familia Rhizobiaceae capaz de formar tumores en plantas superiores mediante la invasión del tejido vegetal. Las cepas de *A. tumefaciens* tienen un plásmido llamado pTi (del inglés tumor induction) en el cual se localizan genes que permiten la transferencia de DNA a través de dos procesos independientes.

El primero de estos procesos, involucra a los genes *vir* que codifican para proteínas que permiten transferencia de cierta región de DNA plasmídico conocida como T-DNA. Algunas de las proteínas Vir reconocen señales producidas por tejidos dañados de la planta y desencadenan una cascada de señales que lleva a la expresión de otras proteínas Vir que cortan los bordes de la región del T-DNA y la transportan como cadena sencilla a la célula vegetal a través de unos poros formados principalmente por proteína VirB (Weising & Kahl, 1996). El T-DNA se inserta por recombinación ilegítima en el genoma de la célula vegetal. La expresión de los genes contenidos en el T-DNA dentro de la célula hospedera, induce el crecimiento del tejido vegetal lo cual ocasiona la formación del tumor y además dirige la síntesis de las opinas que son compuestos utilizados por las bacterias como fuente de carbono y nitrógeno.

La presencia de las opinas estimula el segundo proceso de transferencia, la transferencia conjugativa del pTi entre la población de agrobacterias que permanece en el exterior de la planta. En el pTi están codificados también, todos los genes necesarios para este segundo proceso de transferencia (*tra* y *trb*).

La conjugación de *Agrobacterium* requiere de un factor de conjugación autoinducible, que se ha sido identificada como una 3-oxo-octanoil-HSL. La síntesis del factor de conjugación depende de la presencia de una homoserina lactona sintasa codificada por el gen *traI* que pertenece a la familia de LuxI (Piper *et al.*, 1993).

Estudios realizados por Piper *et al.*, (1993), indican que los genes *tra* son regulados positivamente por el activador transcripcional TraR perteneciente a la familia de LuxR (Greene y Zambryski, 1993); este gen activa por lo menos tres promotores en el pTiC58.

Piper & Farrand (2000) demostraron que la transferencia conjugativa del plásmido pTiC58, así como la inducción de los genes de transferencia son dependientes

de la densidad de población y que ambos procesos pueden ser inducidos a densidades bajas si se adiciona el autoinductor al medio, quedando en claro que ambos responden a un mecanismo de "quorum sensing".

El mecanismo de regulación de los genes de transferencia en el pTiC58 se efectúa de la siguiente manera: mientras no hay opinas presentes, los genes para el catabolismo de las mismas y los genes involucrados en la transferencia del plásmido están reprimidos fuertemente por el represor AccR. Después de la inserción del T-DNA, la planta comienza a producir y secretar opinas, cuando éstas son abundantes entran libremente a las células bacterianas y se unen al represor AccR; esto lleva a la desrepresión de los genes involucrados en la utilización de las opinas y del gen que codifica para el regulador transcripcional TraR. El autoinductor se produce constantemente a un nivel basal pero cuando aumenta la producción de TraR y se une al autoinductor, este complejo también aumenta la expresión del gen *traI*, responsable de la síntesis del autoinductor y además induce la expresión de todos los genes *tra* y *trb* responsables de la transferencia del pTi (Greene & Zambrysky, 1993. Figura 3).

Otro gene involucrado en la regulación de la transferencia en *Agrobacterium*, es *traM*. Este gen está presente tanto en el pTiC58 como en el pTiR10 con un 78% de identidad entre ambos (Hwang *et al.*, 1995) y codifica para una proteína que regula negativamente la expresión de los genes *tra*. Este regulador negativo parece inactivar TraR impidiendo que se una al autoinductor y evitando así que forme los dímeros activos. Debido a eso es necesario que exista dentro de la célula un exceso de TraR para contrarrestar el efecto de TraM. Eso explicaría porque la conjugación no ocurre en ausencia de las opinas, ya que cuando estas no se producen, la expresión de *traR* solo se da a un nivel basal y TraM inactiva la pequeña cantidad de producto, previniendo la expresión de los genes de transferencia. Cuando las opinas están presentes, se desreprime la expresión de *traR* y se produce la proteína en cantidades suficientes para que no haya efecto por TraM y entonces pueda inducirse la expresión de los otros operones involucrados en la transferencia (Piper & Farrand, 2000).

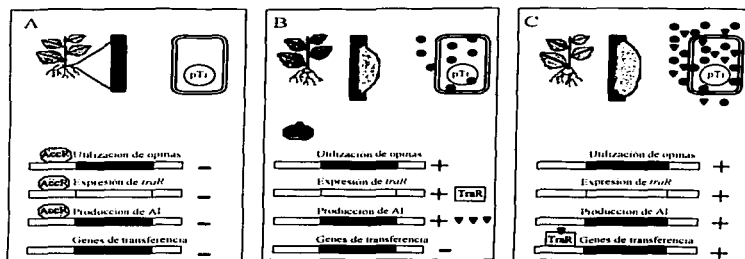


Figura 3. Durante el establecimiento del callo en plantas infectadas por *Agrobacterium*, las señales de "Quorum sensing" juegan un papel en la inducción de la expresión de los genes requeridos para utilización de opinas y la conjugación de plásmido. A) En una planta no-transformada, el represor AccR codificado en el plásmido Ti reprime la expresión de los genes para la utilización de opinas, para la producción del autoinductor (AI) y para la producción de regulador TraR. B) En el sitio de infección de una planta recientemente transformada, la planta produce las opinas (●), que son secuestradas por la bacteria y se unen a AccR. C) En un callo establecido, las opinas propician una alta densidad poblacional de *Agrobacterium*, y la bacteria comienza a producir altos niveles del autoinductor (▼), el cual, al alcanzar una concentración crítica, se une a TraR ocasionando la activación de los genes de la transferencia conjugativa y es entonces cuando la conjugación se lleva a cabo. (Tomado de Greene & Zambrysky, 1993).

Generalidades de *Rhizobium*.

Las especies de *Rhizobium* son bacterias Gram-negativas del suelo, fijadoras de nitrógeno, y capaces de formar nódulos en raíces de plantas leguminosas, al establecer una relación simbiótica con su planta hospedera. El orden de los Rhizobiales es parte de la clase Alphaproteobacterias y contiene las siguientes familias: Rhizobiaceae, Bartonellaceae, Brucellaceae, Phyllobacteriaceae, Methylocystaceae, Beijerinckiaceae, Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae y Rhodobiaceae. El género *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* pertenecen a la familia Rhizobiaceae;

Mesorhizobium a la familia Phyllobacteriaceae y *Bradyrhizobium* a la familia Bradyrhizobiaceae (Garrity, 2001).

En los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, la mayoría de los genes para nodulación y fijación de nitrógeno están localizados en plásmidos de elevado peso molecular (de 180 kb a 1.3 Mb) llamados plásmidos simbióticos o pSym. Algunos otros genes importantes para la simbiosis pueden estar en otros plásmidos o en el cromosoma. Mientras que en *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium* los genes para la nodulación y fijación de nitrógeno se encuentran en cromosoma con excepción de *M. amorphae* que tiene un pSym de 930 kb. Típicamente, las cepas de *Bradyrhizobium* no sólo no tienen un plásmido simbiótico sino que carecen de otros plásmidos.

Los plásmidos no simbióticos suelen llevar material relevante para diversas funciones tales como utilización de metabolitos de la planta, compuestos aromáticos y diversos azúcares y frecuentemente, a pesar de no ser indispensables para la nodulación si tienen un efecto en la misma y son necesarios para una óptima relación simbiótica. (García de los Santos *et al.*, 1996).

Otra de las características importantes del genoma de *Rhizobium* es la presencia de secuencias reiteradas de DNA y de elementos transponibles, lo cual lleva a frecuentes rearrreglos genómicos.

En algunos casos, los genes para la simbiosis se localizan en transposones conjugativos sitio-específicos, llamados islas simbióticas, insertos en el cromosoma. Este arreglo permite la movilización de la isla simbiótica como se ha observado en la isla simbiótica de *M. loti* tanto en condiciones de laboratorio como en el suelo (Sullivan *et al.*, 1998; Sullivan *et al.*, 1995).

Plásmidos movilizables de *Rhizobium*.

La movilización de los plásmidos simbióticos parece ser un proceso común entre las poblaciones de *Rhizobium* en el suelo. En el plásmido simbiótico pNGR324a de *Rhizobium* Sp. NGR234, se han localizado genes de transferencia identificados por su alta homología con los genes *tra* y *trb* del pTiC58 de *A. tumefaciens*, (Freiberg *et al.*, 1997). En *R. leguminosarum* bv. viceae y *R. leguminosarum* bv. trifolii se han reportado plásmidos movilizables (Johnston, 1982, Hooykaas, 1981). Por otra parte, varios estudios

de poblaciones de *Rhizobium* han demostrado la presencia de plásmidos similares en diferentes fondos genómicos, lo cual sugiere la ocurrencia de transferencia horizontal durante la diversificación de poblaciones naturales de *Rhizobium* en suelo (Geniaux *et al.*, 1993; Herrera-Cervera *et al.*, 1999).

En *Sinorhizobium meliloti* se han identificado los genes *traR* y *traM*, homólogos a genes reguladores de la transferencia del pTiC58 y que forman parte de un sistema de "Quorum sensing", se propone que este sistema podría regular transferencia aunque esto no ha sido demostrado experimentalmente (Marketon & González, 2002).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* parece existir una red de regulación compleja formada por varios sistemas de "Quorum sensing". Uno de ellos, CinR-CinI, se ha localizado en el cromosoma. Mutaciones en *cinI* tanto en la donadora como en la receptora, se requieren para que disminuya la frecuencia de transferencia del plásmido autotransferible pRL1J1. En este plásmido se encuentra un operón *tral-trb* homólogo al del plásmido pTi de *A. tumefaciens*. Adyacentes a los genes *trb* se localizan los genes que codifican para otros reguladores transcripcionales de la familia LuxR, *bisR* y *triR*, necesarios para la transferencia del pRL1J1 ya que mutaciones en cualquiera de ellos, así como mutaciones en *tral* inhiben la transferencia del plásmido. Estos sistemas, y otro localizado en un plásmido no simbiótico, RaiR-RaiI influyen en otras funciones celulares, además de la transferencia, como crecimiento y nodulación (Wilkinson *et al.*, 2002; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2002).

La transferencia del pTiC58 de *A. tumefaciens*, que se ha descrito es, hasta el momento, el sistema mejor caracterizado de todas las rhizobiaceas.

El genoma de *Rhizobium etli*.

La cepa *R. etli* CFN42 forma nódulos en raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), su genoma está compuesto de un cromosoma y seis plásmidos llamados plásmido A o p42a (194 kb), p42b (aprox. 185 kb), p42c (aprox. 270 kb), p42d (371 kb), p42e (aprox. 500 kb) y p42f (aprox. 600 kb). El p42d ha sido identificado como el plásmido simbiótico (pSym), ya que en él se encuentran la mayoría de los genes requeridos para la nodulación y fijación de nitrógeno (Quinto *et al.*, 1982).

Una de las características del genoma de *R. etli* es la presencia de secuencias reiteradas en los plásmidos, en el cromosoma o compartidas entre distintos replicones (Girard *et al.*, 1991). Por ejemplo, el pSym y p42a comparten 19 secuencias, de aproximadamente 1 kb que corresponden principalmente a secuencias de inserción (IS) (G. Dávila, comunicación personal).

Se han estudiado algunas funciones asociadas a los distintos plásmidos de *R. etli* CFN42 y se ha visto que dos de ellos (p42b y p42f) son importantes en la capacidad de la bacteria para interactuar con la planta. El p42b contiene genes involucrados en la síntesis de los lipopolisacáridos, los cuales son indispensables para la infección del nódulo (García de los Santos & Brom, 1997). Por otra parte, el p42f contiene los genes *fixK*, *fixNOQP* y *fixGHIS* que están reiterados en el pSym y la única copia de *fixL*, todos estos genes están involucrados en la fijación de nitrógeno (Girard *et al.*, 2000).

Los otros plásmidos contribuyen de alguna manera a la competitividad para la nodulación, al crecimiento en vida libre y a la viabilidad celular. Algunos de ellos también parecen estar involucrados en la utilización de diversas fuentes de carbono (Brom *et al.*, 2000). Interesantemente, se encontró que el p42a es incompatible con el pTi de *A. tumefaciens* (García-de los Santos & Brom, 1997). También se ha descrito la presencia de una región en el p42a que contienen genes homólogos a los genes *vir* del pTi (Bittinger *et al.*, 2000). Estos datos sugieren un origen común para estos plásmidos.

Una de las características más relevantes asociadas a plásmidos, es su capacidad de transferir material genético a través del proceso de conjugación, por esto, se han llevado a cabo experimentos para evaluar la capacidad de movilización de todos los plásmidos de *R. etli* CFN42 y se encontró que únicamente el p42a es autotransferible a alta frecuencia (10^2). El pSym también es capaz de efectuar transferencia conjugativa, sin embargo, a diferencia del p42a, su frecuencia de movilización es muy baja (10^6). Además, la transferencia conjugativa del pSym, bajo las condiciones experimentales probadas, es completamente dependiente de la presencia del p42a, por lo que podemos decir que el p42a funciona como un "helper" para la transferencia del pSym, el cual es un plásmido movilizable pero no autotransferible.

En los antecedentes presentados se puede ver que con excepción del pTI de *A. tumefaciens*, hay pocos datos en la literatura en relación a los mecanismos de transferencia de plásmidos en rhizobiacaeas.

El estudio de los plásmidos de *R. etli* CFN42 nos ha mostrado que el p42a, además de ser un plásmido autotransferible, permite la transferencia del plásmido simbiótico. Por esto, pensamos que el análisis del mecanismo que regula la transferencia conjugativa del p42a de *R. etli* CFN42 nos permitirá contribuir a comprender los factores que intervienen en la distribución de la información simbiótica en la naturaleza.

OBJETIVOS

Objetivo General. Caracterizar el mecanismo de regulación de la transferencia del p42a de *Rhizobium etli* cepa CFN42.

1. Aislar y localizar los genes involucrados en la transferencia del p42a.
2. Identificar y caracterizar los genes responsables en la regulación de la transferencia.
3. Analizar funcionalmente los genes reguladores y proponer un modelo de regulación de p42a.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se reportaron en el artículo: Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V., & S. Brom. 2003. **The conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by "Quorum sensing"**. J. Bacteriol. (en prensa), el cual, se presenta a continuación. Además se incluye una sección de resultados adicionales en donde se muestran resultados complementarios para entender mejor algunos aspectos de la transferencia del p42a.

