



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS, EN  
BASE A SU LOCALIZACIÓN EN REGIONES INVOLUCRADAS EN  
TRANSFERENCIA CONJUGATIVA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
EUNICE LÓPEZ FUENTES**

**TUTOR PRINCIPAL  
SUSANA BROM  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS (UNAM)**

**DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO (CCG-UNAM)  
DR. EDMUNDO CALVA MERCADO (IBT-UNAM)**

**MÉXICO, D. F. Noviembre, 2013**



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.



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.



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	3
1. Transferencia horizontal de genes	3
1.1. Plásmidos	4
1.2. Conjugación	5
1.2.1. Proceso de conjugación	6
1.2.2. Maquinaria involucrada en la transferencia conjugativa	6
1.2.3. Sistema de procesamiento de DNA (Dtr)	6
1.2.4. Sistema de la formación del par conjugativo (Mpf)	7
2. <i>Quorum sensing</i>	9
3. Generalidades de rizobios	10
3.1. Genes <i>nif</i> y <i>nod</i>	11
3.2. Genoma de <i>Rhizobium etli</i> CFN42	12
4. Transferencia conjugativa en Rizobios	13
4.1. Regulación de la transferencia conjugativa de plásmidos de <i>Rhizobium</i>	13
4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
4.3. <i>Rhizobium etli</i> CFN42	15
4.4. <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	16
4.5. <i>Sinorhizobium fredii</i> cepa NGR234	18
4.6. <i>S. meliloti</i> cepa Rm41	19
5. Conjugación en Gram positivas	20
6. Plasticidad del genoma de <i>Escherichia coli</i>	21
<b>II. ANTECEDENTES</b>	23
<b>III. HIPÓTESIS</b>	25
<b>IV. OBJETIVOS</b>	25
1. Objetivos específicos	25
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
1. Cepas bacterianas y plásmidos	26
2. Medios y condiciones de cultivo	29
3. Diseño de oligonucleótidos	30
3.1. Oligonucleótidos para los <i>orf163</i> , <i>orf164</i> y <i>orf165</i> de <i>Rhizobium etli</i> CFN42	30
3.2. Oligonucleótidos para los genes de <i>E. coli</i>	31
3.3. Oligonucleótidos de los genes: <i>rail</i> , <i>raiR</i> y <i>cinI</i>	31
3.4. Oligonucleótidos utilizados para analizar las construcciones CE3/ <i>Orf163</i> ::pk18mob, CE3/ <i>orf164</i> ::pk18mob y CE3/ <i>orf165</i> ::Sp	32
4. PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )	32
5. Digestiones de vectores y productos de PCR	32
6. Ligación con T4 DNA ligasa	32
7. Transformación	32
8. Verificación de las construcciones en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y S17.1	32
8.1. Purificación de DNA de plásmidos por lisis alcalina	32
8.2. Digestiones del DNA plasmídico	33
8.3. PCR para amplificar los fragmentos clonados en los plásmidos	33

9. Conjugación bacteriana	33
10. Generación de mutantes	34
10.1. Mutantes obtenidas por recombinación homóloga en los <i>orf163</i> y <i>orf164</i>	34
10.1.1. Estrategia para generar las mutaciones	34
10.2. Mutación en el <i>orf165</i>	34
10.2.1. Estrategia para generar la mutante	34
11. Comprobación de las mutantes construidas	35
11.1. Aislamiento de DNA total	35
11.2. PCR usando un oligonucleótido que se alinea a un gen contiguo al gen interrumpido	35
12. Cruzas	35
12.1. Medición de la capacidad de transferencia conjugativa	36
13. Perfiles de plásmidos	36
14. Fusiones transcripcionales	36
14.1. Medición de la actividad de $\beta$ -glucoronidasa	36
15. Complementación heteróloga	36
<b>VI. RESULTADOS</b>	37
1. Papel del <i>orf163</i> en la regulación de la transferencia del p42a de <i>Rhizobium etli</i> CFN42	37
2. Análisis de la participación del <i>orf164</i> en la transferencia del p42a	43
3. Análisis de la participación del <i>orf165</i> en la transferencia del p42a	44
4. Transferencia del p42a: Efecto de la receptora	45
5. Complementación heteróloga	50
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	52
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	57
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	58
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	59

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama de los principales pasos y componentes en el proceso de conjugación en bacterias Gram-negativas.
- Figura 2. Regulación de la expresión de los genes de transferencia del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Spaink *et al.* 1998).
- Figura 3. Modelo de regulación de la expresión de los genes de transferencia en p42a de *R. etli* CFN42.
- Figura 4. Modelo para la regulación del operón *tral-trb* en el pSim pRL1JI de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Danino *et al.*, 2003).
- Figura 5. Modelo de la regulación génica quorum sensing del plásmido simbiótico pNGR234a de *S. fredii* cepa NGR234 (González & Marketon, 2003).
- Figura 6. Sistema *tra* ubicado en pRme41a de *Sinorhizobium meliloti* cepa Rm41 (González & Marketon, 2003).
- Figura 7. Organización estructural de los genes de transferencia del pSfr64a comparada con el pR42a. Las flechas amarillas representan los genes reguladores, las flechas rosas son los genes que participan en la formación del par conjugativo y en el procesamiento del DNA, el cuadro azul representa al *oriT* y las flechas blancas indican a los genes que codifican para proteínas hipotéticas.
- Figura 8. Organización de regiones genéticas de diferentes cepas que presentan similitud de secuencias con *Rhizobium etli* CFN42 (*orf163 - orf165*) y *Sinorhizobium fredii* GR64 (*orf147-orf149*).
- Figura 9. Estrategia utilizada para realizar la mutación.
- Figura 10. Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa de la fusión *tral::uidA* en diferentes fondos genómicos.
- Figura 11. Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa de la fusión transcripcional *tral*, en diferentes fondos genómicos.
- Figura 12. Expresión de *raiR* en el fondo genómico de *R. etli* silvestre y CE3/*orf163::pk18mob*.
- Figura 13. Expresión de *rail* en el fondo genómico de *R. etli* silvestre y CE3/*orf163::pk18mob*.

- Figura 14. Expresión de *cinI* en el fondo genómico de *R. etli* silvestre y CE3/*orf163::pk18mob*.
- Figura 15. Expresión de *raiR::uidA* en el fondo genómico silvestre, *traM-*, *tral-*, *cinR-* y *traR-*.
- Figura 16. Expresión de *rail::uidA* en el fondo genómico silvestre, *traM-*, *tral-*, *cinR-* y *traR-*.
- Figura 17. Expresión de *cinI::uidA* en el fondo genómico silvestre, *traM-*, *tral-*, *cinR-* y *traR-*.
- Figura 18. Organización de regiones genéticas de cepas de *E. coli* con similitud de secuencias con *S. fredii*.

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.
- Tabla 2. Medios de cultivo utilizados.
- Tabla 3. Antibióticos utilizados.
- Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para los orfs que codifican proteínas hipotéticas conservadas.
- Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para el *orf163*.
- Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para genes de *E. coli*.
- Tabla 7. Oligonucleótidos de los genes: *raiR*, *rail* y *cinI*.
- Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para analizar las construcciones CE3/*Orf163*::pk18mob, CE3/*orf164*::pk18mob y CE3/*orf165*::Sp.
- Tabla 9. Frecuencias de transferencia del p42a entre diferentes donadoras y receptoras.
- Tabla 10. Cruzas donde no observamos el efecto de mutar el *orf163*.
- Tabla 11. Análisis de transferencia del p42a sobreexpresando el *orf163*.
- Tabla 12. Transferencia del p42a/*orf164*::pk18mob.
- Tabla 13. Transferencia del p42a/*orf164*::pk18mob desde *Agrobacterium*.
- Tabla 14. Transferencia del p42a/*orf165*::Sp.
- Tabla 15. Transferencia del p42a/*orf165*::Sp desde *Agrobacterium*.
- Tabla 16. Efecto de la donadora y la receptora en la transferencia del p42a.
- Tabla 17. Transferencia del p42a desde *Agrobacterium*.
- Tabla 18. Transferencia del p42a entre cepas de *Agrobacterium*.
- Tabla 19. Porcentaje de identidad de los genes homólogos en *E. coli* a los genes de *S. fredii*.
- Tabla 20. Construcciones analizadas para complementar la cepa de *S. fredii orf147*::pk18mob.