The Conjugative Transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, Which Is Required for Mobilization of the Symbiotic Plasmid, Is Regulated by Quorum Sensing

Cristina Tun-Garrido,^{1*} Patricia Bustos,² Víctor González,² and Susana Brom¹
Programa de Genética Molecular de Plásmidos Bacterianos¹ and Programa de Evolución Molecular,²
Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México

Received 5 August 2002/Accepted 11 December 2002

Rhizobium etli CFN42 contains six plasmids. Only one of them, p42a, is self-conjugative at high frequency. This plasmid is strictly required for mobilization of the symbiotic plasmid (pSym). To study the transfer mechanism of p42a, a self-transmissible cosmid clone containing its transfer region was isolated. Its sequence showed that most of the *tra* genes are highly similar to genes of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 and other related plasmids. Four putative regulatory genes were identified: three of these (*traK*, *traK*, and *cinK*) belong to the LuxK-LuxI family. Mutagenesis of these genes confirmed their requirement for p42a transfer. We found that the conjugative transfer of p42a is dependent on quorum sensing, and consequently quorum transfer also was found to be similarly regulated, establishing a complex link between environmental conditions and pSym transfer. Although *R. etli* has been shown to produce different *N*-acyl-homoserine lactones, only one of them, a 3-oxo-C₆-homoserine lactone encoded by the *traI* gene described here, was involved in transfer. Mutagenesis of the fourth regulatory gene, *traM*, had no effect on transfer. Analysis of transcriptional fusions of the regulatory genes to a reporter gene suggests a complex regulation scheme for p42a conjugative transfer. Conjugal transfer gene expression was found to be directly upregulated by TraK and the 3-oxo-C₆-homoserine lactone synthesized by TraI. The *traI* gene was autoregulated by these elements and positively regulated by CinK, while *cinK* expression required *traI*. Finally, we did not detect expression of *traM*, indicating that in p42a TraM may be expressed so weakly that it cannot inhibit conjugal transfer, leading to the unexpressed transfer of p42a.

Rhizobium species are gram-negative soil bacteria that are able to fix nitrogen and to establish a symbiotic relationship with leguminous plants. Besides the chromosomal, their genome is usually constituted by large plasmids which carry genetic material relevant for very diverse functions, such as utilization of plant metabolites, aromatic compounds, and diverse sugars (14), in addition to modulation and nitrogen fixation, which is the best-studied role of rhizobial plasmids.

Rhizobium etli CFN42 induces the formation of nitrogen fixing nodules in roots of *Phaseolus vulgaris* (bean) plants. In this strain, the genomic material is distributed between one chromosome and six plasmids (p42a to p42f). One of these plasmids, p42a, has been identified as the symbiotic plasmid (pSym), because it carries most of the genes required for modulation and nitrogen fixation (43). Some functional characteristics have previously been ascribed to these plasmids (4). The conjugative abilities of the six plasmids have been evaluated by using an *Agrobacterium tumefaciens* strain lacking the Ti plasmid as a recipient. It was found that p42a is self-transmissible at a high frequency (10⁷). Transfer of pSym was also detected but was found to be fully dependent on the presence of p42a. Thus, p42a functions as a helper for the transfer of the pSym, which is a mobilizable but not self-transmissible plasmid. The mechanism for pSym transfer requires its conjugation with

p42a, and this conjugation is apparently accomplished through two mechanisms: one dependent on and another independent of *traM*. Transfer of the other plasmids of *R. etli* CFN42 has not been detected (5).

Distribution of symbiotic plasmids is a fundamental issue in the *Rhizobium* soil population. Some transfer genes have been found in rhizobial plasmids such as pNGR234a, the symbiotic plasmid of *Rhizobium sp.* strain NGR234. These genes were identified through homology to the conjugal transfer genes of *Agrobacterium* Ti plasmids (13); however, clear data regarding the transfer frequency of this plasmid have not been published. The horizontal transfer of genetic material between bacteria of the genus *Rhizobium* is a frequent event and has been demonstrated previously under laboratory conditions. Indeed, self-transmissible symbiotic plasmids have been observed in *Rhizobium leguminosarum* (28). Indirect evidence also suggests pSym transfer in soil (16), and recently, several studies have demonstrated the presence of similar plasmids in different genomic backgrounds (31). An identical organization of plasmid-borne symbiotic genes was found in isolates belonging to four distinct 16S ribosomal DNA species (22). These studies suggest the occurrence of horizontal transfer during the diversification of natural populations of rhizobia. From an applied perspective, it has been possible to increase the effectiveness of the *Rhizobium* legume symbiosis similar to *R. leguminosarum* strain through selective transfer of symbiotic plasmids (10).

In *Agrobacterium*, another genus of the *Rhizobiaceae*, the tumor-inducing plasmid (pTi) can be transferred between bac-

*Corresponding author. Mailing address: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: 52 (777) 3 29 16 91. Fax: 52 (777) 3 17 55 81. E-mail: cristina@cifn.unam.mx.

tical populations, which remain in the soil after infection of the plant tissues. Opines produced during the infection by the plant are the signal that turns on the expression of the genes required for their utilization. Additionally, they also induce the expression of the transcriptional regulator of the transfer process, *traR*, which activates *traI* expression. This regulatory effect is mediated by the *AexR* repressor (2, 20). The *TraR* and *TraI* proteins are LuxR-LuxI-type regulators that activate the expression of target genes in a quorum-sensing-dependent manner. The *TraI* protein is an acylated homologue lactone (acyl-HSL) synthase that synthesizes 3-oxo-C₁₂-HSL, and *TraR* is the autoinducer-responsive transcriptional regulator (40, 25). Both control the expression of at least five promoters of genes involved in plasmid transfer, and consequently, *TraI* transfer is quorum sensing dependent. A third regulatory protein, *TraM*, antagonizes *TraR* activity (26, 35).

The tumor-inducing plasmid pTIC58 of *A. tumefaciens* seems to be phylogenetically close to p24a. Previous studies from our laboratory have shown that these plasmids are incompatible (15). In addition, Bittinger et al. have identified a region in p24a that contains genes with similarity to *vir* genes of pT4 (3).

Recent data suggest that the *cinJ* locus, belonging to the LuxI family, is involved in conjugative transfer of pRL131 in *R. agglutinans*. Surprisingly, insertion mutations in *cinJ* from the donor and the recipient are reported to decrease conjugation frequency (34). *HisR* and *TraR*, two LuxR-type transcriptional regulators, seem to participate in conjugal transfer gene expression, through an elaborate regulatory cascade (53). Also, two quorum-sensing systems have been identified in *Sinorhizobium meliloti* (36). Based on sequence homologies, these authors propose that a *traI/traM* locus is involved in conjugation. Nevertheless, data regarding the transfer mechanism for *Rhizobium* plasmids are still scarce.

In this paper we present the structural and functional characterization of the mobilization region of p24a of *R. etli*. Although the arrangement of the mobilization region is highly similar to that of pT4, there are important differences among the regulatory mechanisms. Knowledge regarding the regulation of p24a transfer will be an important factor to better understand the distribution of symbiotic information, due to its fundamental role in the conjugative transfer of this plasmid.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. The bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table 1. *R. etli* strains were grown at 30°C on PY medium (34). *A. tumefaciens* and *A. nifentolens* strains were grown on Luria-Bertani medium (30) at 37°C in 100 ml. When required, antibiotics were added at the following concentrations: nalidixic acid, 20 µg/ml; spectinomycin, 75 µg/ml; kanamycin, 15 µg/ml; neomycin, 80 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml; streptomycin, 50 µg/ml; tetracycline, 2 µg/ml for *Rhizobium* and 10 µg/ml for *E. coli*; gentamicin, 15 µg/ml; ampicillin, 200 µg/ml; and carbenicillin, 100 µg/ml.

When conditioned medium was required, 3 ml of cultures of wild-type *R. etli* was grown to stationary phase. The cultures were centrifuged, and the supernatants were filtered through a 0.22-µm pore-size Millipore filter and added to cultures of other strains.

Bacterial matings. Conjugation between *E. coli* and *R. etli* was done biparentally, using *E. coli* S17 as the donor. Transconjugants were selected with the appropriate antibiotics. Conjugation experiments were performed on PY plates at 30°C, using overnight cultures grown to stationary phase. Donors and recipients were mixed in a 1:2 ratio and incubated overnight. The mixtures were collected and suspended in 1 ml of 10 mM MgSO₄·40H₂O (w/w/v) Tween 40.

Serial dilutions were plated on suitable selective media. The transfer frequency was expressed as the number of transconjugants per input donor.

Transfer experiments to determine dependence on cellular density were performed using stationary cultures grown to late stationary phase (OD₆₀₀ and recipient cultures grown to high density [10⁸ cells/ml]). Cultures were mixed in equal volumes of 10 µl of the mixtures were plated on PY and incubated at 30°C. Every 4 h, two samples were collected and suspended in 1 ml of 10 mM MgSO₄·40H₂O (w/w/v) Tween 40. Serial dilutions were plated on suitable selective media. Cell-to-cell transconjugants containing p24a, transconjugants containing p50n, or the donors.

Hybridization experiments. p24a was purified by the method of Hirsch et al. (23), digested with *EcoRI*, and used as a probe in colony hybridization experiments (21). A total of 2,200 colonies from a central library of the complete genome of *R. etli* (10⁸ cells/ml) (24) were obtained. Forty-six clones with a spotted homology to the probe were selected for further analysis.

Southern hybridizations. Genomic DNA was digested with *EcoRI* as specified by the manufacturer and then separated on 1% agarose gels and transferred to nylon (Hybond N+; as described by Northern) 50-cm bands purified from several vectors containing the transfer genes as pTIC58 (Table 1) were labeled with [³²P]dCTP by random priming with Amersham's Rediprime system and used as probes. Hybridizations were done as previously described (17).

PCR-RFLP detection. Autoinducers were detected through thin-layer chromatography (11,6) analysis with the reporter plasmid pZLR4 (48). This plasmid contains the *traR* gene and the *nutI::lacZ* reporter fusion from pTIC58, independently cloned into the broad-host-range vector pBBM1MCS57 (7). Extracts of *R. etli* derivatives were prepared from 3-ml cultures grown in 100 ml medium (34).

PCR amplification and cloning. The oligonucleotides used in this study are listed in Table 2. All of the primers were purchased from Unidag de Sintesis Química (HILLMAN). PCR amplification was carried out with recombinant *Taq* DNA polymerase as specified by the manufacturer in a Mastercycler 5330 (Eppendorf). PCR conditions consisted of 30 cycles at 92°C for 1 min, 56°C for 1 min, and 72°C for 1 min. PCR products were purified with a GeneClean II kit (Bio10). Vectors were purified by standard protocols (47). 1 µg plasmidic tissue was used as indicated by the manufacturer (Amersham Lab 2).

Transcriptional fusion. A PCR product was used to construct a *nutI* coding *nut* gene as obtained with oligonucleotides +traI-E and -traI-E (Table 2) and cloned in pSK+ (Table 1). A 901-bp *EcoRI*-*HindIII* fragment from this clone was subcloned into plasmid pPHMCS53 (Table 1) to construct a *nutI::nut* reporter fusion containing the first 5' amino acid coding region of the integrative region between *nutA* and *nutI*, and the first 198 aa of *nutI*.

A *traI::nut* fusion was generated by cloning a PCR product obtained by using the oligonucleotides +traI-E and +traI-E (Table 2). This product, containing the complete *traR* gene, was cloned in pSK+ (Table 1). A 514-bp *EcoRI*-*HindIII* fragment from this clone, containing 39 bp of noncoding region and the first 150 aa of *traI*, was subcloned into plasmid pPHMCS53 (Table 1).

A *traM::nut* fusion was constructed by cloning a 747-bp *EcoRI*-*SmaI* fragment, obtained from a PCR product generated by using the oligonucleotides +traM-E and -traM-E (Table 2), into plasmid pPHMCS53 (Table 1). This fragment contains 500 bp of noncoding region and the first 49 aa of *traM*.

A *cinJ::nut* fusion was constructed by cloning a PCR product obtained by using oligonucleotides +cinJ-E and -cinJ-E (Table 2). This product, containing the complete *cinJ* gene, was cloned in pSK+ (Table 1). A 400-bp *SmaI*-*ClaI* fragment from this clone, containing the last 6 aa of *nutI*, the noncoding region between *cinJ* and *nutI*, and the first 150 aa of *nutI*, was subcloned into plasmid pPHMCS53 (Table 1).

Measurement of β-galactosidase activity. Cultures of *R. etli* derivatives harboring transcriptional fusions were grown to stationary phase. Quantitative *nutI* activity was measured in 10-ml culture samples with p-nitrophenyl galactoside as a substrate (18).

Construction of mutant derivatives *nutM* and *nutI* mutants were constructed by integration with pPHMCS53 (Table 1) using the single *nutM* and *nutI* fragments was mutagenized by using plasmid pT41 (pSU1201) plus a 254-bp *EcoRI* fragment of *nutI* (Table 1). Recombination creates two incomplete copies of the gene. One of the copies is 43 bp of the carboxy-terminal end, ending at nucleotide position 296, while the other lacks 44 bp of the amino-terminal end, starting at nucleotide position 44. *nutI* was mutagenized by using plasmid pC12 (pSU1201) plus a 590-bp *EcoRI* fragment of *nutI* (Table 1). One of the interrupted copies lacks 78 bp of the carboxy-terminal end, ending at nucleotide position 543, while the other lacks 258 bp of the amino-terminal end, starting at nucleotide position 258 (Table 1).