## RESUMEN

Los plásmidos, p42a de *Rhizobium etli* CFN42 y p64a de *Sinorhizobium fredii* GR64 son capaces de conjugar a altas frecuencias y sus regiones de transferencia son muy similares. La transferencia de estos plásmidos es regulada por Quorum Sensing (QS), ésta involucra homoserin lactonas (HSL) sintetasas tipo LuxI y reguladores transcripcionales tipo LuxR. Estos plásmidos difieren en tres proteínas hipotéticas conservadas (hcp, hypothetical conserved proteins), localizadas entre los genes *traH* and *traM*: *orf147* (*trrA*), *orf148* y *orf149* en p64a, y *orf163*, *orf164* y *orf165* en p42a. Para determinar si los genes que codifican hcp equivalentemente localizados en el p42a también participan en la transferencia conjugativa (CT), construimos mutantes, y examinamos su efecto sobre la transferencia conjugativa de este plásmido.

El p42a con la mutación en el *orf163* mostró un pequeño pero reproducible incremento en su CT, en comparación con la silvestre. Inesperadamente, la sobreexpresión del *orf163* también mostró un incremento en CT. Análisis transcripcionales, mostraron que la expresión de *tral* disminuye 5 veces en el fondo genómico de la mutante, comparada con la silvestre. Estos nos sugirió que otra HSL sintasa, capaz de sustituir *Tral*, es expresada en ausencia del *orf163*. La secuencia del genoma de CFN42 codifica varias HSL sintetasas además de *tral*: *cinIcH*, localizada en el cromosoma, y *rail*, codificada en el p42f, adyacente a *raiR*, un regulador tipo LuxR. Análisis transcripcionales de estos genes indicaron que el *orf163* actúa como un regulador positivo de *cinI*, debido a que su expresión disminuye en el fondo genómico mutante.

Concluimos que el *orf163* funciona como un regulador dual, asegurando la transferencia del p42a, ya sea por regular positivamente la expresión de *tral* y *cinI* o regular negativamente la expresión o actividad de algún gen aún no identificado. Las mutantes de los *orf164* y *orf165* tuvieron un efecto sobre CT solo bajo condiciones particulares.

Otro aspecto tratado en este trabajo fue el papel de la receptora en la CT del p42a. Previamente, se definió al p42a como un plásmido autotransferible, debido a que es capaz de transferirse desde una cepa donadora de *Agrobacterium*, sin embargo, la receptora utilizada fue siempre *R. etli*. En este trabajo, observamos que entre cepas de *Agrobacterium*, el plásmido p42a no se transfiere, a menos que el sobrenadante de un cultivo de *Rhizobium* sea adicionado. Además, la transferencia del p42a también requiere algunos genes codificados en otros replicones, tales como *cinch* y *rail*.

Proponemos un modelo para la regulación de la transferencia del p42a, incluyendo nuevos elementos del propio plásmido, como también de otros replicones, mostrando un esquema más complejo que el propuesto previamente.

## ABSTRACT

Plasmids p42a from *Rhizobium etli* CFN42 and p64a from *Sinorhizobium fredii* GR64 are able to conjugate at high frequency, and their transfer regions are very similar. Transfer of these plasmids is regulated through quorum-sensing (QS), involving LuxI-type HSL-synthetases and Lux-R type transcriptional regulators. The plasmids differ in three genes encoding hypothetical conserved proteins (hcp), located between *traH* and *traM*: *orf147* (*trrA*), *orf148* and *orf149* in p64a, and *orf163*, *orf164* and *orf165* in p42a. Mutagenesis of *orf147* (*trrA*) was shown to abolish transfer of pSfr64a. To determine if the hcp-encoding genes equivalently located in pRet42a also participate in conjugative transfer (CT), we constructed mutants, and tested their effect on the CT of this plasmid.

The p42a derivative with a mutation in *orf163* showed a slight but reproducible increase in its CT compared to the wild type (wt). Unexpectedly, overexpression of the wt *orf163*, also led to an increase in CT. Transcriptional analysis, showed that *tral* (HSL synthase) expression decreased 5 times in the mutant compared to the wt. This suggests that another HSL synthase, able to substitute *Tral*, is expressed in the absence of *orf163*. The sequence of the CFN42 genome has shown that it contains various HSLs synthases in addition to the p42a-encoded *tral*: *cinICh*, located on the chromosome, and *rail*, located on p42f, next to *raiR*, a LuxR-type regulator. Transcriptional analysis of these genes indicated that *orf163* acts as a positive regulator of *cinICh*, because their expression decreased in the mutant background.

We conclude that *orf163* functions as a dual regulator, ensuring p42a transfer, either by upregulate *tral* and *cinI* expression or downregulate the expression or activity of a not yet identified gene. Mutagenesis of *orfs164* and *orf165* had effect on CT only when we used *Agrobacterium* as donor and *Rhizobium* as recipient. This suggests that these orfs also play a role in p42a transfer, although only under certain particular circumstances. The manner in which these genes affect conjugative transfer is still an unresolved issue.

Another aspect addressed in this work was the role of the recipient in the CT of p42a. Previously, we defined p42a as self-transmissible because it was able to perform CT from an *Agrobacterium* donor, however, the recipient used was always *R. etli*. In this work, we observed that between *Agrobacterium* strains, p42a plasmid is not transferred, except when *Rhizobium* supernatant was added. Moreover, p42a transfer also requires some genes encoded on other replicons, such as *cinICh* and *railf*.

We propose a model for pRet42a transfer regulation, including new elements from p42a, as well as from other replicons, showing a more complex scheme than the one previously proposed.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Transferencia horizontal de genes

A través de décadas, el mutualismo (interacción biológica entre individuos de diferentes especies, en donde ambos se benefician) y reticulación (evolución caracterizada por hibridación ocasional y combinación de dos especies) han sido comúnmente considerados los procesos más importantes en la evolución de las especies. De los genes revelados por la secuenciación de tres genomas de *Escherichia coli*, poco menos del 40% fueron comunes en los tres. Esto ha sugerido que especies extintas han aportado genes a la capa existente de vida a pesar de que estos contribuyentes podrían no haber estado en la línea directa de descendencia, por lo que se ha podido determinar que una fracción significativa del genoma de *E. coli* (17.6%) fue adquirido a través de transferencia horizontal, la cual puede ocurrir entre organismos que son filogenéticamente muy distantes (Lawrence & Ochmann. 1998). Ahora se sabe que los mutualismos de organismos y la reticulación del linaje son complementados con la transferencia horizontal de genes (HGT, Horizontal Gene Transfer) como los procesos que conducen a las genealogías de las redes de los organismos vivos. Todas las categorías funcionales de genes son susceptibles a HGT, incluso operones RNAr, pero no todos los grupos de organismos experimentan HGT en el mismo grado. La HGT de unidades funcionales completas puede proporcionar al receptor las herramientas necesarias para ocupar nuevos nichos ecológicos (Gogarten & Townsend. 2005).

La HGT es una forma de transferencia directa de material genético entre dos organismos, donde un organismo no es el progenitor del otro (el último caso se conoce como transferencia vertical de genes) (Ochman *et al.* 2000; Brown 2003; Kurland *et al.* 2003; Gogarten & Townsend 2005). Se estima que entre un 1.6% y un 32.6% de los genes en cada genoma procariótico han sido adquiridos vía transferencia horizontal (Koonin *et al.*, 2001). La HGT juega un papel importante en la remodelación de los genomas procariotas (Brown. 2003) y se cree que es principalmente responsable de la amplia diseminación de la resistencia a los antibióticos en las poblaciones (Walsh, 2000).

En la actualidad se conocen tres mecanismos que permiten que ocurra la HGT (Ochman *et al.* 2000; Brown 2003; Kurland *et al.* 2003; Gogarten & Townsend 2005): (1) transformación, cuando un organismo adquiere material genético de su entorno; (2) transducción, cuando un virus infecta

directamente una bacteria con material genético; y (3) conjugación bacteriana, cuando una bacteria transfiere información genética a través del contacto intercelular con otra bacteria. Esta última, se considera el mecanismo más frecuente para la HGT entre bacterias y generalmente se da por medio de plásmidos (Ochman *et al.* 2000; Brown 2003; Kurland *et al.* 2003; Gogarten & Townsend 2005).

### 1.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño en enterobacterias varía desde 1 a 250 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula. El término plásmido fue presentado por primera vez por Joshua Lederberg en 1952 (Lederberg, 1952).

Las moléculas de ADN plasmídico, adoptan una conformación tipo doble hélice al igual que el ADN de los cromosomas, aunque, por definición, se encuentran fuera de los mismos. Se han encontrado plásmidos en casi todas las bacterias.

En general, no contienen información esencial, sino que confieren ventajas al huésped en condiciones de crecimiento determinadas. El ejemplo más común es el de los plásmidos que contienen genes de resistencia a un determinado antibiótico, de manera que el plásmido únicamente supondrá una ventaja en presencia de ese antibiótico. Aunque en algunas bacterias, como los rizobios, sí hay ejemplos de plásmidos que no son dispensables (ver apartado de Rizobios).

Tener algunos genes en plásmidos hace que las especies huéspedes sean capaces de sobrevivir en distintos ambientes sin la carga de un cromosoma más grande. Las bacterias deben ser capaces de dividirse rápidamente bajo ciertas condiciones para obtener una ventaja selectiva, y el poseer cromosomas más pequeños les permite replicar con mayor rapidez que si tuvieran cromosomas mayores. Aunado a esto, los plásmidos pueden ser distribuidos entre diferentes miembros de la población donde no representen demasiada carga energética para la bacteria, ya que son regularmente más fáciles de dispersar de una cepa a otra. Por lo tanto, los plásmidos permiten a las bacterias ocupar una mayor cantidad de nichos ecológicos y contribuir al éxito evolutivo, no solo de las especies bacterianas sino del plásmido mismo (Thomas, 2004).

## 1.2. Conjugación

La conjugación bacteriana es la transferencia de material genético de una célula bacteriana a otra por contacto directo célula-célula, fue descubierta en 1946 por Lederberg y Tatum trabajando con *Escherichia coli* cepa K-12 (Lederberg & Tatum, 1946). Ellos observaron que al mezclar cultivos de dos mutantes con auxotrofías distintas, obtenían cepas protótrofas que eran genéticamente diferentes a cualquiera de las dos cepas originales, por lo que concluyeron que las colonias encontradas era recombinantes genéticas. Posteriormente se encontró que este fenómeno es mediado por un plásmido, llamado plásmido F (Fertilidad). En el proceso de conjugación, las bacterias donadoras poseen un plásmido F (F+), el cual es transferido a las células receptoras que carecen del plásmido (F-). El plásmido F puede integrarse al cromosoma bacteriano y generar a las células denominadas Hfr (Hfr; *High Frequency of Recombination*). En este caso tanto los genes del plásmido F como las del cromosoma pueden ser transferidos a la bacteria receptora F- (Raz & Tannenbaum, 2010).

La conjugación puede llevar a la transferencia de diversos tipos de moléculas:

- La transferencia de plásmidos que contienen en su secuencia toda la información necesaria para su transferencia (plásmidos auto-transmisibles o conjugativos).
- La transferencia de plásmidos que contienen un origen de transferencia (oriT), pero sólo pueden ser transferidos en presencia de un plásmido que aporte las funciones de transferencia, plásmido de ayuda o helper (plásmido movilizable).
- La transferencia de plásmidos por donación, donde un plásmido no transmisible puede ser transferido al formar un cointegrado con un plásmido conjugativo. La cointegración puede ser mediada por recombinación homóloga, recombinación sitio-específica, transposones o secuencias de inserción. La resolución del cointegrado en la célula receptora puede ocurrir o no.
- La transferencia conjugativa mediada por elementos conjugativos integrativos (ICEs, *Integrative Conjugational Elements*) o transposones conjugativos. Estos elementos móviles pueden transferirse a otras células facilitando la movilización de plásmidos (Clewell *et al.*, 1995; Burrus *et al.*, 2002).

### 1.2.1. Proceso de conjugación

El proceso de conjugación se inicia con el contacto entre un posible donador y una posible receptora para formar un par conjugativo. Este contacto se da a través de una estructura llamada "pilus" codificado por un sistema de secreción tipo 4 (T4SS). El contacto entre las células parece ser la señal para que se inicie el procesamiento del DNA, en el cual, una relaxasa produce un corte (nick), en el *oriT*, en la cadena que se va a transferir (hebra T). La relaxasa queda unida al extremo 5' del DNA. El complejo DNA-proteína formado por la hebra T, la relaxasa y otras proteínas accesorias se denomina relaxosoma. El relaxosoma se acopla al sistema T4SS asociado. Luego, la relaxasa dirige a la hebra T a través del poro conjugativo, disponible por una retracción del pilus. Finalmente, dentro de la célula receptora se cataliza la recircularización y la síntesis de la hebra complementaria a la recientemente transferida (Figura 1) (Frost & Koraimann, 2010).

### 1.2.2. Maquinaria involucrada en la transferencia conjugativa

En general, los sistemas de transferencia conjugativa de plásmidos son codificados por un conjunto de genes *tra-trb*, compuestos por dos componentes: el sistema de transferencia y replicación del ADN (Dtr, DNA Transfer and Replication) y al sistema de formación del par conjugativo (Mpf, Mating Pair Formation) (Ding & Hynes, 2009).

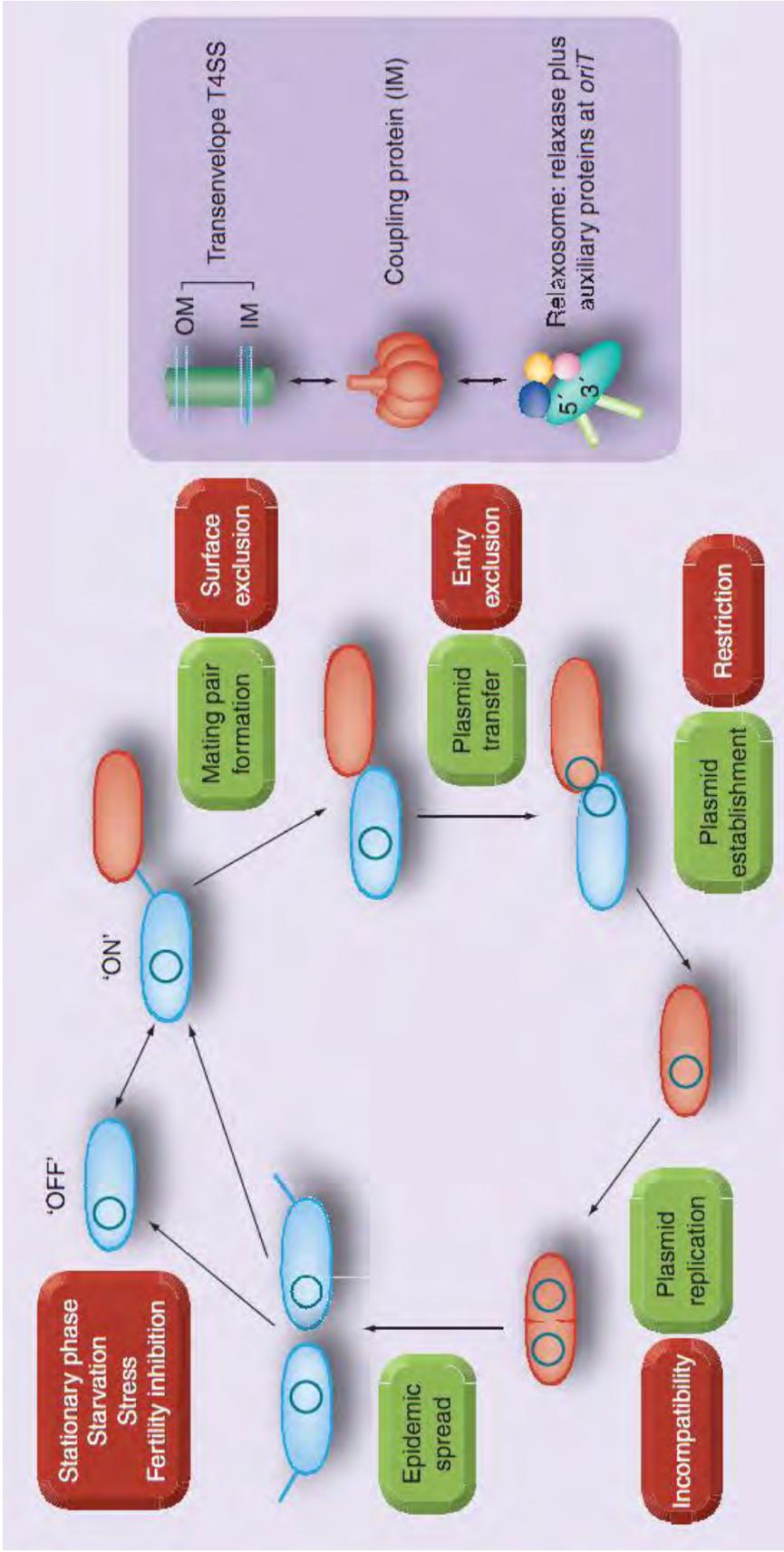
### 1.2.3. Sistema de transferencia y replicación del ADN (Dtr)