The *nutM* and *nutI* genes were generated by insertion of a *lacZ* reporter cassette by using plasmids pC17d and pC1753, respectively, to generate blue recombin-

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant features	Reference or source
<i>R. celi</i>		
CFN42	Wild type, contains 6 plasmids (p42a to p42f)	44
CFN2001	CFN42 derivative (p42a ⁻ p42d ⁻)	32
CFN182	CFN42 derivative (p42a ⁻)	3
CFN187	CFN182 complemented with p42a::Tn5mob	4
CFN608	CFN42 derivative, <i>tnaI</i> ::pSUP4Sp	This work
CFN609	CFN42 derivative, <i>tnaI</i> ::pSUP4Sp	This work
CFN670	CFN42 derivative, <i>tnaI</i> :: <i>jam</i> Sp	This work
CFN671	CFN42 derivative, <i>tnaI</i> :: <i>jam</i> Sp	This work
CFN672	CFN42 derivative containing pCT7	This work
CFN673	CFN42 derivative containing pCT8	This work
CFN674	CFN42 derivative containing pCT9	This work
CFN675	CFN42 derivative containing pCT10	This work
CFN676	CFN609 derivative containing pCT7	This work
CFN677	CFN609 derivative containing pCT8	This work
CFN678	CFN609 derivative containing pCT9	This work
CFN679	CFN609 derivative containing pCT10	This work
CFN680	CFN670 derivative containing pCT7	This work
CFN681	CFN670 derivative containing pCT8	This work
CFN682	CFN670 derivative containing pCT9	This work
CFN683	CFN670 derivative containing pCT10	This work
CFN684	CFN671 derivative containing pCT7	This work
CFN685	CFN671 derivative containing pCT8	This work
CFN686	CFN671 derivative containing pCT9	This work
CFN687	CFN671 derivative containing pCT10	This work
CFN688	CFN42 containing p42a::Tn5mob and p42d::Tn5GDYNI	This work
CFN689	CFN609 derivative containing p42d::Tn5mob	This work
CFN690	CFN670 derivative containing p42d::Tn5mob	This work
CFN691	CFN671 derivative containing p42d::Tn5mob	This work
CFN692	CFN42 derivative containing pC-13 and p42d::Tn5GDYNI	This work
<i>Agrobacterium</i>		
GM10023	C-58 cured of its native plasmids	46
NT1	C-58 harboring plasmid pTICS8Tacc::Tn5I7-52	1
<i>E. coli</i>		
DI50	<i>supE44 ΔlacU169 (Δ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gna95 thi-1 relA1</i>	32
HH101	<i>supE44 hsd201(r⁻ m⁻) recA13 ura-14 puvA2 lacY1 galK2 gal-20 xyl-5 ml-1</i>	47
S17-1	6060:RP-4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	49
S17-1(pSUP501)	Source of Tn5mob	49
S17-1(pDR21)	Source of Tn5GDYNI	12
Plasmids		
pLAC	pBluescript derivative carrying an 8.5 kb <i>ApaI</i> - <i>XbaI</i> fragment containing from the middle of <i>mtc</i> to the end of <i>tnI</i> of pTICS8 (Ap) ^r	S. K. Farrand, unpublished data
pUCM	pC18 derivative carrying the <i>tnaI</i> gene of pTICS8 (Ap) ^r	32
pNE-P1	pUC18 derivative carrying the <i>tnaI</i> gene of pTICS8 (Ap) ^r	S. K. Farrand, unpublished data
pHADTFR3	pHAD22 derivative carrying a <i>NcoI</i> - <i>HindIII</i> fragment containing the <i>tnuR</i> gene of pTICS8 (Ap) ^r	S. K. Farrand, unpublished data
pTraC1-DG	pET-14b derivative carrying a 2.6 kb <i>NdeI</i> - <i>EcoR</i> fragment containing the <i>mtc</i> , <i>tnaD</i> , and <i>tnuG</i> genes of pTICS8 (Ap) ^r	11
ptraF	pET-14b derivative carrying a 3.7-kb <i>NdeI</i> - <i>Bam</i> III fragment containing the <i>tnaI</i> , <i>tnuF</i> , and <i>tnuI</i> of pTICS8 (Ap) ^r	11
pNK + pBHIMC55	Sequencing vector (Ap) ^r <i>ΔlacZpBHIMICS-5</i> derivative carrying the promoterless <i>uidA</i> gene from pWMS (Gm) ^r	Stratagene, La Jolla, Calif. 18
pIQ200SK + pMS12	Nucleic cloning vector (Gm) ^r pMS12 derivative, <i>ΔaI</i> /Sp interposon (Sp) ^r	42
pSU1202ISp	pSU1202 derivative containing an ESp cassette in <i>HindIII</i> site	37
pBHIMC55	Broad-host-range cloning vector (Gm) ^r	L. Girard, unpublished data
pZ1.R4	pBHIMC55 derivative (Gm) ^r containing <i>tnaG::lacZ</i> reporter fusion and the <i>tnuR</i> gene from pTICS8	7
pRK7813	Broad-host-range cosmid vector, <i>oriV-onT</i> from RK2, <i>lacZα</i> (Tc) ^r	29
pC-13	pATRH1 derivative containing the complete mobilization region of p42a	This work
pCT1	pSU1202Rsp derivative carrying a 254-bp <i>tnaI</i> <i>EcoRI</i> fragment obtained by PCR with oligonucleotides UraM-E and LtraR-E	This work

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Name of plasmid	Relevant features	Reference or source
pCT2	pSUP2002Sp derivative carrying a 359-bp <i>trfA</i> - <i>EcoRI</i> fragment obtained by PCR with oligonucleotides Ultra-E and Ltra-U	This work
pCT3	pSK+ derivative carrying a 0.9-kb <i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i> fragment (generated by PCR) containing a fragment of the wild-type <i>trfA</i> gene	This work
pCT4	pSK+ derivative carrying a 1.1-kb <i>HindIII</i> - <i>XbaI</i> fragment containing the complete <i>trfA</i> gene and a fragment of <i>trfA'</i>	This work
pCT5	pSK+ derivative carrying 1.1-kb <i>HindIII</i> - <i>XbaI</i> fragment containing <i>cinK</i> / <i>cinS</i> in the <i>Sall</i> site and a fragment of wild-type <i>trfA'</i>	This work
pCT6	pSK+ derivative carrying a 0.9-kb <i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i> fragment (generated by PCR) fragment containing <i>trfA</i> / <i>cinS</i> in the <i>Sall</i> site	This work
pCT53	pJQ208K+ carrying a 2-kb <i>SpeI</i> fragment containing <i>cinK</i> / <i>cinS</i> and wild-type <i>trfA'</i> , constructed by ligation of the vector with <i>SpeI</i> - <i>XbaI</i> fragments from pCT5 and pCT3	This work
pCT64	pJQ208K+ carrying a 2-kb <i>SpeI</i> fragment containing <i>trfA</i> / <i>cinS</i> and wild-type <i>cinR</i> , constructed by ligation of the vector with <i>SpeI</i> - <i>XbaI</i> fragments from pCT6 and pCT4	This work
pCT7	pBHRIMCS53 <i>trfA</i> / <i>cinA</i>	This work
pCT8	pBHRIMCS53 <i>trfA</i> / <i>cinA</i>	This work
pCT9	pBHRIMCS53 <i>trfA</i> / <i>cinA</i>	This work
pCT10	pBHRIMCS53 <i>cinR</i> / <i>cinA</i>	This work
pCT11	pBHRIMCS8 derivative carrying 143-bp <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> fragment containing the <i>cinT</i>	This work
pDCKE 74B	pRK415K derivative carrying a 250-bp <i>hampIII</i> - <i>EcoRI</i> fragment containing the active <i>cinT</i> of pTIC58	8
pCT12	pBHRIMCS5 derivative carrying the complete <i>trfA</i> gene	This work
pCT13	pRK7813 derivative carrying the complete <i>trfA</i> gene	This work
pCT14	pRK7813 derivative carrying the complete <i>cinK</i> gene	This work
pCT424	pBHRIMCS5 derivative containing <i>trfA</i> of pNGR234a	Ile and Fuqua, submitted for publication

ments (Table 1), *cinK* was interrupted at the *Sall* site at nucleotide position 414 (Fig. 1). *trfA'* was interrupted at the *Sall* site at nucleotide position 248 (Fig. 1).

Nucleotide sequence accession number. The sequence of the complete *trfA* region of p22 of *R. efl.*, cloned in pCT13, was deposited in the GenBank database under accession number AF528253.

RESULTS

Identification of a self-transferable cosmid clone from p42a. Plasmid p42a has been shown to be self-transferable (5). Its high transfer frequency remains constant, even if it is mobilized from a different background such as *A. tumefaciens* GM19023 (Table 3), thus indicating that no additional transfer regulatory elements are located in a region other than p42a. To identify the transfer region of p42a, a collection of clones

from this plasmid was isolated from a cosmid library covering the whole *R. efl.* CFN42 genome (24) through the selection of clones showing a positive signal in Southern blot colony hybridization with the complete p42a as a probe. Forty-two clones were selected, digested with *EcoRI*, and hybridized against transfer genes of pTIC58 from *A. tumefaciens* (Table 1) under low-stringency conditions. Most of the probes (*trfA*/*B*, *trfA*/*D*, *trfA*/*G*, *trfA*/*H*, *trfA*/*I*, and *trfA*/*J*) showed positive signals with a 27.1-kb cosmid clone. This cosmid was called pC-13. We did not find hybridization signals for *trfA* and *trfA'*.

The conjugative ability of pC-13 from different backgrounds was tested. This cosmid showed the same transfer frequency as the complete p42a, either from *R. efl.* derivatives lacking one or more plasmids or from *A. tumefaciens* GM19023 (Table 3). These experiments show that pC-13 carries all of the genes necessary for p42a transfer. As mentioned above, we have previously shown that p42a is able to mobilize the ρ Sym by a conjugation-mediated mechanism (5). In this work we tested whether pC-13 could also do that. Our results showed that pC-13 is also able to mobilize ρ Sym (Table 3). Analysis of the transconjugants indicated that the pC-13-mediated transfer of ρ Sym in all cases involved a conjugation event, similar to what happens with *p42a*. In contrast, we did not detect transfer of pC-13 from *E. coli* HB101 even though several different recipients were utilized. This suggests that the transfer genes contained in pC-13 are not efficiently expressed in an *E. coli* background.

Sequence analysis of the *tra* genes contained in pC-13. The complete DNA sequence of pC-13 was determined, revealing 21 open reading frames (ORFs) whose predicted products are

TABLE 2. Oligonucleotides used in this work

Primer	Sequence*
-trfA-E	TAGAAATCCTGTCCGGTTCGGGTTTT
+trfA-E	TCCGAATGACCGGCTGTCTTCCTT
-trfA-E	TGGAAATTCGGTTCGGGGATTTA
+trfA-S	CCGCGACCATTCCGCTTTTCAGGTT
+trfA-E	CTGAATTCGTGCATGGCACCAGTTA
+trfA-S	ATGCGAGCAGCGACGACCAAGTCT
-cinR-E	CTGAAATCTATCGACCGCTCGCAACT
+cinR-S	CGCTCGAACAAGCCCTCCGAATGA
Ultra-E	TTGCGATGTCGGTATTCGCGAGA
LtraM-E	TTCGATTCGAGACGAAACAACGG
LtraL-E	TTGAATTCGTGCTCCCGGAGCG
Ultra-E	TCCGAATTCAGGATGCCACGGCC

* E corresponds to *EcoRI* sites, and S corresponds to *Sall* sites.

+ Nucleotides corresponding to the restriction sites are underlined.

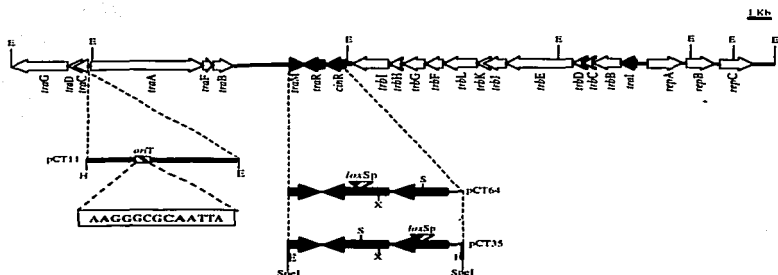


FIG. 1. Physical map of pC-13, containing the transfer region of p42a. Arrows indicate the transcriptional directions of the identified genes. The regulator genes *trn*, *trnK*, *cinR*, and *trnM* are shown by black arrows. pCT11 contains the 143-bp mobilizable region, carrying the *oriT* of p42a. The 13 bp of the *nic* site sequence are shown. pCT53 and pCT54 contain the regions used to generate mutations in the *trnR* and *cinR* genes. II, *Hind*III; E, *Eco*RI; X, *Xba*I; S, *Sac*I.

similar to known transfer proteins of *A. tumefaciens* pTiCS8 and related plasmids (Fig. 1). The gene arrangement in pC-13 was similar to that found in pTiCS8 (11, 33), except that no opine catabolism-related genes were identified. The transfer origin (*oriT*) was located between *trnCDG* and *trnAFB*, which

are transcribed divergently from this site. The *oriT* was identical to the *oriT* of pNGR234a and also to the *oriT* of pTiCS8.

Four ORFs encoding regulator proteins were identified in pC-13. Homologous proteins for three of them have been previously characterized for the pTiCS8 transfer system. Their

TABLE 3. Transfer frequencies of *R. etli* plasmids p42a, pSym, and pC-13 from different donors*

Transfer	Donor	Relevant genotype	Recipient	Transfer frequency ^b
p42a	CFNX187	p42a::TrnSmob	GM19023	1.0×10^{-2}
	GM19023/p42a	p42a::TrnSmob	GM19023	1.0×10^{-2}
	CFNX187/pCF424	p42a::TrnSmob, <i>trnM</i> (pNGR234a)	GM19023	6.3×10^{-4}
	CFNX668	<i>trnM</i> ::pSUDPsp	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	1.0×10^{-2}
	CFNX669	<i>trnI</i> ::pSUDPsp	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	ND ^c
	CFNX670	<i>trnK</i> :: <i>lux</i> Sp	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	ND
	CFNX671	<i>cinR</i> :: <i>lux</i> Sp	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	ND
	CFNX669/pCT12	<i>trnI</i> ::pSUDPsp, pBBR1MCS5/ <i>mut</i>	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	8.7×10^{-3}
	CFN2001/pCT13	<i>trnK</i> :: <i>lux</i> Sp, pRR7813- <i>cinR</i>	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	7.3×10^{-3}
	CFNX671/pCT14	<i>cinR</i> :: <i>lux</i> Sp, pRR7813- <i>cinR</i>	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	6.5×10^{-3}
	CFN42/pC-13	Cosmid with all p42a <i>trn</i> genes	GM19023 or DH15a	1.2×10^{-2}
	p42a <i>trn</i> region, cloned in pC-13	GM19023/pC-13	Cosmid with all p42a <i>trn</i> genes	GM19023 or DH15a
CFN42/pCT11		pBBR1MCS5: <i>oriT</i> of p42a	DH15a	1.0×10^{-2}
Cloned <i>oriT</i> from p42a	CFN42/pBBR1MCS5	pBBR1MCS5 (vector)	DH5a	ND
	CFNX182/pCT11	p42a- ^d pBBR1MCS5: <i>oriT</i> of p42a	DH5a	ND
Cloned <i>oriT</i> from pTiCS8	CFN2001/pDCKE7AII	p42a::GDYNI, <i>oriT</i> of pTiCS8	I1H101	2.5×10^{-4}
	CFN2001/pDCKE7AII	pDCKE7AII	I1H101	ND
p42a (pSym)	CFNX689	<i>trnI</i> ::pSUDPsp, pd::Trn5GDYNI	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	ND
	CFNX690	<i>trnK</i> :: <i>lux</i> Sp, pd::Trn5GDYNI	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	ND
	CFNX691	<i>cinR</i> :: <i>lux</i> Sp, pd::Trn5GDYNI	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	ND
	CFNX692	pC-13, pd::Trn5GDYNI	CFN2001(p42a- pSym ⁻)	3×10^{-4}

* All crosses were repeated at least twice.