El sistema Dtr es responsable del procesamiento del plásmido para formar un intermediario competente para la transferencia (un complejo proteína-ADN) (Schröder & Lanka, 2005) y la regeneración de la molécula de doble cadena dentro de la receptora. Contiene el origen de transferencia (*oriT*) que actúa en *cis* y es el lugar físico a partir del cual se inicia la transferencia conjugativa. También contiene los genes necesarios para el procesamiento del ADN, incluyendo la relaxasa, la helicasa, la primasa y otras proteínas accesorias. Las relaxasas son las enzimas esenciales del sistema Dtr. La conjugación inicia cuando la relaxasa reconoce y se une al *oriT* (Zechner *et al.*, 2000), y comienza su procesamiento mediante la generación de un corte (*nick*) en la hebra a ser transferida (hebra T). En este paso la relaxasa queda unida mediante un enlace covalente al extremo 5' de la hebra T y el ADN se relaja por el corte producido. El complejo ADN-proteína formado por la hebra T, la relaxasa y otras proteínas accesorias codificadas en el sistema Dtr se denomina relaxosoma (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). El relaxosoma es reconocido por una proteína que los acopla (CP, Coupling Protein) al T4SS asociado (Szpirer *et al.*, 2000). Luego, la

relaxasa dirige a la hebra T a través del canal de translocación, y una vez dentro de la célula receptora cataliza la recircularización de la hebra T y la síntesis de la hebra complementaria a la recientemente transferida (Alvarez-Martinez & Christie. 2009).

#### 1.2.4. Sistema de la formación del par conjugativo (Mpf)

El sistema de formación del par conjugativo (Mpf) funciona como un mecanismo de secreción para la transferencia de ADN intracelular durante la conjugación bacteriana. Los componentes del sistema Mpf, comprenden un conjunto mínimo de 10 proteínas conservadas, que forman un complejo proteico transmembranal y un pili sexual expuesto en la superficie, los cuales sirven para establecer contacto físico íntimo con una bacteria receptora. Para funcionar como un aparato de secreción, el complejo Mpf adicionalmente requiere la proteína acopladora (CP, *Coupling Protein*). La CP interactúa con el relaxosoma y lo acopla al poro de secreción formado por el sistema Mpf. El sistema de conjugación Mpf/CP pertenece a la familia de sistemas de secreción tipo IV (T4SS), que incluye tanto sistemas de captación y liberación del ADN, así como los sistemas de translocación de proteínas efectoras de bacterias patógenas, tales como *Agrobacterium tumefaciens* (VirB/VirD4) y *Helicobacter pylori* (Cag) (Schröder & Lanka. 2005).



**Figura 1.** Diagrama de los principales pasos y componentes en el proceso de conjugación en bacterias Gram-negativas. La célula donadora en azul se une a la célula receptora a través del pili, el cual se retrae y trae a las células juntas. Una señal es transmitida a través del T4SS a la proteína de acoplamiento que entonces atrae el relaxosoma al poro conjugativo. Una sola hebra de DNA, covalentemente unida a la relaxasa, es transportada a la célula receptora, seguido por el establecimiento y la replicación del plásmido, o en el caso de un elemento conjugativo integrativo, la incorporación dentro del cromosoma receptor. Muchos elementos de control alteran el nivel de la expresión génica de transferencia en la célula donadora o interfieren con la transferencia y el establecimiento del plásmido en la receptora. Las principales influencias negativas son indicadas en las cajas azules mientras que los pasos en la conjugación y el establecimiento son indicados en las cajas verdes (Frost & Koraimann. 2010).

## 2. Quorum sensing

Quorum sensing (QS) es un proceso de comunicación célula-célula en el cual la bacteria usa la producción y detección de sustancias químicas extracelulares llamadas autoinductores para monitorear la densidad de población celular. El QS le permite a la bacteria sincronizar la expresión génica del grupo y así actuar en unísono (Wai-Leung & Bassler, 2009).

Los pasos fundamentales involucrados en detectar y responder a fluctuaciones en el número celular son análogos en todos los sistemas QS conocidos. Primero, moléculas de bajo peso molecular llamadas autoinductores son sintetizadas intracelularmente. Segundo, estas moléculas son, ya sea pasivamente liberadas o activamente secretadas fuera de las células. Conforme el número de células en una población incrementa, la concentración extracelular de autoinductor igualmente incrementa, causando que el flujo de las moléculas sea hacia el interior de las células. Tercero, cuando los autoinductores se acumulan por encima del umbral mínimo necesario requerido para la detección, receptores afines se unen a los autoinductores y activan las cascadas de transducción de señales que dan lugar a cambios en la expresión génica de toda la población (Wai-Leung & Bassler, 2009).

Uno de los ejemplos mejor estudiados de QS, es el de *Vibrio fischeri*, una bacteria marina que es un simbiote de varios peces marinos y calamares. Conforme la densidad celular incrementa durante la asociación simbiótica con el huésped, los autoinductores (AHL: *acylated homoserine lactones* (homoserin lactonas)) se acumulan dentro y alrededor de las células. Cuando el nivel umbral de AHL es alcanzado, el regulador LuxR es activado por la unión de la AHL. LuxR, un activador transcripcional, entonces induce la expresión del operón *lux*. El operon *lux* contiene *luxI* (codifica para la AHL sintasa) junto con los genes necesarios para producir la luminiscencia. La activación del operón *lux* conduce a un rápido incremento en los niveles del autoinductor y crea un circuito de retroalimentación positiva, que es seguido por el comienzo de la luminiscencia (González & Marketon, 2003).

Los ejemplos de genes regulados por QS incluyen los genes *lux* (luminiscencia) en *V. fischeri*, los genes *tra* (transferencia del plásmido Ti) en *A. tumefaciens*, exoenzimas y factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa* y *Erwinia carotovora*, movilidad *swarming* en *Serratia liquefaciens*, antibióticos y pigmento violaceina en *Chromobacterium violaceum*, y la producción de exopolisacáridos en *Pantoea stewartii*.

### 3. Generalidades de Rizobios

Los rizobios son un grupo de bacterias capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas leguminosas por lo que son de importancia agrícola. La filogenia del gen *16s* agrupa a los rizobios dentro de la división Proteobacteria, mayoritariamente en  $\alpha$ -Proteobacteria con diez géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium* y *Devosia*, y en  $\beta$ -Proteobacteria con dos géneros recientemente descritos *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Masson-Boivin *et al.* 2009). Los genomas de los rizobios de rápido crecimiento por lo general consisten de un cromosoma circular y uno o más grandes plásmidos que van en tamaño de 100 kb a más de 2 Mb (Ding & Hynes, 2009; Romero & Brom, 2004). Los genes requeridos para el establecimiento de la simbiosis (*nod*, *nif* y *fix*) usualmente están localizados en uno de estos grandes plásmidos y se conocen comúnmente como pSims (plásmidos simbióticos). En algunos casos, están situados en las regiones cromosómicas identificadas como islas simbióticas (Ding & Hynes, 2009). Algunos de los otros plásmidos, que suelen ser llamados plásmidos “crípticos”, contienen genes funcionalmente importantes que contribuyen a la capacidad competitiva de este grupo de bacterias en la rizosfera, incluyendo la competitividad para nodular, síntesis de lipopolisacáridos y exopolisacáridos, la utilización de diferentes fuentes de carbono y la transferencia de plásmidos (Brom *et al.* 2000). Específicamente en *Rhizobium etli* CFN42, la cual contiene seis plásmidos (p42a (194 kb), p42b (184 kb), p42c (250 kb), p42d (371 kb), p42e (505 kb) y p42f (642 kb)); el plásmido b (p42b) en adición al plásmido d (p42d) es indispensable para la nodulación, parcialmente debido a la presencia de genes involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos; sin el plásmido f (p42f) esta cepa es incapaz de crecer en medio mínimo y en ausencia de cualquier otro de sus plásmidos su capacidad de crecimiento es reducida en este medio, lo cual nos indica que cada plásmido le confiere alguna ventaja, tanto en las funciones simbióticas como en la vida libre de la bacteria (Brom *et al.* 1992). Estudios más recientes han mostrado que la falta de crecimiento en medio mínimo de derivadas carentes del plásmido f (p42f), se debe, en parte, a que el p42f contiene genes requeridos para la biosíntesis de pantotenato (Villaseñor *et al.* 2011). Un análisis más profundo del plásmido e (p42e) (Landeta *et al.* 2011) mostró que 11% de los genes de este plásmido participan en metabolismo primario. Además se identificaron dos genes que son indispensables para la sobrevivencia de la bacteria en medio rico. En otras especies de *Rhizobium* se encontraron plásmidos equivalentes al p42e, tanto en contenido como en orden de genes. Estos datos indican que los plásmidos forman una parte integral del genoma de los rizobios; y no solamente información genética accesoria.

### 3.1. Genes *nif* y *nod*

En las raíces de las plantas hospederas, los rizobios conducen a la formación de órganos llamados nódulos, que ellos colonizan intracelularmente. Estos endosimbiontes reducen  $N_2$  en  $NH_3$  que es subsecuentemente asimilado por la planta huésped. La fijación de nitrógeno ocurre en respuesta a señales ambientales, tal como la disponibilidad de amonio o nitrato.

Las sustancias responsables de la inducción de la formación de los nódulos son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados producidos por los rizobios, y son llamados factores de nodulación (factores Nod). La síntesis de los factores Nod se desencadena en respuesta a compuestos flavonoides exudados por la planta. Se componen de una estructura básica y modificaciones o decoraciones en los extremos reductor y no reductor. La estructura básica es sintetizada por el producto de los genes *nodABC* que están presentes en todos los rizobios, y sus decoraciones incluyen: metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones que pueden variar en cada especie y biovariedad de rizobio. A las decoraciones de los factores Nod se les atribuye la especificidad o promiscuidad de la interacción con su hospedero (Lloret & Martínez-Romero, 2005).

La coevolución de los rizobios y las leguminosas ha llevado a la especialización de los factores Nod que han generado una amplia gama de decoraciones para adecuarse a su hospedero, en algunos casos con alta especificidad como el caso de *Azorhizobium caulinodans* que sólo nodula a *Sesbania rostrata*, y en el extremo opuesto se encuentra la cepa con la mayor promiscuidad reportada, *Sinorhizobium fredii* NGR234 que abarca un amplio rango de hospederos, nodula a 232 (51%) de 452 leguminosas probadas (Lloret & Martínez-Romero, 2005).

Más de 50 genes han sido identificados con relación a la nodulación. Estos están involucrados en la biosíntesis, modificación, regulación, transporte y secreción de los factores Nod. El término “*nod* genes” se aplica en forma genérica a todos los genes involucrados en la nodulación (Masson-Boivin *et al.* 2009).

Los genes *nif* son los responsables de codificar proteínas relacionadas y asociadas con la fijación de nitrógeno atmosférico a una forma de nitrógeno disponible para las plantas. Estos genes se encuentran en bacterias fijadoras de nitrógeno y cianobacterias. Los genes *nif* centrales son: (i) los genes estructurales que codifican para la dinitrogenasa reductasa (*nifH*) y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la dinitrogenasa (*nifDK*); (ii) *nifEN* que codifica para el andamio molecular para el ensamble del cofactor molibdeno-hierro; (iii) *nifB*, cuyo producto sintetiza un precursor de FeMo conteniendo Fe-S; y (iv) el gen regulatorio *nifA* (Masson-Boivin *et al.* 2009). La expresión de los genes *nif* es

inducida en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno y nitrógeno orgánico (Merrick & Edwards, 1995).

### 3.2. Genoma de *Rhizobium etli* CFN42

Los genomas de varias  $\alpha$ -proteobacterias están divididos en replicones de tamaño variable. Los cromosomas circulares y los grandes plásmidos son común, a excepción del cromosoma lineal en *A. tumefaciens*. Estos genomas multipartitas, como el de *Rhizobium etli*, podrían incrementar el potencial adaptativo de la bacteria, permitiendo la redistribución de funciones esenciales, no esenciales y redundantes para contender con ambientes desafiantes.

Como ya se mencionó, el genoma de *R. etli* CFN42 consiste de un cromosoma circular y seis grandes plásmidos. El contenido promedio de guanina-citosina (GC) es del 61.5%, pero los plásmidos p42a y p42d muestran valores de GC más bajos. Existen en este genoma alrededor de 200 familias de secuencias reiteradas que pueden recombinar produciendo rearrreglos genómicos (Flores *et al.*, 1988). La secuencia del genoma completo reveló 133 familias de repetidas idénticas que son >100 nucleótidos. La mayoría de estas repetidas yacen en los plásmidos p42a y p42d, mientras que hay algunas en los plásmidos p42b, p42c y p42e. La fracción más grande de estas repetidas corresponden a ISs (Insertion sequences) (González *et al.*, 2006). ISs y sistemas de transporte tipo III y IV están principalmente localizados en el p42a y p42d. Tales elementos están ausentes en los otros cuatro plásmidos. Genes esenciales no se localizaron en plásmidos, salvo dos genes que están en el p42e, RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024, codificando respectivamente, una proteína hipotética con un motivo HTH y un regulador de respuesta histidina quinasa de dos componentes, los cuales son esenciales para el crecimiento en medio rico (Landeta *et al.*, 2011). Esta observación explica la recuperación no exitosa de cepas de *R. etli* curadas del p42e (Brom *et al.*, 2000).

La composición génica de los plásmidos p42b, p42c, p42e y p42f de *R. etli* y la presencia ubicua de ortólogos en plásmidos y cromosoma, sugiere que estos plásmidos podrían haber sido parte del genoma ancestral. Los plásmidos p42a y p42d son los replicones más pobremente conservados del genoma de *R. etli*, pero muestran algunas regiones altamente conservadas compartidas con plásmidos de *Agrobacterium* (pTiC58, pTi-Sakura y pRi1724), *Rhizobium fredii* (pNGR234) y *M. loti* (pMLa). Estos segmentos conservados contienen las regiones *vir*, *tra* y *sym* requeridas para transferencia de T-DNA, conjugación y simbiosis, respectivamente (González *et al.*, 2006).

La incidencia de transferencia horizontal génica en *R. etli* es evidenciada por la presencia de un fago y genes relacionados con plásmidos en el cromosoma, esto podría haber contribuido para expandir el repertorio metabólico de *R. etli*. El replicador RepABC, presente en los plásmidos, le confiere gran estabilidad al genoma por el uso de distintos iniciadores (proteína RepC) y orígenes de replicación. Una ventaja de tales genomas divididos podrían ser los tiempos de duplicación más rápidos para replicar el genoma entero. Las características estructurales del genoma de *R. etli* destacan la importancia de los roles evolutivos de transferencia génica horizontal, duplicaciones, pérdida de genes y rearrreglos genómicos (González *et al.*, 2006).

#### 4. Transferencia conjugativa en Rizobios

Tres tipos de evidencia sugieren que la transferencia conjugativa de plásmidos entre cepas de rizobios ha jugado un papel importante en su evolución: 1) La incongruencia filogenética observada al comparar genes cromosomales con genes de plásmidos. 2) La identificación de plásmidos transferibles y movilizables. 3) La secuenciación de genomas ha revelado la presencia de secuencias potencialmente involucradas en la transferencia (Brom *et al.*, 2002; Ding & Hynes, 2009; Tun-Garrido *et al.*, 2003).

##### 4.1. Regulación de la transferencia conjugativa de plásmidos de *Rhizobium*

Existen diversos mecanismos que regulan los pasos iniciales de la conjugación. Estos mecanismos controlan, ya sea la activación o represión de genes involucrados en la transferencia conjugativa.