^b Expressed as transconjugants per donor.

^c ND, not detected.

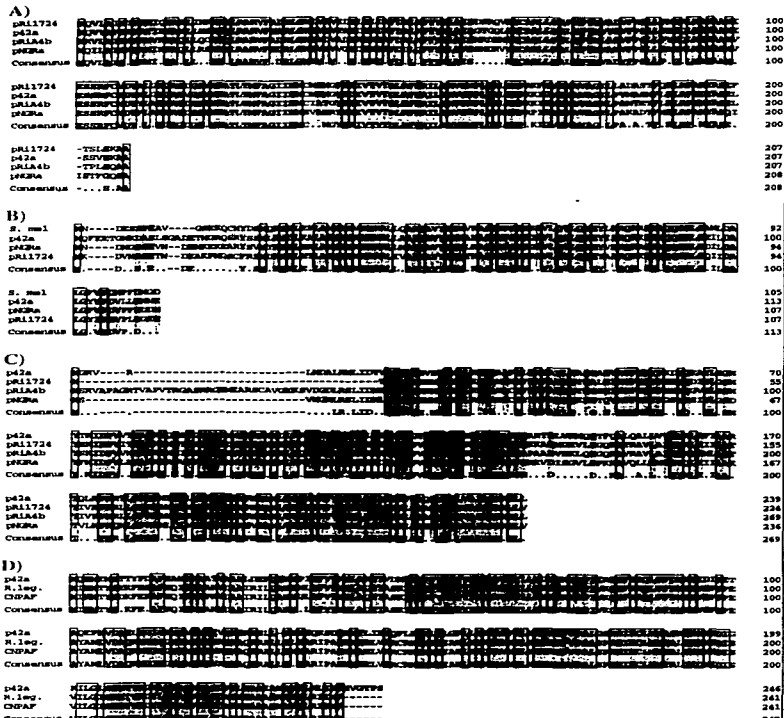


FIG. 2. Alignment of p42a transfer regulator proteins with the corresponding proteins of related systems. S. mel., *S. melitici*; pNGR8a, plasmid pNGR234a; R. leg., *R. leguminosarum*. Identical amino acids are boxed, and conserved amino acids are shown in the consensus. (A) TraI; (B) TraM; (C) TraR; (D) CinR.

products, TraR, TraM, and TraI, are highly conserved with those from other related plasmids (Fig. 2). However, the identity of the pC-13 genes to those from pTIC58 was low (31% for TraR, 29% for TraM, and 50% for TraI). This could explain in our hybridization experiments (see above). TraR of pC-13 is a 239-aa protein, showing 60% identity to the LuxR family quorum-sensing transcriptional factor of pRiA4b (a plasmid of *A. tumefaciens*) (AB050904), 62% identity to the TraR protein of pRi1724 of *Rhizobium rhizogenes* (NC_002575), and 58% identity to TraR of pNGR234a of *Rhizobium* sp. strain N1624 (AF04069).

We found another regulator gene, *cinR*. CinR from pC-13 is a 246-aa protein that is 50% identical to CinR of *R. leguminosarum* bio. Viciae (AF210630) and 57% identical to CinR of *R. etli* CNPAF512 (AF293621). Both CinR and TraR are clearly proteins belonging to the LuxR family of transcriptional regulators.

TraI of pC-13 is a 207-aa protein with 75% identity to TraI of pRi1724 (NC_002575), 74% identity to an autoinducer synthase of pRiA4b (AB050904), and 70% identity to TraI of pNGR234a (AE00068). Therefore, TraI is evidently an acylated HSL synthase member of the LuxI family proteins. In the intergenic region between *traI* and *repA*, a *tra* box with the sequence GTTCTAGCAATCCATACAAG was found 59 bp upstream of *traI*, suggesting that the transcription of *traI* is dependent on TraR. Another *tra* box was localized upstream of *traI*.

The fourth regulator, TraM, is a 113-aa protein homologous to an antiactivator that inhibits TraR activity through interaction with this protein in domains located at their respective C-termini. It shows 69% identity to TraM of pNGR234a (AE00069), 65% identity to TraM of pRiA4b (AB050904), and 57% identity to TraM of pRi1724 (NC_002575). All of these proteins show low identity to transfer regulator proteins of pTIC58 (NC_003065).

ORFs similar to *nbb*, *C*, *D*, *E*, *J*, *K*, *L*, *F*, *G*, *H*, and *I*, involved in mating-pair formation (33), were also found between *traI* and *cinR*; all of them are transcribed in the same direction as *traI*. Replication genes *repAIC* are located upstream of *traI* (Fig. 1).

Characterization of *oriT*. The *oriT* of pC-13, identified through similarity with transfer origins of pNGR234a and pTIC58, was localized between *traI* and *traC*. The sequence analysis revealed a motif identical to that present in the *oriT* genes of pTIC58, which is common to the region where nick sites are located in pT11 and R5F1010. However, the inverted repeats near this motif (8) seem to be absent. To test the functionality of this transfer origin, a fragment of 143 bp containing the *oriT* was cloned in pBBR1MCS5 (pCT11) (Fig. 1) and introduced by conjugation into different strains. pCT11 could be mobilized from wild-type CFN42 but not from CFN182, a strain lacking p42a (Table 3). As a control we tested the mobilization ability of the vector pBBR1MCS5. As can be seen in Table 3, pBBR1MCS5 could not be transferred. These results indicate that the fragment cloned in pCT11 carries a functional *oriT* dependent upon p42a-encoded proteins. Similar results were found with plasmid pDCKE.7A3, which contains the *oriT* of pTIC58 (Table 3); it can be mobilized from



FIG. 3. Thin-layer chromatogram of the acyl-HSL produced by *R. etli* CFN42 and derivatives. Lane 1, *R. etli* CFN42; lane 2, *R. etli* CFN42 cured of p42a; lane 3, CFN42 cured of p42a and pSUP18p; lane 4, CFN42 cured of p42a and pSUP18p; lane 5, CFN42 cured of p42a and pSUP18p; lane 6, CFN42 cured of p42a and pSUP18p; lane 7, CFN42 cured of p42a and pSUP18p; lane 8, 3-oxo-C₆-HSL; lane 9, YM medium control.

a strain containing p42a but not from a strain lacking this plasmid.

traI is responsible for the production of an autoinducer in *R. etli* CFN42. In pTIC58, TraI is responsible for the production of a conjugal factor or autoinducer, which is a member of a family of substituted HSLs (acyl-HSLs) (25). To determine if an acyl-HSL is involved in the transfer of p42a, the production of these compounds by *R. etli* CFN42 and some derivatives was determined by using the TLC system described by Shaw et al. (48).

Acyl-HSLs can differ with respect to the length of the acyl side chain, the presence or absence of one or more unsaturations, and the nature of the substitution at the carbon 3 position. In some acyl-HSLs, carbon 3 is hydroxylated (3-hydroxy); it also may carry a carbonyl group (3-oxo) or a fully reduced methylene. The 3-oxo derivatives characteristically produce tailing spots with diffuse edges, whereas the 3-unsubstituted forms produce circular spots with sharp edges (48). To determine whether the *traI* gene found in pC-13 is responsible for production of one of the autoinducers, we analyzed the autoinducer production in strain CFN429 (*traI*:pSUP18p). The results showed that there is one tailing reactive spot which comigrates with a 3-oxo-C₆-HSL. This 3-oxo-C₆-HSL is detected in the wild-type strain but disappears in the *traI* mutant (Fig. 3, lanes 2 and 6) and in the p42a-cured derivative (Fig. 3, lane 3). There is another reactive spot that comigrates with the 3-oxo-C₆-HSL, and its circular form indicates that it is a 3-OH-C₆-HSL. This spot is present in strain CFN182 (cured of p42a) (Fig. 3, lane 3), indicating that it is encoded in the chromosome or in a plasmid different from p42a. Two unidentified spots were detected in the wild type at low levels; they may be contaminants, similar to those previously detected with this technique (7).

In order to determine the role of the 3-oxo-C₆-HSL in conjugative transfer, the mobilization of p42a containing the interrupted *traI* was tested and found not to be detectable (Table 3). Complementation with the wild-type gene (CFN429/pCT12) restored the transfer ability of the strain (Table 3). Also, when the *traI* mutant CFN429 was grown in a condi-

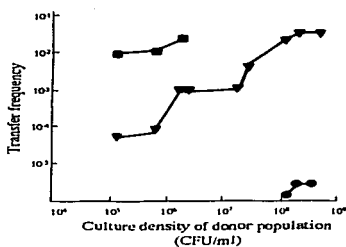


FIG. 4. Effect of culture density on the transfer of p42a and pSvm from CFN688. Transfer frequencies of p42a (triangles), of p42a with conditioned medium added before mating (squares), and of pSvm (circles) are shown. Strain CFN2001 (cured of p42a and pSvm) was always used as the recipient.

tioned medium consisting of the supernatant of a CFN42 culture grown to stationary phase or in a medium supplemented with 5 μ l of 3-oxo-C₆-HSL; the transfer frequency of p42a *traI*:pSUIPQSp was similar to that of the wild-type strain (1.7×10^{-2} and 0.77×10^{-2} , respectively). Our conclusion from these experiments is that *TraI* is a positive regulator of the transfer process through the synthesis of a 3-oxo-C₆-HSL. On the other hand, in spite of the fact that CFN42 produces at least two acyl-HSLs at readily detectable levels, only the one encoded by the *traI* localized on p42a seems to be involved in conjugative transfer; no other product can substitute for its function, indicating very specific regulation.

Mobilization of p42a, and consequently of pSvm, depends on quorum sensing. Acyl-HSLs are molecules involved in quorum-sensing processes, processes that are cell density and growth phase dependent. We have shown that one of these

compounds is necessary for p42a mobilization. We also know that the transfer of pSvm depends on the presence of p42a (5). Thus, to test if transfer of *R. celi* plasmids is a quorum-sensing-dependent process, we constructed an *R. celi* derivative harboring both p42a and p42d (pSvm) labeled with different markers (CFN688). We determined the transfer frequencies of both plasmids at different growth stages of the donor strain (Fig. 4). The results showed that transfer of p42a initiates when the donor population density is approximately 10^6 and the frequency increases as the donor population augments its density. Furthermore, when the donor strain is pregrown in a conditioned medium, transfer is induced at an earlier stage (Fig. 4). These results clearly indicate that the transfer of p42a is dependent on quorum sensing.

The transfer of pSvm initiates only after the p42a transfer frequency reaches its highest level (at a population density of 10^8 to 10^9), and it also increases in accordance with the donor population (Fig. 4). Therefore, the transfer of pSvm is also dependent on quorum sensing, albeit indirectly.

Two regulators of the LuxR family are activators of p42a transfer. To analyze the role of *cinR* and *traR* in p42a mobilization, we tested the transfer ability of p42a in derivatives containing mutations in these genes (Table 3). Transfer of p42a was completely abolished in derivatives containing mutations in *traI*, *cinR*, or *traR* and was restored when complemented with the respective wild-type genes (CFN660/pCT12, CFN670/pCT13, and CFN671/pCT14) (Table 3). Therefore, the three genes are necessary and sufficient for p42a transfer. Since mobilization of pSvm depends on the p42a transfer system, we confirmed that these mutations also eliminate pSvm transfer (Table 3).

To further understand the regulation of the p42a transfer genes, we constructed derivatives containing fusion of each of the regulatory genes to a reporter gene: pCT7 (*traI::uidA*), pCT8 (*traR::uidA*), and pCT10 (*cinR::uidA*). Expression of these fusions was tested in the wild-type and *traI*, *traR*, and *cinR* mutant backgrounds. The analysis (Table 4) showed that *traI* expression is reduced when *traR* is mutated (CFN680). A more dramatic effect was observed in *cinR* or *traI* mutants (CFN684 and CFN676), where *traI* expression was com-

TABLE 4. Expression of *traI::uidA*, *traR::uidA*, and *cinR::uidA* gene fusions in *R. celi* wild-type and mutant backgrounds

Strain	Strain genotype	Mean β -glucuronidase sp act \pm SD ^a
CFN672	Wild type, <i>traI::uidA</i>	116.53 \pm 16.62
CFN676	<i>traI::Dsp traI::uidA</i>	19.15 \pm 3.20
CFN680	<i>traR::Dsp traI::uidA</i>	ND ^b
CFN684	<i>cinR::Dsp traI::uidA</i>	15.39 \pm 5.15
CFN673	Wild type, <i>traR::uidA</i>	15.035 \pm 1.91
CFN677	<i>traI::Dsp traR::uidA</i>	20.69 \pm 4.91
CFN681	<i>traR::Dsp traR::uidA</i>	18.98 \pm 2.97
CFN685	<i>cinR::Dsp traR::uidA</i>	20.89 \pm 2.073
CFN675	Wild type, <i>cinR::uidA</i>	ND ^b
CFN679	<i>traI::Dsp cinR::uidA</i>	ND ^b
CFN682	<i>traI::Dsp cinR::uidA</i>	24.54 \pm 2.35
CFN687	<i>traI::Dsp cinR::uidA</i>	20.94 \pm 3.57
CFN182/pCT7+pCT13	p42a ⁺ , pRK7813- <i>traR</i> , <i>traI::uidA</i>	ND ^b
CFN182/pCT7+pCT14	p42a ⁺ , pRK7813- <i>cinR</i> , <i>traI::uidA</i>	ND ^b

^a Values are expressed as nanomoles per minute per milligram of protein and are meant from two independent experiments performed in duplicate.

^b ND, not detected.

pletely abolished. These results led us to predict that production of the *traI*-dependent acyl-HSL should be affected in these mutants. TLC detection analysis demonstrated that in CFNX669, CFNX670, and CFNX671, the reactive-spot profile was similar to the profile of strain CFNX182 (control of p42a), while in CFNX668 (*traM* mutant), the acyl-HSL profile was identical to that of the wild type (Fig. 3). Regarding *cinR*, its expression was reduced only in a *traI* mutant background (CFNX679) (Table 4), while the other mutations had no effect on its expression. Finally, *traR* expression was similar in all of the different backgrounds (Table 4), suggesting that it is constitutively expressed.

Since *cinR* and *traR* mutants affect *traI* expression and this gene is responsible for 3-oxo-C₁₂-HSL production, we performed an experiment to determine whether 3-oxo-C₁₂-HSL allows *cinR* and *traR* mutants to perform conjugative transfer. The results showed that transfer ability was recovered only at a low frequency in the *traR* mutant (1.2×10^{-7}), and in the *cinR* mutant (3.7×10^{-7}). These results indicate that in addition to their role in *traI* expression, both regulators participate directly in regulation of *tra* genes expression.