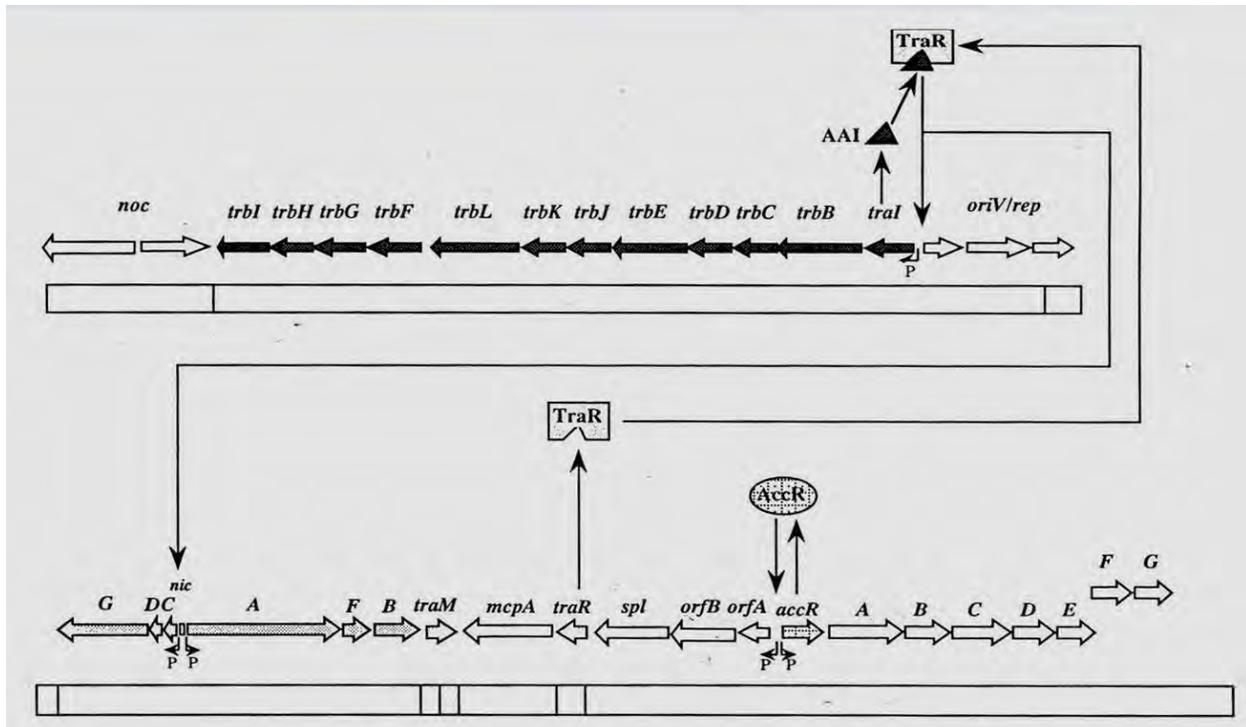
Los estudios sobre la regulación de la transferencia conjugativa de plásmidos de *Rhizobium* han puesto de manifiesto dos diferentes mecanismos de regulación: plásmidos regulados por Quorum sensing (QS), donde la transferencia conjugativa responde positivamente a la densidad de la población (Wilkinson *et al.*, 2002; Danino *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003; Tun-Garrido *et al.*, 2003), y plásmidos regulados por RctA que solo se transfieren bajo condiciones que interrumpen la actividad del represor transcripcional RctA (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Ding *et al.* 2013, proponen otro mecanismo en el plásmido pRleVF39b en *R. leguminosarum* VF39SM, donde el gen TrbR actúa como un represor tanto de la expresión génica como de la transferencia del plásmido.

Los sistemas conjugativos regulados por *quorum-sensing* se describieron inicialmente en el plásmido pTi (tumor-induction plasmid) de *Agrobacterium tumefaciens*. Posteriormente, se encontró que la transferencia de los plásmidos: p42a (el plásmido más pequeño en *R. etli* CFN42), el pRL1J1 (plásmido simbiótico de *R. leguminosarum* cepa 248) y el pNGR234a (el plásmido simbiótico de *Rhizobium fredii* cepa NGR234) también está regulada por QS. A diferencia de los plásmidos conjugativos regulados por QS, en los plásmidos p42d, pAtC58 y el pSymA de *S. meliloti* 1021 se encontró que contienen el gen *rctA*, que codifica un represor de la transferencia conjugativa del plásmido (Pérez-Mendoza *et al.* 2005).

#### 4.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Entre las Rhizobiaceae, *A. tumefaciens* contiene el sistema conjugativo mejor estudiado regulado por QS en su plásmido inductor de tumores, pTi (Farrand, 1998). Este patógeno vegetal induce tumores de agallas de corona en plantas huéspedes susceptibles. Esto es mediado por la transferencia de fragmentos de DNA provenientes de su plásmido Ti directamente dentro del núcleo de la célula vegetal huésped. Estos fragmentos de DNA codifican la producción y secreción de opinas por la planta, que luego son utilizados por *A. tumefaciens* como nutrientes (Piper *et al.*, 1993).

La transferencia del plásmido Ti es regulada por QS. Este plásmido contiene los siguientes reguladores: *trai* (un homólogo de *luxI*), una sintasa de homoserina lactona; *traR* (un homólogo de *luxR*), y *traM*, un antiactivador de *traR*. *Trai* sintetiza una AHL, 3-oxo-C<sub>8</sub>-homoserina lactona (3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL), la cual se une y activa *TraR*. Entonces *TraR* activa sus blancos, los operones: *traAFB*, *traCDG* y *tral-trb*. Cuando el nivel de *TraR* es bajo, *TraM* se une a éste y forma un complejo inactivo, evitando así la transferencia del plásmido hasta que la densidad celular se incremente. Además de *TraM*, los genes *tra* están bajo otro nivel de regulación. Las opinas secretadas por los tumores se unen a una proteína receptora, *AccR* o *OccR*, dependiendo de la cepa. La combinación proteína receptora-opina inicia la transcripción de *traR* ya sea por inducción (*OccR*) o desrepresión (*AccR*). Así, la transferencia conjugativa del plásmido Ti no ocurre en ausencia de opinas (Figura 2) (Piper *et al.*, 1993).



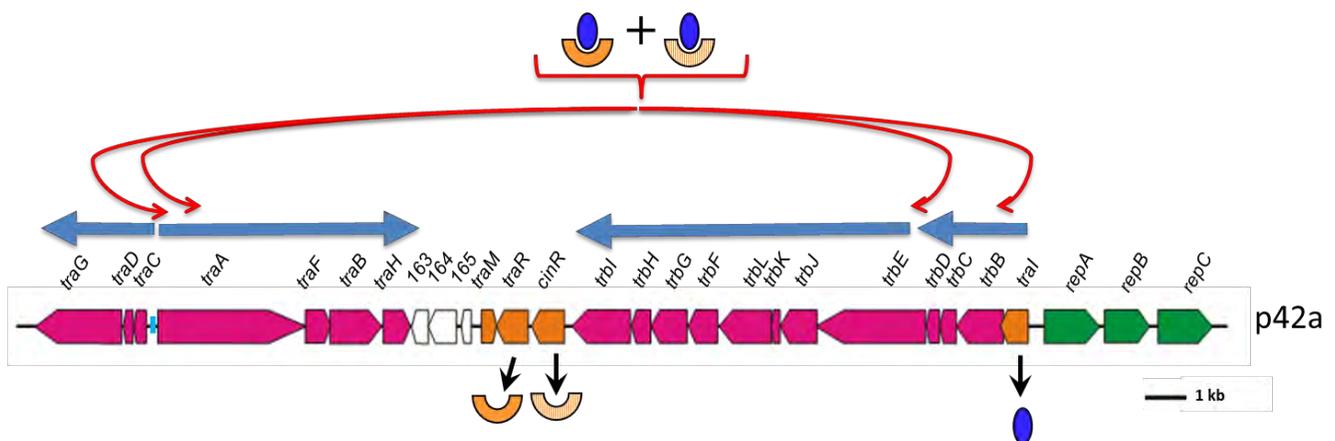
**Figura 2.** Regulación de la expresión de los genes de transferencia del pTi de *A. tumefaciens*. En ausencia de la opina conjugativa, AccR reprime la expresión de *acc* y también del operón *traR*. Los operones *traAFB*, *traCDG* y *traI/trb*, los cuales requieren TraR, no son expresados en los niveles requeridos para conjugación bajo estas condiciones. Sin embargo, el operon *traI/trb* es expresado a un nivel bajo, suficiente para producir pequeñas cantidades del autoinductor (AAI). Cuando las opinas conjugativas interactúan con AccR desestabilizan la interacción entre este represor y el complejo operador/promotor *traR/acc*. Esto permite la producción de TraR. Cuando el AAI se acumula hasta un nivel umbral, éste interactúa con TraR y el complejo ligando-activador puede activar la transcripción de los operones *tra* (Spaink *et al.* 1998)

#### 4.3. *Rhizobium etli* CFN42

En *Rhizobium etli* CFN42, se identificó y caracterizó la región de transferencia del plásmido conjugativo p42a (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Se encontró que es similar a la del pTi de *Agrobacterium*. Los genes de transferencia están regulados por QS, a través de TraI-TraR. A diferencia del pTi, presenta otro regulador transcripcional: CinR, el cual regula positivamente la expresión de *traI*, mientras que su propia expresión requiere de señales ambientales desconocidas. La expresión de TraM es muy débil, por lo que no interfiere con TraR. Tun-Garrido *et al.* 2003 proponen que la homoserin lactona producida por la HSL-sintasa, TraI se une a TraR y a

CinR y estos complejos activan la expresión de los genes de transferencia al unirse a las cajas *tra* (Figura 3).

Otro mecanismo que está involucrado en la regulación de genes de la transferencia conjugativa es el constituido por los genes *rctA/rctB*. Este sistema fue encontrado en el p42d de *R. etli* CFN42, pSymA de *Sinorhizobium meliloti* y pAt58 de *A. tumefaciens*. En este caso, no existe una activación directa de los genes de transferencia, sino que RctA es un represor de la transcripción del operón *virB* (genes involucrados en el Mpf) y *traA*. La transcripción de *rctA* se autoregula positivamente, pero se ve reducida cuando se sobreexpresa RctB, el cual actúa como activador de la conjugación. Recientemente fue demostrado que existe un bloqueo por la unión de RctA, reprimiendo así la conjugación. RctB impide el acceso de RctA a dicho motivo, permitiendo la transcripción de los genes necesarios para la conjugación (Perez-Mendoza *et al.*, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Modelo de regulación de la expresión de los genes de transferencia en p42a de *R. etli* CFN42.

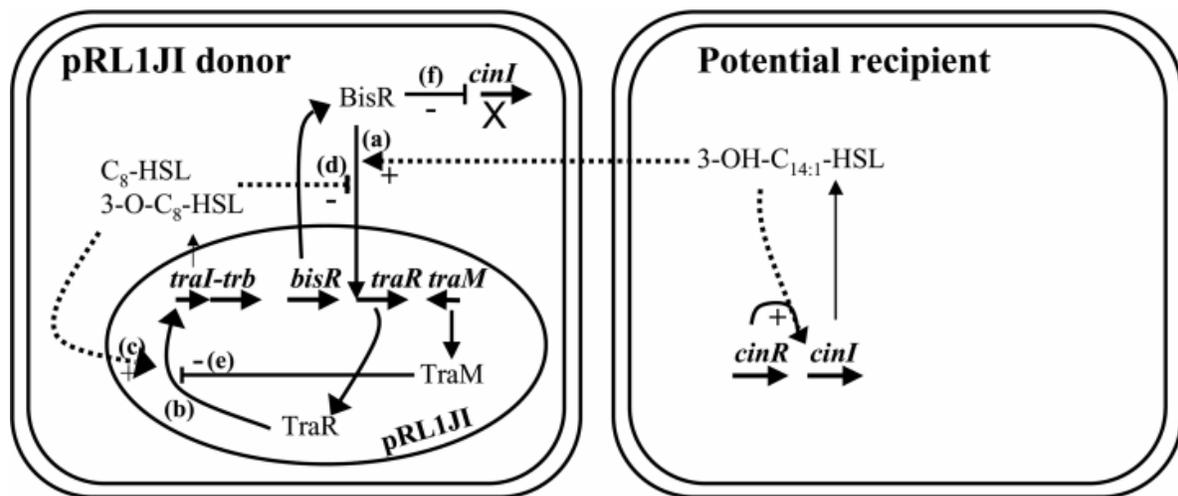
#### 4.4. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* es una bacteria nativa del suelo que puede entrar en simbiosis fijando nitrógeno con varias leguminosas tales como chícharo, arveja y lenteja. Generalmente contiene de 1 a 10 plásmidos, los cuales varían en tamaño desde 30 kb a más de 800 kb (Mercado-Blanco & Toro, 1996).

El plásmido simbiótico pRL1JI de *R. leguminosarum* bv. *viciae* contiene genes requeridos para la nodulación y fijación de nitrógeno. Este plásmido fue uno de los primeros identificados en

rizobios, basado en su alta frecuencia de transferencia entre diferentes cepas rizobiales (Johnston *et al.*, 1978).

Danino *et al.*, 2003, proponen un modelo de regulación en la transferencia del pRL1JI (Figura 4). La transferencia del pRL1JI es fuertemente inducida en respuesta a una homoserina lactona, 3-OH-C<sub>14:1</sub>-HSL producida por cepas receptoras de *R. leguminosarum*. a) En células que actúan como donadoras del pRL1JI, BisR induce *traR* en respuesta a 3-OH-C<sub>14:1</sub>-HSL (AHL producida por *cinI*) suplementada exógenamente por receptoras potenciales (cepas sin el plásmido pRL1JI). b) La inducción de *traR* produce TraR, la cual induce el operón *traI-trb* en respuesta a 3-OC<sub>8</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL (AHLs producidas por *traI*) y 3-OH-C<sub>14:1</sub>-HSL. c) Hay autoinducción del operón *traI-trb* por las AHLs producidas por *traI*. d) Las AHLs producidas por *traI* se acumulan en fases tardías del crecimiento y éstas reducen la inducción de *traR* mediada por BisR. e) La inducción del operón *traI-trb* por bajos niveles de TraR es inhibida por TraM. Sin embargo la represión mediada por TraM es superada después de la inducción de *traR* por BisR. f) La producción endógena de 3-OH-C<sub>14:1</sub>-HSL está muy reducida en gran medida debido a que BisR reprime la expresión del gen cromosomal *cinI*. Esta represión permite a las donadoras del pRL1JI responder a cepas receptoras potenciales carentes de pRL1JI, y por lo tanto de *bisR*, pero no a cepas que lleven el plásmido.

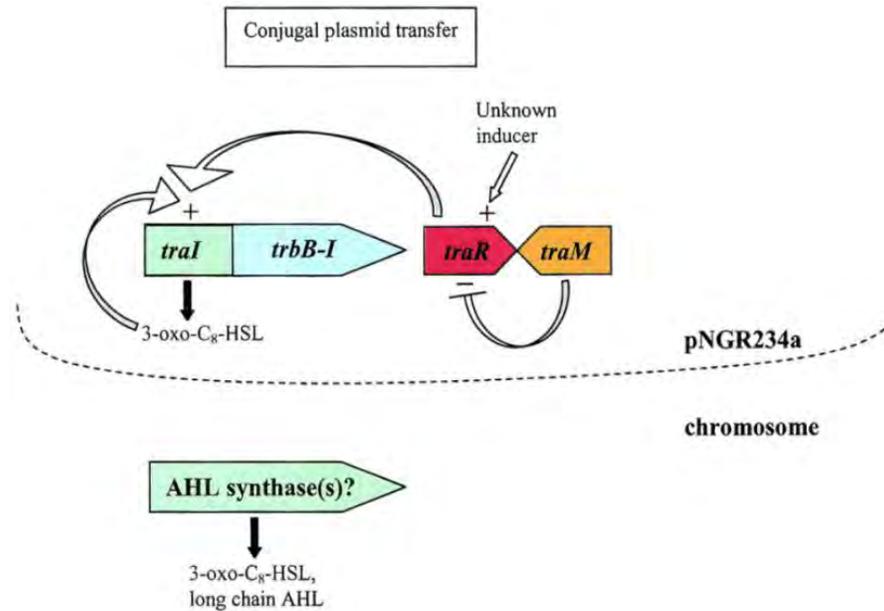


**Figura 4.** Modelo para la regulación del operón *traI-trb* en el pSim pRL1JI de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Danino *et al.*, 2003).