The *traI* fusion (pCT17) was introduced into a derivative of the p42a-cured strain CFNX182 carrying the clone containing the *traR* gene (pCT13) or the *cinR* gene (pCT14). The β -glucuronidase activity in cultures of these strains grown in conditioned medium was determined. It was found that *traI* is not expressed in these backgrounds (Table 4). These results suggest that both genes are required for *traI* expression and that they function in parallel. This is in agreement with previous results (see above), since the wild-type strain carrying mutations in either *traR* or *cinR* shows a decrease in *traI* expression and transfer, in spite of the fact that *traR* has no effect on *cinR* expression and vice versa.

Tram does not repress conjugative transfer in p42a. TraM has been shown to be a negative regulator of pTIC58 conjugative transfer through interaction with TraR in domains located at their respective C termini (26, 27, 41). To verify whether the *traM* is an antiactivator in p42a, we constructed a derivative (CFNX668) containing a mutation in *traM* (see Materials and Methods) and tested its conjugative ability. Surprisingly, the transfer frequency was not affected (Table 3). Since we knew by sequence analysis that the C terminus of TraR was conserved with those of other homologous proteins of related pTi plasmids, we questioned whether it could be inactivated by an heterologous TraR repressor. To this end, pCF424 (Table 1), a pIHR1MC55 derivative containing *traM* of pNGR234a, was introduced into CFNX187 by conjugation. In this strain, we found that the p42a transfer frequency decreased by 2 orders of magnitude (Table 3). This indicates that *traM* of p42a is able to interact with TraM but, for some unknown reason, this interaction is not carried out with the endogenous TraM. To further explore this issue, a transcriptional fusion of *traM* with the β -glucuronidase reporter (pCT9) was constructed. We did not detect expression in any of the backgrounds tested, i.e., wild type CFN42 or the mutants CFNX669 (*traI::SUP18p*), CFNX670 (*traR::luxPsp*), or CFNX671 (*cinR::luxPsp*) (data not shown). We concluded that *traM* in CFN42 is not inactivated because of the *traM* gene expression, and thus the antiactivator is not produced, at least under the experimental conditions tested.

DISCUSSION

In the last few years, it has been found that quorum-sensing-dependent processes are widespread among gram-negative bacteria, including plant-associated bacteria (52). Production of multiple autoinducers and complex regulatory networks has been reported for *R. etli*, *R. leguminosarum*, and *S. meliloti* (19, 36, 45, 53, 54). *R. etli* CNPAF512 produces seven different acyl-HSLs (45). Three of these autoinducers have been shown to be produced inside the nodules by bacteroids; mutations in one of them result in a substantial decrease in acetylene reduction activity, indicating that they are involved in nodulation and nitrogen fixation (9). In *R. etli* CNPAF512 we detected the production of only two acyl-HSLs. Strains CFN42 and CFN42 also differ in other plasmid-encoded features, such as the presence of a FixJ homolog in CNPAF512, which is absent in CFN42, and the presence of a novel FixL in the latter strain (18). The organization of these genes was analyzed in 24 *R. etli* strains from different geographic origins. Seventeen (70%) were similar to CFN42 (6). All of these data support the suggestion that in *R. etli* there is intraspecies variability regarding different plasmid-encoded traits.

In *R. leguminosarum*, acyl-HSLs have been related to inhibition of bacterial growth through the production of a small bacteriocin (19, 53, 54). An intricate regulatory cascade involving various LuxR-type regulatory genes (*cinR*, *traR*, and *trR*) has been shown to participate in regulating the conjugative transfer of a symbiotic plasmid in *R. leguminosarum* (34, 53). In this cascade, TriR positively regulates conjugative transfer genes in response to the 3-oxo-C₁₂-HSL synthesized by *traI*. *trR* expression is positively controlled by BisR; this induction requires 3OH-F-C₁₄-HSL synthesized by the chromosomal gene *cinI*. *cinI*, *BisR* plays a role in repression of *cinI* expression. Although a *trb* operon was identified, localization of the transfer origin, *oriT*, and other transfer genes (*traA/B* and *traCDG*), as well as analysis of *traI*, will surely contribute to complete the regulatory scheme for transfer of this plasmid. In addition, a recently described *traR-traM* locus from *S. meliloti* has been proposed to be involved in transfer (36); however, experimental confirmation is still required.

In this work, we performed a comprehensive analysis of the conjugative transfer mechanism of p42a of *R. etli* and distinctly showed that it is quorum sensing dependent. Interestingly, as pSym transfer depends on p42a, we find that the transfer of the symbiotic plasmid also depends on cell density, in an even more restricted manner than for p42a.

Based on the expression assays of regulatory gene fusions in different backgrounds, we propose a regulatory model for p42a transfer (Fig. 5). Analysis of β -glucuronidase activity demonstrated that *traI* is positively autoregulated and is upregulated by TraR and CinR. According to the proposed model, a complex should be formed by TraR and the 3-oxo-C₁₂-HSL synthesized by TraI. This complex would be able to bind to the promoters of transfer genes where *tra* boxes have been identified. This complex would also mediate the autoregulatory control of *traI*, where a *tra* box was also found. A mutation in *traR* still allows a low level of *traI* expression, but TraI activity is not high enough to synthesize the autoinducer required to promote transfer of p42a, or even to be detected by TLC analysis. Also, CinR was found to be a positive regulator of *traI*

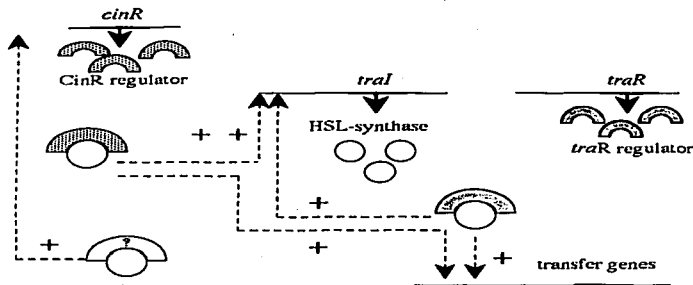


FIG. 5. Model for the regulation of transfer gene expression in p42a. +, positive regulation; ?, unknown regulatory protein from the LuxR family.

independently of TraR, because a mutation in *cinR* abolishes *nal* expression but has no effect on *traR*. As mentioned above (see Results), the transfer frequency of pC-13 is similar to that of the complete plasmid p42a. This indicates that no other regulators are involved in transfer of p42a. Therefore, we predict that the 3-oxo-C₁₂-HSL produced by TraI is able to form a complex with CinR and to upregulate *traI* (Fig. 5).

Regarding *cinR*, its expression is upregulated by TraI and decreases when *traI* is mutated. As CinR is a positive regulator for *traI*, we would expect a decrease of *cinR* expression in a *cinR* mutant. However, the results show that *cinR* expression remains unaltered in a *cinR* mutant. We propose that *traI* is transcribed at a basal level independent of TraR and CinR, allowing the accumulation of enough 3-oxo-C₁₂-HSL to activate *cinR*. In the *traI* mutant, this basal level produces an inactive TraI, completely abolishing autoinducer production. The transcriptional activator for *cinR* has not been defined. This hypothetical activator could be either TraR or CinR, acting separately and being able to replace each other, or an unknown and yet-to-be-described regulator. Finally, *traR* expression was found to be constitutive under all conditions tested.

Regulation of p42a transfer resembles that of pTIC58 in many aspects. Nevertheless, they differ in some important aspects. In pTIC58, opines secreted by the plant are the first signal for transfer. In contrast, p42a mobilization does not require its symbiotic host. Another important difference among the transfer systems of these plasmids concerns TraM activity. According to Piper and Farrand (41), in pTIC58 TraM serves to inactivate the small amount of TraR which is constitutively produced in the absence of the conjugal opines. As a consequence, conjugal transfer of this plasmid requires not only the accumulation of auto-inducer but also expression of *traR* at levels that allow it to overcome the activity of TraM. In contrast, we found no expression of TraM in p42a. As opines

are not required to initiate conjugal transfer, we believe that *traM* might be a relic of an acquired transfer machine in *R. etli*. The absence of the inhibitory effect of TraM, as well as the fact that p42a is able to initiate transfer at a lower culture density than pTIC58, may explain the high frequency of p42a transfer (compare Fig. 4 with Fig. 2 of reference 41). However, we cannot rule out the possibility that TraM might be expressed and have a regulatory role under other experimental conditions.

From the results presented in this paper, it is evident that there is a regulatory cascade controlling conjugative transfer of p42a and an even more complex regulation for p5Sym transfer. To complete the regulatory scheme, it will be necessary to identify other controlling elements, such as the transcriptional regulator of *cinR*.

We have previously shown both that p5Sym transfer depends on the presence of p42a and the feasibility of coinTEGRATION among both plasmids (5). Here, we show the existence of another level for p5Sym transfer regulation, indirectly linked to the environmental conditions, which may have an effect on the cellular density. Although p42a transfer is not restricted to the presence of the symbiotic host (see above), we expect that the cellular population is more likely to achieve the level required for plasmid transfer in a closed environment, such as the node or infection thread, than in soil.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Laura Cervantes, Javier Rivera, and Rosa Gómez Barreto for technical assistance and to Stephen K. Farrand for his help in the detection of acyl-HSL and for providing *trf* probes. We also thank Paul Gwynn and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides.

This work was partially supported by grants IN202599 (DGAPA-UNAM) and 102375 and 102366 (DGEP-UNAM).

REFERENCES

- Beek von Bodman, N. J., E. McCutchan, and S. K. Farrand. 1988. Characterization of conjugal transfer systems of *Agrobacterium tumefaciens* T1 plasmid. *J. Bacteriol.* 171:5281-5290.
- Beek von Bodman, N. G., T. Hayman, and S. K. Farrand. 1992. Optic catalyzed and conjugal transfer of the Ti plasmid pTC26 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:641-647.
- Clairidge, M. A., J. A. Gross, J. Widom, J. Clardy, and J. Handelsman. 2000. Rhizobium et/LJ C13 carries two gene homologs on a self-transmissible plasmid. *Plant-Microbe Interact.* 13:103-110.
- Brown, S. A., G. Garcia de los Santos, T. Stepkowski, M. Flores, G. Davila, D. Romero, and R. Palacios. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* ssp. *Phaseolus* are required for symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* 174:5118-5120.
- Brown, S. A., G. Garcia de los Santos, L. Cervantes, R. Palacios, and D. Romero. 1993. In vivo and in vitro studies of the symbiotic nitrogen fixation and cellular growth require interaction among different replicons. *Plant Mol. Biol.* 24:1-13.
- Brown, S. L., G. Garcia de los Santos, J. M. Nanguan-Piñilla, J. Olivares, and J. Sanjuan. 2002. Conservation of plasmid-coded traits among bean-symbiotic *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2528-2534.
- Bao, C., F. Gao, Y. Chen, P. H. Shaw, Z. Shao, and S. K. Farrand. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1119-1129.
- Cook, D. M., and N. S. K. Farrand. 1992. The *oriT* region of the *Agrobacterium tumefaciens* T1 plasmid pTC26 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RS1 4110 and RK2194 and with T-region binders. *J. Bacteriol.* 174:62-68.
- Daniels, R., D. E. De Vos, J. Desair, G. Raedtschelders, E. Laptev, V. Romenets, C. Verreth, E. Schouterd, J. Vanduyfjoden, and J. Michiels. 2002. The *oriT* quorum sensing locus of *Rhizobium et/LJ* CNP4512 activates growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* 277:462-466.
- DeJong, T. M., N. J. Brown, W. B. Johnston, D. A. Phillips. 1992. Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *J. Gen. Microbiol.* 138:1829-1838.
- Farrand, S. K., L. Hwang, and D. M. Cook. 1996. The *oriT* region of the neoplasme-type T1 plasmid is a chimeric with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. *J. Bacteriol.* 178:4233-4247.
- Flores, M. S., B. Horn, T. Stepkowski, L. Girard, G. Davila, D. Romero, and R. Palacios. 1993. Gene amplification in *Rhizobium*: identification and *in vivo* localization of the *oriT* amplification. *Plant-Microbe Interact.* 6:343-350.
- Frostberg, C. M., R. F. Johnson, J. C. Hengstler, and S. K. Farrand. 1987. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 307:394-401.
- Garcia de los Santos, S. A., S. Brown, and D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol.* 12:119-125.
- Garcia de los Santos, S. A., and S. Brown. 1997. Characterization of two plasmid-borne *oriT* loci of *Rhizobium et/LJ* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:912-920.
- Gierman, G., G. Laguerre, and N. Amarguez. 1993. Comparison of geographical distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* Linn. *Genet* 21:1-11.
- Girard, M. L., M. Flores, S. Brown, D. Romero, R. Palacios, and G. Davila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* ssp. *Phaseolus*. *J. Bacteriol.* 173:2511-2519.
- Girard, E., N. Horn, A. Davalos, O. Lopez, M. Nohrer, and D. Romero. 1998. Differential regulation of the *oriT* region of *Rhizobium et/LJ* by a novel *oriT*-like cascade. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1213-1222.
- Giro, R. M., J. P. Pearson, J. A. Dunne, B. E. A. Bopage, and R. P. Greenberg. 1996. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and a quorum-sensing expression system. *J. Bacteriol.* 178:2323-2332.
- Groves, E. A., and H. C. Zimmerman. 1974. Agrobacterium symbiosis in plant dens. *Curr. Biol.* 3:517-519.
- Groves, M. L., and D. G. Hogeness. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3911-3915.
- Herrera-Cervera, J., J. A. Calahorra-Mellado, E. Romero-Martinez, J. Olivares, and J. Sanjuan. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in Spanish soil. *PEMS Microbiol.* Abstr. 36047-7.
- Hirsch, P. R., H. Van Montagu, J. A. Schell, J. P. Drenth, and J. Schell. 1980. Physical identification of bacteriogenic, modulation and *oriT* plasmids: a strains of *R. leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120:403-412.
- Huerta-Zapella, A., L. Ortuno, G. Du Pont, N. Burdon, A. Echeze, B. Michels-Larion, and J. Calderini. 1997. Isolation and characterization of *Rhizobium et/LJ* mutants altered in degradation of asparagine. *J. Bacteriol.* 179:2020-2022.
- Hwang, J. P., L. J. Zhang, K. R. Piper, D. M. Cook, M. E. Tate, and S. K. Farrand. 1994. Trait A homologues is responsible for production of conjugation factors of the T1 plasmid *oriT* in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4309-4313.
- Hwang, J. P., D. M. Cook, and S. K. Farrand. 1995. A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of T1 plasmid conjugation transfer. *J. Bacteriol.* 177:449-458.
- Manzanera, Z., A. Sanchez, and S. K. Farrand. 1999. Modulating quorum sensing by autoinduction: TraM interacts with TraI to inhibit autoinduction of T1 plasmid conjugation transfer genes. *Mol. Microbiol.* 34:282-294.
- Johnson, A. W., J. L. Brown, A. V. Huchinson-Mullins, J. P. Hirsch, J. P. Hirsch, and J. E. Berger. 1978. High frequency production of nodulating bacterium and species of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *Plant-Microbe Interact.* 1:475-481.
- Jones, J. D., U. and N. Gutierrez. 1987. An efficient and simple method for cloning and its use in a rapid method for marker exchange. *Plant-Microbe Interact.* 1:373-376.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. F. Robertson, M. A. Fierres, R. M. Bonnell, and R. M. Patterson. 1993. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBR101MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Amarguez, G., S. M. Nour, V. Maehert, J. Sanjuan, P. Drenth, and N. Amarguez. 2001. Classification of *Rhizobium* based on *oriT* and *oriT* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147:1981-1990.
- Leumann, J. G., Nohrer, M. A., Cavallaro, L., Fernandez, M. A., Parlin, H. de la Vega, M. Flores, C. Quintos, and R. Palacios. 1984. General organization of *R. phaseolus* *oriT* plasmids, p. 710. In C. Veeger and W. E. Newton (eds.), *Advances in nitrogen fixation research*, 999-1006. AQ:1
- Leung, M., B. E. Everest, and S. K. Farrand. 1996. Genetic and sequence analysis of the pTC26 *oriT* encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J. Bacteriol.* 178:6149-6172.
- Lilgott, J. K., A. Wilkinson, A. Hardman, B. Rodenas, F. Wisniewski, P. Williams, and J. A. Dunne. 1991. The regulatory locus *oriT* of *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* 37:81-97.
- Liu, Z.-Q., Y. Qin, and S. K. Farrand. 2000. The autoinductor TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraI to DNA by interacting with the C-terminal region of a quorum-sensing activator. *J. Biol. Chem.* 275:7171-7172.
- Markarian, M., and J. E. González. 2002. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium melilotis*. *J. Bacteriol.* 184:3500-3507.
- Martinez-Sanchez, J. M., and B. Romero. 2000. Role of *nodD* gene in bacterial symbiosis: reconstruction of the *nodD* gene and its localization. *J. Biol. Chem.* 275:7172-7177.
- Miller, J. R., 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Nohrer, M., R. Palacios, E. Kromann, M. Leumann, and M. A. Cavallaro. 1984. *Rhizobium phaseolus* symbiotic mutants with transposon Tn1 insertions. *J. Bacteriol.* 159:149-155.
- Piper, K. R., S. Beck von Bodman, and S. K. Farrand. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates T1 plasmid transfer by autoinduction. *Nature* 362:448-450.
- Piper, K. R., and S. K. Farrand. 2001. Quorum sensing but not autoinduction of T1 plasmid transfer requires transfer of a quorum-sensing loci and the autoinductor TraM. *J. Bacteriol.* 183:1060-1066.
- Quintos, J., and M. E. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow genetic *in situ* replacement in *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 175:1303-1305.
- Quintos, J., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernandez, T. Ballada, G. Solereno, and R. Palacios. 1984. *Rhizobium leguminosarum* fixation gene sequences in *Rhizobium phaseolus*. *Nature* 296:724-728.
- Quintos, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leumann, M. A. Cavallaro, M. A. Parlin, H. de la Vega, E. Cal, L. Girard, E. Cal, L. Girard. 1985. Nitrogen fixation: a functional multigene family in *Rhizobium phaseolus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1170-1174.
- Rasmussen, V., J. M. Hildebrand, C. Verreth, and J. Vanderslyden. 1998. *laxA* and *laxB*-homologous genes of *Rhizobium et/LJ* CNP4512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and modulation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* 180:811-821.
- Rosenberg, R., and T. Hughes. 1984. The pTC26 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is a natural host for insertion of a *R. rubrum* 1985 nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseolus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3333-3338.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Shaw, P. H., P. G. Gao, S. L. Dohy, C. Wu, J. E. Cronan, Jr., K. L. Rinehardt, and S. K. Farrand. 1997. Factoring and cloning of the *oriT* quorum-sensing signal molecule by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10642-10647.
- Sims, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vivo* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.

50. Southern, E. M. 1975. Detection of sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
51. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
52. Whitehead, N. A., A. M. L. Barnard, H. Slater, N. J. E. Simpson, and G. P. C. Salmon. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:365-404.
53. Wilkinson, A., V. Danina, P. Wisniewski-Dyé, J. K. Lilgus, and J. A. Downie. 2002. *N*-Acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* 184:4510-4519.
54. Wisniewski-Dyé, P., J. Jones, S. R. Chhabra, and J. A. Downie. 2002. *mlfH* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cutI* and *cutR* in *Herizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 184:1597-1606.

RESULTADOS ADICIONALES

Los datos presentados y discutidos en el artículo (Tun-Garrido *et al.*, 2003, en prensa), demostraron que la región de movilización del p42a está contenida completamente en el pC-13. Esta clona contiene, además de los genes reguladores y el origen de transferencia, todos los otros genes necesarios para el procesamiento y transporte del DNA y para la formación del pilus.

Descripción de la Región de Transferencia.

Existen dos grupos de genes que se transcriben divergentemente a partir del *oriT* (Figura 1. Tun-Garrido *et al.*, 2003, en prensa). A la izquierda del origen se localizan los genes *traC*, *traD* y *traG*, que se transcriben en la misma dirección. El gen *traC* codifica para una proteína de 98 aa, corriente abajo de este gen y separado por solo 4 pb se encuentra *traD* que codifica para una proteína de 71 aa, *traG* se encuentra río abajo de *traD* y separada por 31 pb, codifica para una proteína de 645 aa.

A la derecha del *oriT* se encuentran los genes *traA*, *traF* y *traB*, que se transcriben en la misma dirección y divergentemente a los genes descritos anteriormente. El gen proximal al *oriT* es *traA* que codifica para una proteína de 1103 aa, este gen sobrelapa en 4 pb al siguiente gen, *traF* el cual codifica para una proteína de 188 aa y a su vez sobrelapa en 11 pb con el siguiente gen, *traB* que codifica para una proteína de 387 aa.

En la región intergénica entre ambos operones se localiza el origen de transferencia (*oriT*) y corriente arriba de *traC* se localiza una caja *tra* de 18 pb que es un sitio palindrómico: CCAAAGCGCAAGCTTGG.

Presumiblemente todos los genes descritos están involucrados en el procesamiento y transporte del DNA según lo indica su alta identidad con los genes descritos de otros sistemas (Tabla 1).

Río abajo de este último grupo de genes existe una región de aproximadamente 2 kb la cual aparentemente no tiene similitud con genes involucrados en transferencia, en esta región se localizan tres marcos abiertos de lectura, que tienen similitud con proteínas hipotéticas del pTIC58 y del pNGR234a.

Enseguida se localizan los genes reguladores *traM*, *traR* y *cinR*, que ya han sido descritos estructural y funcionalmente en el artículo (Tun-Garrido *et al.*, 2003, en prensa).

Río arriba de *cinR* se encuentran los genes *trb*, aparentemente en un operón que se transcribe en sentido contrario a *cinR*. El gen proximal a *cinR* es *trbI*, que codifica para una proteína de 435 aa. Separado por 12 pb se encuentra *trbH* que codifica para una proteína de 145 aa. Enseguida y separada por 3 pb está *trbG* cuyo producto es de 270 aa. *trbF* está separada de su predecesor por 17 pb y su producto es de 220 aa., *trbL* codifica para una proteína de 391 aa, está separada de *trbF* por 24 pb y sobrelapa con *trbK* en 7 pb, la cual a su vez sobrelapa con *trbJ* en 4 pb y cuyo producto es de 66 aa. El gen *trbJ* codifica para una proteína de 267 aa y sobrelapa en 29 pb a *trbE*. El producto de *trbE* es de 818 aa y se encuentra separado de *trbD* por 9 pb, el producto de éste último gen es de 99 aa y sobrelapa con *trbC* en 8 pb el cual a su vez sobrelapa con *trbB* en 11 pb, el producto de *trbC* es de 127 aa y el de *trbB* es de 353 aa.

Todos los genes *trb* se transcriben en la misma dirección y de acuerdo con su alta identidad con otros sistemas descritos, asumimos que están involucrados en la formación del puente de conjugación.

En seguida del operón *trb*, se encuentra el gen *traI*, que se transcribe en la misma dirección de estos genes y cuyo función es la de sintetizar moléculas de 3-oxo-acil-HSL como ha sido descrito en el artículo.

Enseguida de *traI* y en dirección opuesta se encuentran los genes *repABC* que ya han sido previamente caracterizados (Cevallos *et al.*, 2002).

Tabla 2. Homología y función propuesta de los genes de transferencia localizados en el pC-13.

Proteína	Homología (%identidad/ %similitud)	Función propuesta	Referencia
TraG	TraG pNGR234a (81/86)	Relaxosoma	Alt-Morbe, <i>et al.</i> , 1996.
	VirB4 pRIa4 (79/86)		
	TraG pRII724 (77/85)		
	TraG pTIC58 (69/79)		
	TraG pSymA (47/63)		
TraD	TraD pRII724 (83/87)	Relaxosoma	Alt-Morbe, <i>et al.</i> , 1996.
	TraD pNGR234a (80/88)		
	TraD pTIC58 (80/87)		
	TraD pSymA (47/57)		
TraC	TraC pRII724 (81/92)	Relaxosoma	Alt-Morbe, <i>et al.</i> , 1996.
	TraC pTIC58 (79/94)		
	TraC pNGR234a (85/95)		
	TraC pSymA (41/60)		
TraA	TraA pRII724 (77/84)	Cataliza la reacción corte, desplazamiento de la cadena de DNA.	Alt-Morbe, <i>et al.</i> , 1996.
	TraA pNGR2345a (74/83)		
	TraA pTIC58 (64/76)		
	TraA pSymA (46/59)		
TraF	TraF pNGR2345a (70/83)	Ensamblaje del puente de conjugación.	Alt-Morbe, <i>et al.</i> , 1996.
	TraF pRII724 (60/78)		
	TraF pTIC58 (56/71)		
	TraF pMLb (36/55)		
TraB	TraB pNGR234a (62/70)	No es indispensable pero se requiere para un máxima eficiencia	Alt-Morbe, <i>et al.</i> , 1996.
	TraB pRII724 (58/77)		
	TraB pTIC58 (51/60)		
TraM	TraM pNGR234a (69/85)	Inhibidor transcripcional. Aparentemente inactivo en p42a.	Tun-Garrido <i>et al.</i> , 2003, en prensa.
	TraM pRIa4b (65/82)		
	TraM pTIC58 (29/45)		
TraR	TraR pRIa4b (60/76)	Activador transcripcional de la familia LuxR.	Tun-Garrido <i>et al.</i> , 2003, en prensa.
	TraR pRII724 (62/80)		
	TraR pNGR234a (58/76)		
	TraR pTIC58 (31/45)		
CinR	CinR R. legum. (59/75)	Activador transcripcional de la familia LuxR.	Tun-Garrido <i>et al.</i> , 2003, en prensa
	CinR CNPAF (57/74)		
TrbI	TrbI pNGR234a (76/80)	Formación del par de conjugación	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
	TrbI pRII724 (75/79)		
	TrbI pTIC58 (59/70)		
TrbII	TrbII pRII724 (64/74)	Formación del par de conjugación	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
	TrbII pNGR234a (65/71)		
	TrbII pTIC58 (49/61)		

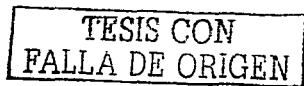
TrbG	TrbG pNGR234a TrbG pRi1724 TrbG pTiC58	(85/87) (84/86) (73/82)	Formación del par conjugativo	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbF	TrbF p Ri1724 TrbF pNGR234a TrbF pTiC58	(94/98) (93/97) (79/90)	Formación del par conjugativo	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbL	TrbL p Ri1724 TrbL pNGR234a TrbL pTiC58	(71/74) (70/73) (62/70)	Formación del par conjugativo	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbK	TrbK pNGR234a TrbK pTiC58	(67/76) (46/69)	Exclusión de superficie	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbJ	TrbJ pNGR234a TrbJ pRi1724 TrbJ pTiC58	(81/83) (76/82) (75/88)	Formación del par de conjugación	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbE	TrbE pRi1724 VirB4 pRiA4 TrbE pTiC58 TrbE pNGR234a TrbE pMLb	(90/94) (90/94) (80/87) (98/93) (40/56)	Formación del par de conjugación y ATPasa	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbD	TrbD pNGR234a TrbD pRi1724 TrbD pTiC58	(91/94) (89/96) (73/89)	Formación del par de conjugación	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
TrbC	TrbC p Ri1724 TrbC pNGR234a TrbC pTiC58	(66/71) (51/55) (53/60)	Pilina para la formación del pilus	Li <i>et al.</i> , 1998
TrbB	TrbB p Ri1724 VirB11 A4 TrbB pNGR234a TrbB pTiC58	(89/93) (88/93) (89/91) (77/84)	ATPasa, autofosforilasa y formación del par de conjugación	Li <i>et al.</i> , 1998 Haase <i>et al.</i> , 1995
Tral	Tral pRiA4b Tral pRi1724 Tral pNGR234a Tral pTiC58	(74/88) (75/87) (70/83) (50/67)	Acil-HSL sintasa.	Tun-Garrido <i>et al.</i> , 2003 en prensa.

Efecto de pC-13 en la transferencia del pSym.

Resultados previos (Brom *et al.*, 2000) sugieren que el p42a ayuda a la transferencia del pSym mediante la formación de cointegrados. Estos parecen generarse por dos mecanismos: uno dependiente y otro independiente de RecA. Como se mencionó en la introducción, hay varias regiones de homología entre el p42a y el pSym (Girard *et al.*, 1991). Estas podrían permitir la cointegración de los dos plásmidos, mediante un mecanismo dependiente de recombinación homóloga (RecA dependiente). Trabajo reciente en nuestro laboratorio nos permitió identificar una zona de 53 pb, reminiscente de las secuencias de inserción de bacteriófagos (*att*), compartida entre los plásmidos p42a (*attA*) y p42d (*attD*). También se identificó un gen que codifica para una proteína de la familia de las integrasas (*intA*), localizado a 6 pb del sitio *attA*. Estos datos sugieren que la cointegración RecA-independiente entre los plásmidos p42a y p42d se lleva a cabo por una recombinación sitio-específico entre *attA* y *attD*, mediada por la proteína IntA. Los experimentos para probar esta hipótesis se encuentran en proceso.

Como se mostró en el artículo, el pC-13, además de contener todos los genes necesarios para la transferencia del p42a, también tiene la capacidad de ayudar a la transferencia del pSym (Tabla 3, Tun-Garrido *et al.*, en prensa). El pC-13 no contiene el sitio *attA* ni el gen *intA*, por lo que la única posibilidad para que se cointegre con el pSym es a través de recombinación homóloga entre secuencias compartidas. Se ha obtenido la secuencia completa del pSym (número de acceso NC_004041). La secuencia reveló que este replicón contiene ORFs correspondientes a *traA*, *traCDG* y un origen de transferencia. Estas secuencias podrían proveer una región de homología para la recombinación con el pC-13.

Con el fin de comprobar si la formación de un cointegrado es requisito para permitir la transferencia del pSym, se contruyeron dos derivadas de CFN42. Una de ellas CFNX195/pC-13, contiene un pSym marcado con Tn5mob, un pC-13 y carece de p42a. La otra (CFN42 *recA*:: Ω Sp/pSym CFNX195, pC-13), lleva el mismo pSym marcado con el Tn5mob y el pC-13, pero en un fondo *recA*⁻. Si la formación de un cointegrado es indispensable para la transferencia del pSym, no habrá transferencia de este plásmido cuando se utiliza la derivada *recA*⁻ como donadora.



Se hicieron experimentos de conjugación utilizando la CFNX195/pC-13 como donadora y la CFN2001 (Rif^r, curada de los plásmidos pSym y p42a) como receptora. Las transconjugantes (CFN2001 conteniendo pSym::Tn5mob), se seleccionaron por su resistencia de rifampicina (marcador cromosómico de la receptora) y a neomicina, la frecuencia calculada para la transferencia del pSym desde esta derivada es de 4×10^{-6} . Para determinar en cuantas de las transconjugantes obtenidas se había transferido también el pC-13, todas las transconjugantes se crecieron en un medio conteniendo tetraciclina. El resultado fue que el 100% de las colonias resistentes a neomicina (200 colonias parchadas) fueron también resistentes a tetraciclina, lo cual indica que todas las receptoras que recibieron el pSym, recibieron también el pC-13.

El perfil de plásmidos de algunas de estas derivadas se analizaron mediante la técnica de Eckhardt (Figura 4A) y la presencia del pSym y el pC-13 se comprobó mediante hibridaciones tipo Southern utilizando como sondas una región intragénica de *nifH* para detectar la presencia del pSym y el gen *iraR* para detectar la presencia del pC-13 (Figura 4B y 4C). El análisis del perfil de plásmidos y de las hibridaciones indican que en la mayoría de los casos (carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13) el pSym se encuentra aumentado de tamaño con respecto al silvestre (carril 1) y formando un cointegrado con el pC-13, ya que ambas sondas hibridan contra el mismo replicón. En otros casos (carriles 9 y 11) el pSym se observa del mismo tamaño que el silvestre y el pC-13 como un replicón independiente, en estos casos podemos considerar la posibilidad de que ambos se hayan transferido como un cointegrado, el cual se resolvió en la célula receptora una vez que el proceso de transferencia hubo concluido. En el carril 5 podemos ver un intermediario de este proceso en el que se encuentra un pSym de tamaño del silvestre pero que también hibrida con *iraR* indicando la presencia del pC-13 y también se observa el pC-13 como replicón independiente, pero aparentemente en menor número de copias ya que la intensidad es mucho menor comparada con las otras derivadas que tienen el pC-13 como replicón independiente (Figura 4 carriles 9 y 11).

Un caso particular es el que se presenta en el carril 7, en esta derivada se encuentran dos cointegrados, identificados por la hibridación contra las dos sondas, coexistiendo en la misma cepa. Otro caso es el de la derivada del carril 3 en la cual la derivada presenta un cointegrado de menor tamaño que el silvestre, lo que nos lleva a

asumir que hubo una delección en el pSym. Sin embargo parece ser que el evento más frecuente es el que da como resultado el cointegrado pSym-pC-13 de mayor tamaño que el silvestre, ya que un 70 % de las 35 derivadas analizadas tienen este perfil.

Por otra parte, en experimentos de conjugación utilizando la derivada *recA'* como donadora y la CFN2001 como receptora, no se logró obtener transconjugantes que heredaran el pSym.

Los resultados de estos experimentos indican que bajo las condiciones probadas, la transferencia conjugativa del pSym requiere de la formación de un cointegrado con el replicón pC-13 que lleva la región de transferencia. El fenotipo de las transconjugantes puede ser variable; ya que los plásmidos pueden permanecer como cointegrados o resolverse para generar los replicones silvestres o quiméricos.

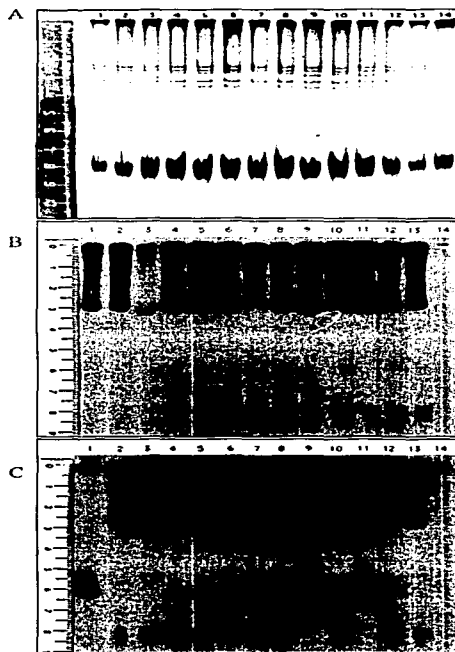


Figura 4. Análisis de las transconjugantes obtenidas de la transferencia del pSym a la cepa CFN2001, con ayuda del pC-13. A) Perfil de plásmidos en un gel de agarosa. Carril 1: CFNX195/pC-13; 2-13: transconjugantes; 14: CFN2001. B) Hibridación tipo Southern del perfil de plásmidos utilizando como sonda una región intragénica de *nifH*. C) Hibridación tipo Southern del perfil de plásmidos utilizando como sonda el gen *traR*.

Análisis del origen de transferencia.

La región intergénica de 258 pb entre *traA* y *traC*, contiene el origen de transferencia y dentro de éste se localiza el sitio *nic*, el cual para el caso del p42a se ha definido como las 13 pb que presentan identidad con el sitio *nic* del pTiC58 y de pNGR234a. Con el fin de realizar un análisis más profundo del origen de transferencia se hizo un alineamiento con los orígenes de transferencia de otros plásmidos cercanos filogenéticamente (Figura 5) y se encontró que es posible dividir los orígenes analizados en dos grupos claramente distinguibles. En la figura 5 podemos observar que en el sitio *nic*, los plásmidos p42a de *R. etli*, pTiC58 y pRiA4b de *A. tumefaciens*, pRi1724 de *R. rhizogenes*, y pNGR234a de *Rhizobium* sp. que formarían el primer grupo, tienen como primera base una adenina, mientras que pSymA, y pSymB de *S. meliloti* y p42d de *R. etli*, que pertenecerían al segundo grupo, tienen una guanina. Por otra parte, la base 12 para el primer grupo de plásmidos es una timina, la cual no está presente en el segundo grupo. Un árbol de distancias filogenéticas de todos los orígenes, realizado con el programa ClustalW empleando el método llamado UPGMA (Unweighted Pair Group Maximun Average), confirmó las primeras observaciones (Figura 6A), en este árbol podemos ver claramente dos grupos, el primero de ellos que incluye los orígenes de p42a, pTiC58, pRi1724, pNGR234a, pRiA4b y el segundo grupo incluye los orígenes de pSymA, pSymB y p42d.

Dado que las nicasas son muy específicas para un sitio *nic*, estas diferencias pudieran ser suficientes para que los sitios de ambos grupos no pudieran ser reconocidos por una misma proteína. Como consecuencia, era de esperarse que las nicasas (TraA) de ambos grupos mostrarán un agrupamiento semejante a sus respectivos sitios *nic*. Para comprobar esta teoría, se hizo un alineamiento de las proteínas TraA de los plásmidos cuyos orígenes de transferencia fueron previamente analizados y se contruyó un árbol de distancias filogenéticas de estas proteínas empleando el método llamado UPGMA. En este árbol (Figura 6B), nuevamente podemos observar dos grupos de nicasas, uno de ellos incluye los plásmidos p42a, pTiC58, pRi1724, pNGR234a, pRiA4b y el otro los plásmidos pSymA, pSymB y p42d.

La diferencia más evidente entre estos dos grupos de proteínas es el tamaño, ya que las del primer grupo incluyen proteínas de entre 1101 y 1108 aa, mientras que las del

segundo grupo van de 1539 a 1552 aa., es decir la diferencia es de alrededor de 400 aa. en el extremo carboxilo, casi la tercera parte de la proteína del segundo grupo se pierde en el primero.

p42a	GGATCCGAAGGGCGCAATTATACGTCGCTGGCGCGACGCCCTGC
pTiC58	GGATCC- <u>AAGGGCGCAATTATACGTCGCTGACGCGACGCCTTGC</u>
pRi1724	GCTTCC- <u>AAGGGCGCAATTATACGTCGCTGATGCGGACGCCCTTG</u>
pNGR234a	GCTTCC- <u>AAGGGCGCAATTATACGTCGCTGTCGCGACATCCTGT</u>
pRiA4b	GCTTCC- <u>AAGGGCGCAATTATACGTCGCTGGCGCGACGTGTTGC</u>
pSymA	CCGTTT- <u>GAGGGCGCAAT-ATACGTCGCTGGCGCGACGTGCCTG</u>
pSymB	CCGTTT- <u>GAGGGCGCAAT-ATACGTCGCTGGCGCGACGTGCCTG</u>
p42d	CTGTTT- <u>GAGGGCGCAAT-ATACGTCGCTGTCGCGACGTGCTTG</u>

Figura 5. Alineamiento de varios orígenes de transferencia de plásmidos de especies filogenéticamente cercanas a *R. etli*. Las bases correspondientes al sitio *nic* se encuentran subrayadas. En negritas se muestran las bases conservadas en todos los orígenes alineados. En gris se muestran las bases que diferencian los orígenes en dos grupos. p42a y p42d (pSym) de *R. etli* CFN42; pTiC58 de *A. tumefaciens*; pRi1724 de *Rhizobium rhizogenes*; pNGR234a de *Rhizobium* sp. NGR234; pRiA4b de *A. tumefaciens* A4; pSymA y pSymB de *Sinorhizobium melloti*.

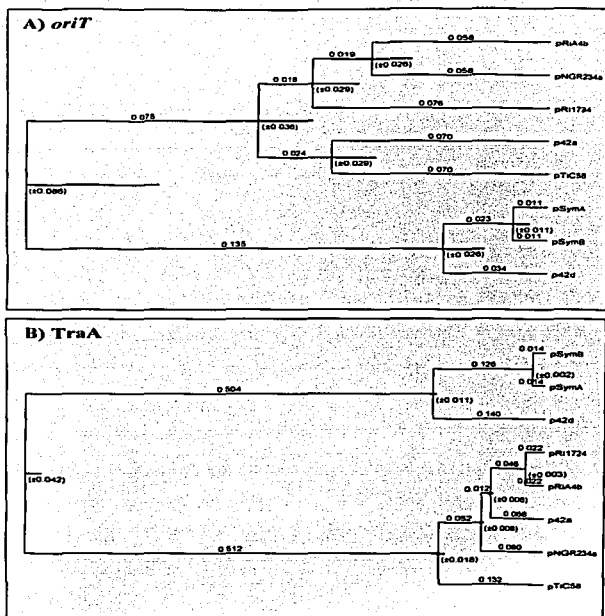


Figura 6. Árboles de distancias filogenéticas de *oriT* y *TraA* de p42a y p42d (pSym) de *R. etli* CFN42; pTiC58 de *A. tumefaciens*; pRi1724 de *Rhizobium rhizogenes*; pNGR234a de *Rhizobium* sp. NGR234; pRiA4b de *A. tumefaciens* A4; pSymA y pSymB de *Sinorhizobium meliloti*.

DISCUSION Y PERSPECTIVAS

La secuencia y el análisis del pC-13 mostró que los genes de transferencia del p42a, con excepción del *cinR*, tienen una alta similitud con los correspondientes genes en los plásmidos de *A. tumefaciens* pTiC58 y pRi1724 y con el pNGR234a de *Rhizobium* sp NGR234. La única diferencia con este último se encuentra en el gen *trbE*. Este gen, en el pNGR234a, tiene un codón de término después del aminoácido 149, por lo que existen en este plásmido dos genes *trhE* nombrados *trhEa* y *trhEb* (Freiberg *et al.*, 1997). A pesar de la alta identidad de los genes *tra* y *trb* del pNGR234a con los genes de transferencia del pTiC58, la autotransferencia de este plásmido no se ha demostrado. Tomando en cuenta que un *traE* funcional es indispensable para la formación del pilus y que las mutantes en este gen son incapaces de movilizarse (Li *et al.*, 1998), es probable que ese codón de término que interrumpe el gen *trbE* sea el responsable de la incapacidad de transferencia este plásmido. Si este es el caso, es probable que las funciones de transferencia del pNGR234a pudieran complementarse con el *trbE* del p42a para la cual se han diseñado los experimentos para probar si el pNGR234a puede transferirse en presencia del pC-13.

El gen *cinR* solo se ha descrito en las cepas *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. etli* CNPAF512, en ambos casos los genes están localizados en cromosoma y parecen formar parte de una compleja cascada regulatoria de "quorum sensing" la cual regula diversos procesos como transferencia de plásmidos, inducción de nódulos y crecimiento de la cepa (Lithgow *et al.*, 2002, Daniels *et al.*, 2002). En ambos sistemas se ha identificado un gen *cinI* cuyo producto sintetiza la acil-HSL que reconoce CinR. Sin embargo, en la secuencia completa del p42a, no se ha localizado otro gen que pudiera codificar para una proteína de la familia LuxI, además del *traI* que ya ha sido analizado y discutido en el artículo. En este caso parece ser que ambos reguladores transcripcionales, TraR y CinR, reconocen la misma acil-HSL, a pesar de que entre si, sólo tienen un 23% de identidad.

Sabemos que la cepa CFN42 produce al menos una acil-HSL que no está involucrada en transferencia (Figura 3, Tun-Garrido *et al.*, 2003, en prensa), aparentemente es una 3-OH-C8 (ver Figura 3 y resultados de Tun-Garrido *et al.*, 2003, en prensa) pero el gen que codifica para la enzima que sintetiza esta otra acil-HSL no se ha identificado. Este gen no parece estar en el p42a porque no desaparece la señal en el sobrenadante de la CFNX182 (curada de p42a, Figura 3, carril 3. Tun-Garrido *et al.*, en

prensa) y tampoco en el pSym porque tampoco desaparece del sobrenadante de la CFN2001 (curada de p42a y pSym. Datos no mostrados). Por lo que asumimos que ese gen debe de estar en cromosoma o en alguno de los otros cuatro plásmidos. Otro dato que podemos inferir es que no forma parte de una cascada regulatoria que involucre TraR-TraI o CinR-TraI, como sería el caso de los autoinductores de las otras cepas de *Rhizobium* antes mencionados, ya que una mutación en estos genes no afecta la producción de la 3-OH-C8 HSL, y por otra parte el p42a o el pC-13 son capaces de autotransferirse desde un fondo genómico distinto de la CFN42, como es la cepa de *Agrobacterium* GM19023 (curada de su plásmido pTi) que no produce 3-OH-C8 HSL, lo cual quiere decir que *traR*, *traI* y *cinR* no dependen para su expresión de esta acil-HSL. Por lo tanto parece ser que esta otra acil-HSL formaría parte de un sistema de "quorum sensing" totalmente independiente del que regula la transferencia del p42a. Una de las líneas de investigación que se propone es el la localización del gen que codifica para la 3-OH-C8 HSL sintasa y la búsqueda de procesos que pudieran estar regulados por este compuesto. Por otra parte también sería posible que la 3-oxo-C8 que regula la transferencia del p42a como ya se ha descrito y discutido en el artículo, pudiera estar involucrada en regulación de otros procesos.

La transferencia del pSym de *R. etli* CFN42, desde un fondo genético que contiene el pC-13 se da a través de la formación de cointegrados mediante un mecanismo de recombinación dependiente de *recA*. Sin embargo, esto no puede ser generalizado a otras circunstancias como cuando se encuentra el p42a completo, en este caso existen otros puntos de recombinación homóloga o bien que se puedan formar cointegrados por medio de una recombinación sitio específica dependiente de los sitios *att* e *IntA*, cuya resolución podría darse en distintos sitios como ya ha sido observado previamente (Brom *et al.*, manuscrito en preparación).

Como se mencionó en los resultados, la secuencia del pSym mostró que este plásmido tiene un origen de transferencia. Sin embargo, los resultados de los experimentos descritos en el apartado: efecto del pC-13 en la transferencia del pSym, de los Resultados Adicionales, llevan a la conclusión de que el pSym no es capaz de transferirse utilizando su propio origen de transferencia, esto es, bajo las condiciones experimentales utilizadas en el experimento descrito. Sin embargo, no podemos descartar

la posibilidad de que bajo otras circunstancias, tales como condiciones ambientales diferentes, por ejemplo en la presencia de la planta o de otras bacterias, etc., el pSym pudiera movilizarse utilizando su propio *oriT*.

Por otra parte, los análisis del *oriT* y de la nicasa TraA, indicaron que tanto el *oriT* como la proteína TraA del pSym y del p42a, pertenecen a grupos claramente diferentes. Las diferencias entre ambos pudieran ser suficientes para impedir que exista un reconocimiento cruzado de la nicasa de un plásmido por el *oriT* del otro plásmido, ya que las nicasas suelen ser muy específicas (Firth *et al.*, 1996). Es decir, la nicasa del p42a solo puede reconocer el *oriT* localizado en este plásmido y la misma situación se daría en el pSym. Esta teoría se apoyaría con los datos previamente discutidos: Sabemos que el *traA* del p42a se expresa ya que este plásmido es capaz de autotransferirse, sin embargo esta proteína no parece ser capaz de reconocer y cortar el *oriT* del pSym ya que si esta situación se diera se habrían encontrado transconjugantes conteniendo solo el pSym sin el pC-13 en la cruce de CFNX195/pC-13 x 2001, las cuales no surgieron de entre 200 colonias analizadas (ver resultados adicionales). Si todo lo descrito es cierto, es probable que una de dos opciones esté ocurriendo en el pSym: 1) El *oriT* no es activo. El sitio de *nic* está muy conservado con otros plásmidos que si se transfieren por lo que es poco probable que no pudiera ser reconocido por la nicasa adecuada, sin embargo, pudiera existir alguna modificación en el resto del *oriT*, que impidiera que alguna de las otras proteínas se uniera y como consecuencia el relaxosoma no pudiera formarse para permitir el corte por la nicasa. 2) El gen *traA* no se expresa en las condiciones experimentales probadas y por lo tanto no se puede llevar a cabo el corte que inicia todo el proceso de transferencia conjugativa. Cualquiera de las dos posibilidades necesitaría ser probada experimentalmente.

Cabe destacar que en la secuencia del pSym no se han identificado genes homólogos a los *trb* pero si genes homólogos a los *vir* del pTiC58 lo que nos lleva a pensar que si este plásmido puede transferirse bajo circunstancias aún no determinadas, estaría utilizando los genes *vir* para la formación del pilus. Tampoco se han localizado homólogos a *traB* y *traF*, pero estos genes no son indispensables para la transferencia aunque si para una frecuencia óptima de transferencia (Alt-Morbe *et al.*, 1996).

Una de las aplicaciones futuras de los estudios realizados podría ser la utilización del sistema de transferencia contenido en el pC-13, para la movilización de los otros plásmidos de *Rhizobium* o de otros organismos. Mediante la integración del *oriT* en cualquier plásmido y utilizando el pC-13 como "helper" sería posible movilizar el plásmido simbiótico o cualquier otro plásmido sin necesidad de la formación de cointegrados.

El presente trabajo representa un avance en el conocimiento del mecanismo de regulación del p42a pero aún falta mucho por saber con respecto a su interacción con el pSym así como comprobar la función real de los otros genes presuntamente involucrados en transferencia y que están presentes en el pC-13.

CONCLUSIONES

- Todos los genes de transferencia del p42a están contenidos en un cósmido de 27 kb que conserva las propiedades de autotransferencia y de "helper" en la transferencia del pSym.
- Los genes involucrados en la transferencia de p42a guardan alta identidad con los genes de transferencia del pTic58, pNGR234a y otros plásmidos cercanamente relacionados.
- La transferencia del p42a está regulada por la densidad celular de la cepa donadora y un análisis de la secuencia mostró que este plásmido tiene todos los elementos de un sistema de regulación por "quorum sensing".
- Existen al menos tres genes reguladores activos de este sistema:
traI codifica para una acil-HSL sintasa involucrada en la síntesis de la 3-oxo-HSL.
traR y *cinR* son los reguladores transcripcionales
- Los tres genes son indispensables para que la transferencia del p42a se lleve a cabo.
- El modelo presentado propone que ambos reguladores reconocen la 3-oxo-HSL, que actúan a un mismo nivel de regulación y que ambos son indispensables para la expresión de los genes de transferencia.
- La cepa de *R. etli* CFN42 produce al menos otra acil-HSL identificada como 3-OH-HSL cuyo función es aún desconocida.
- Un gen homólogo a *traM* del pTic58 fue identificado, pero su análisis indicó que este gen no se expresa bajo las condiciones probadas, lo que explica la alta frecuencia de transferencia del p42a el cual es aparentemente un plásmido desreprimido para transferencia.
- Aparentemente, el sitio de *nic* del pSym no es reconocido por la nicasa TraA del p42a.

REFERENCIAS

Alt-Morbe, J., J. L. Stryker, C. Fuqua, P. L. Li, S. K. Farrand, and S. C. Winans. 1996. The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmid and distantly related to Ti *vir* genes. *J. Bacteriol.* **178**: 4248-4257.

Anthony, K. G., P. Kathir, D. Moore, K. Ippen-Ihler and L. S. Frost. 1996. Analysis of the *traLEKBP* sequence and the TraP protein from three F-like plasmids: F, R100-1 and ColB2. *J. Bacteriol.* **178**: 3194-3200.

Bittinger, M. A., J. A. Gross, J. Widom, J. Clardy, and J. Handelsman. 2000. *Rhizobium etli* CE3 carries *vir* gene homologs on a self-transmissible plasmid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1019-1021.

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

Cevallos, M. A. H. Porta, J. Izquierdo, C. Tun-Garrido, A. García-de-los-Santos, G. Dávila, and S. Brom. 2002. *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: structural and evolutionary análisis. *Plasmid* **48**: 104-116.

Daniels, R. D. E. De Vos, J. Desair, G. Raedschelders, E. Luyten, V. Rosemeyer, C. Verreth, E. Schoeters, J. Vanderleyden, and J. Michiels. 2002. The *cin* quorum-sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* **277**: 462-468.

Eberl, L., M. K. Winson, C. Sternberg, G. S. A. B. Stewart, G. Christiansen, S. R. Chhabra, B. Bycroft, P. Williams, S. Molin and M. Givskov. 1996. Involvement of *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **20**: 127-136.

ESTA TESIS NO PUEDE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Firth, N., K. Ippen-Ihler, and R. A. Skurray. 1996. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In: Neidhard F., R. Curtiss II, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Rfznikopp, M. Riley, M. Schaechter, W. E. Umbarger. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. ASM Press. Washington, D. C.

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

Frost, L. S., K. I. Ihler and R. A. Skurray. 1994. Analysis of sequence and products of the transfer region of the sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**:162-210.

Fuqua, W. C., S. C. Winans and E. P. Greenberg. 1994. Quorum-sensing in the bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**: 269-275.

Fuqua, W. C., S.C. Winans and E. P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystem: The LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 727-751.

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

García-de los Santos, A. and S. Brom. 1997. Characterization of two plasmid-borne *lpsB* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 891-902.

Garrity, G. M. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition. Springer-Verlang, New York.

Geniaux, E., G. Laguerre, and N. Amarguer. 1993. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Mol. Ecol. 2: 1-8.

Girard, M. L., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. J. Bacteriol. 173: 2411-2419.

Girard, M. L., S. Brom, A. Dávalos, O. López, M. Soberón, and D. Romero. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium cili* by a novel *fixL-fixK* cascade. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1283-1292.

Givskov, M., L. Eberl, and S. Molin. 1997. Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*. FEMS Microbiol. Lett. 148: 115-122.

Green, E. A. and P. C. Zambryski. 1993. Agrobacteria mate in opine dens. Curr. Biol. 3: 507-509.

Haase, J. R. Lurz, A. M. Grahm, D. H. Bamford, and E. Lanka. 1995. Bacterial Conjugation Mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. J. Bacteriol. 177: 4779-4791.

Herrera-Cervera, J. A., J. Caballero-Mellado, E. Romero-Martínez, J. Olivares, and J. Sanjuán. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in spanish soil. FEMS Microbiol. Ecol. 30: 87-97.

Hvang I., d. M. Cook, and S. K. Farrand. 1995. A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. J. Bacteriol. 177: 449-458.

Hooykaas, P. I. J., A. N. Van Brussel, H. Den Dulk-Ras, G. M. S. Von Slogteren, and R. A. Scilperoort. 1981. Sym-plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **29**: 351-353.

Johnston W. B., G. Hombrecher, N. J. Brewin and M. C. Cooper. 1982. Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 85-93.

Li, P.-L., D. E. Everhart, and S. K. Farrand. 1998. Genetic and sequence analysis of the pTiC58 *trb* locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J. Bacteriol.* **180**: 6164-6172.

Lithgow, J. K., A. Wilkinson, A. Hardman, B. Rodelas, F. Wisniewski/Dyć, P. Williams, and J. Downie. 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* **37**:81-97.

Marketon, M. M., and González. 2002. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**: 3466-3475.

Mancewannahkul, K., P. Kathir and K. Ippen-Ihler. 1992. Characterization of the F plasmid mating aggregation gene *traN* and of a new F transfer region locus *trbE*. *J. Mol. Biol.* **225**: 299-311.

Mancewannahkul, K., S. Mancewannahkul and K. Ippen-Ihler. 1993. Synthesis of F pilina. *J. Bacteriol.* **175**: 1528-1531.

Moore, D., C. M. Hamilton, K. Mancewannahkul, Y. Mintz, L. S. Frost and K. Ippen-Ihler. 1993. The *Escherichia coli* K-12 F plasmid gene *traX* is required for acetylation of F pilus. *J. Bacteriol.* **175**: 1375-1383.

Moré, M. I., L. D. Finger, J. L. Stryker, C. Fuqua, A. Eberhard, and S. C. Winans. 1996. Enzymatic Synthesis of a Quorum-Sensing Autoinducer Through Use of Defined Substrates. *Science* **272**: 1655-1658.

Nelson, K. H., T. Plantt and J. W. Hastings. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of bacterial luminescence system. *J. Bacteriol.* **104**: 313-322.

Pesci, E. C., J. P. Pearson, P. C. Seed and B. H. Iglewski. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 3127-3132.

Piper, K. R., R. Beck, S. B. Bodman, and S. K. Farrand. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.

Piper, K. R. and S. K. Farrand. 2000. Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and antiactivator TraM. *J. Bacteriol.* **182**: 1080-1088.

Porter, R. D. 1991. *Moder Microbiology Genetics*. Wiley-L. Inc. 157-189.

Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequence in *Rhizobium phaseoli*. *Nature*. **299**: 724-728.

Reverchon, S., M. L. Bouillant, G. Salmond, and W. Nasser. 1998. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **29**: 1407-1418.

Rosemeyer, V., J. Michiels, C. Verreth, and J. Vanderleyden. 1998. *luxI*-and *luxR* homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **180**: 533-536.



Sherman, J. A., and S. W. Matson. 1994. *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a sequence-specific cleavage/ligation reaction at the F plasmid origin of transfer. *J Biol Chem.* **269**: 26220-26226.

Sullivan, J. T., H. N. Patrick, W. L. Lowter, D. B. Scott, and C. W. Ronson. 1995. Nodulating strain of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8985-8989.

Sullivan, and C. W. Ronson. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-Kb symbiosis island that integrates into a pre-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5145-5149.

Val, D. L. and J. E. Cronan. 1998. In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* **180**: 2644-2651.

Weising K. and G. Kahl. 1996. Natural genetic engineering of plant cell: The molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* **12**: 327-351

Whitehead, N. A., A. M.L. Barnard, H. Slater, N. J.L. Simpson, and G. P.C. Salmond. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365-404

Wilkinson, A., V. Danino, F. Wisniewski-Dyé, J. K. Lithgow, and J. A. Downie. 2002. N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **184**: 4510-4519.

Wisniewski-Dyé, F., J. Jones, S. R. Chhabra and J. A. Downie. 2002. *raiI* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **184**: 1597-1606.