#### 4.5. *Sinorhizobium fredii* cepa NGR234

*Sinorhizobium fredii* cepa NGR234 es única entre los rizobios por su inusual habilidad para nodular más de 100 especies de leguminosas diferentes y al menos una no leguminosa (Pueppke & Broughton, 1999). El genoma de NGR234 consta de dos grandes plásmidos, pNGR234a (536,165 pb) y pNGR234b (aproximadamente 2 Mb) y un cromosoma (aproximadamente 3.5 Mb), los cuales pueden existir independientemente o como cointegrados en cada posible combinación. La mayoría de las funciones simbióticas son codificadas en el plásmido pNGR234a. La secuencia de este plásmido reveló la presencia de un clúster de genes (operón *traI-trb*) con homología al sistema de transferencia conjugativa del plásmido (*tra*) de *A. tumefaciens* (He *et al.*, 2003). He *et al.* mostraron que *traI* es responsable para la síntesis de una AHL que es probablemente 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL. Sin embargo, una mutante en *traI* aún produce un componente que comigra con ésta AHL y otra que parece ser una AHL de cadena larga, sugiriendo que una o más AHL sintasas pueden estar presentes y podrían residir en cualquier parte del genoma. *traI* parece estar autoregulado por TraR y 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL y la actividad de TraR es inhibida por TraM (Figura 5), que corresponde a las propiedades del sistema *tra* de *A. tumefaciens*. No obstante, hay diferencias interesantes entre los dos sistemas. Mientras la transferencia del plásmido Ti normalmente ocurre a la frecuencia de 10<sup>-2</sup>, la transferencia del pNGR234a ocurre a una frecuencia de 10<sup>-9</sup>. Los autores especulan que esta baja frecuencia de transferencia podría deberse a que una señal ambiental, quizá análoga a las opinas de *A. tumefaciens*, podría ser requerida para inducir niveles más altos de la transferencia del plásmido. Sin embargo, las leguminosas noduladas por rizobios no son conocidas por producir opinas *per se*, cepas de las especies *R. leguminosarum* y *S. meliloti* sintetizan una clase de derivados de inositol llamados rizopinas dentro de los nódulos y se ha propuesto que pueden ser utilizadas por los rizobios de vida libre presentes en la rizosfera. Es plausible que las rizopinas regulen la expresión de *traR*, similar a las opinas en *A. tumefaciens*.

Además de los anterior, a través de análisis de expresión de los blancos de TraR esperados, He *et al.* también encontraron que la expresión del operón *traAFB* es muy débil, proveyendo otra posible explicación para la baja frecuencia de transferencia del pNGR234.

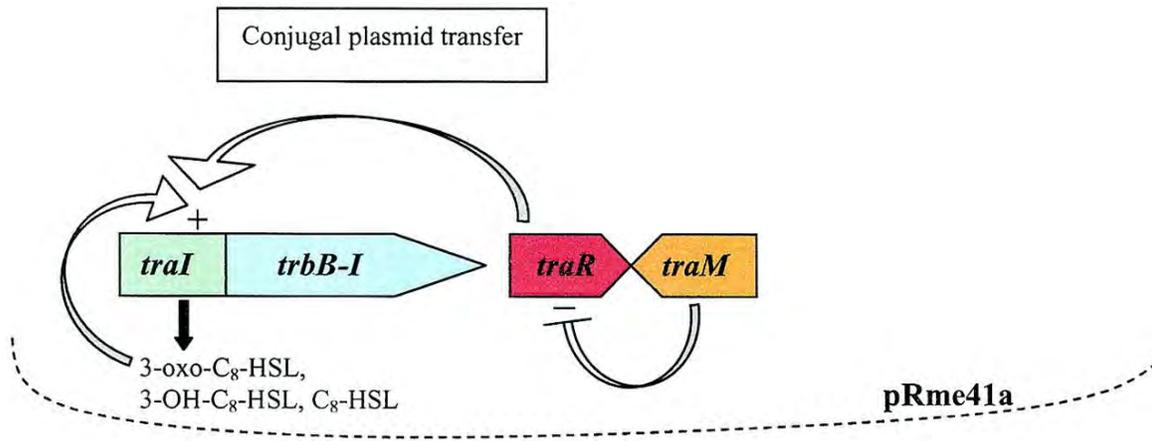


**Figura 5.** Modelo de la regulación génica quorum sensing en el plásmido simbiótico pNGR234a de *S. fredii* cepa NGR234 (González & Marketon, 2003).

#### 4.6. *Sinorhizobium meliloti* cepa Rm41

En *Sinorhizobium meliloti* cepa Rm41 existe un sistema *tra*, nombrado por su homología a los sistemas *tra* de *A. tumefaciens* y *Rhizobium* cepa NGR234. Este sistema reside en el plásmido pRme41a y representa un sistema QS que está presente en Rm41 pero no en otra cepa de *S. meliloti*. Al menos tres genes regulatorios (*traR*, *traI* y *traM*), además de los genes con homología al operón *trb*, han sido identificados en pRme41a (Figura 6) (Marketon *et al.*, submitted). *traI* es una AHL sintasa responsable de la producción de al menos tres diferentes AHLs, 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>8</sub>-HSL y C<sub>8</sub>-HSL. Esta actividad es regulada a través de activador transcripcional *TraR*. *TraM* regula negativamente la actividad de *TraR*, de una manera análoga al sistema *tra* en *A. tumefaciens*, para asegurar que el sistema *tra* esté activo solamente en altas densidades celulares. El sistema *tra* de *S. meliloti* Rm41 también controla la transferencia conjugativa del plásmido, como en otros organismos. La interrupción de los genes *traR*, *traI*, o los genes *trb* abolen la transferencia del plásmido. Interesantemente, la frecuencia de

transferencia, como en NGR234, también ocurre a una muy baja frecuencia (Marketon *et al.*, submitted).



**Figura 6.** Sistema *tra* ubicado en pRme41a de *Sinorhizobium meliloti* cepa Rm41 (González & Marketon, 2003).

## 5. Conjugación en Gram positivas

Las principales diferencias en conjugación entre bacterias gram-negativas y gram-positivas yacen en los mecanismos que han evolucionado para establecer contacto célula-célula e iniciar la transferencia conjugativa, en las gram-positivas esto no está claramente establecido; sin embargo, se han encontrado homologías a proteínas pertenecientes a la familia de proteínas acopladoras TraG/TrwB/VirD4, a la ATPasa VirB4 y a la familia VirB1 de transglicosilasas líticas (Grohmann *et al.*, 2003).

Al igual que en las Gram negativas, las relaxasas son los principales participantes en el inicio de la transferencia conjugativa de plásmidos. En casi todos los sistemas de transferencia conjugativa estudiados hasta ahora, parece que una sola cadena de DNA es transferida de la célula donadora a la receptora. Aunque hay evidencia de un plásmido de Gram positivas propuesto por transferirse en doble cadena. El único *locus* requerido en *cis* para la generación de un plásmido intermediario de una sola cadena es el *oriT*, donde la relaxasa de DNA ejerce su corte dentro del enlace fosfodiéster de un dinucleótido específico, el sitio *nic* (Grohmann *et al.*, 2003).

La transferencia de plásmidos de amplio rango de hospedero ocurre en una frecuencia variable ( $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ ) dependiendo del plásmido y del genotipo del par de apareamiento. El apareamiento requiere la cocultivación de células donadoras y receptoras sobre una superficie sólida. La mayoría de los plásmidos conjugativos identificados hasta la fecha en streptococci y enterococci muestran un amplio rango de hospedero. Ambos grupos confieren un amplio espectro de resistencia a antibióticos y su límite inferior de tamaño es de 15 a 20 kb. La transferencia de plásmidos de amplio rango de hospedero de *Streptococcus* a una vasta gama de bacterias gram-positivas, incluyendo *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pediococcus* y *Listeria*, ha sido demostrada (Grohmann *et al.*, 2003).

Algunos plásmidos de amplio rango de hospedero (pIP501, pRE25, pSK41, pGO1, y pMRC01) codifican al menos una proteína homóloga de la mayoría de las familias de proteínas involucradas en la transferencia de T-DNA y en la transferencia de plásmidos bacterianos en gram-negativas. Estas proporcionan presentación del sustrato (homólogo a VirD4), energética del proceso de translocación (homólogo a VirB4) y la formación del canal de apareamiento (homólogo al putativo VirB1). Homólogos para la formación del contacto entre células donadoras y receptoras, también para los principales componentes del canal de apareamiento aún no han sido detectados. Estas homologías a los sistemas de secreción tipo IV hacen un mecanismo similar quizá más simple, debido a que solo una membrana tiene que ser cruzada para el transporte del DNA conjugativo de plásmidos a partir de gram-positivos. Sin embargo existen algunos modelos bien establecidos, con respecto a cómo se da la transferencia conjugativa en bacterias gram-positivas, como son los plásmidos conjugativos que responden a feromonas, la transferencia del plásmido mediada por agregación en *Bacillus thuringiensis* y en bacterias ácido lácticas, la transferencia de plásmidos conjugativos en Streptomycetes formando micelios, entre otros (Grohmann *et al.*, 2003).

## 6. Plasticidad del genoma de *Escherichia coli*.

Los genomas de *Escherichia coli* varían en tamaño, de 4.6 a 5.6 Mb. Estas diferencias de tamaño indican la presencia de diferentes cantidades de información cepa-específica, la cual representa más del 30% del contenido del genoma completo. *E. coli* es caracterizado por un pangenoma abierto, lo cual indica que las especies continúan evolucionando por la adquisición de genes y

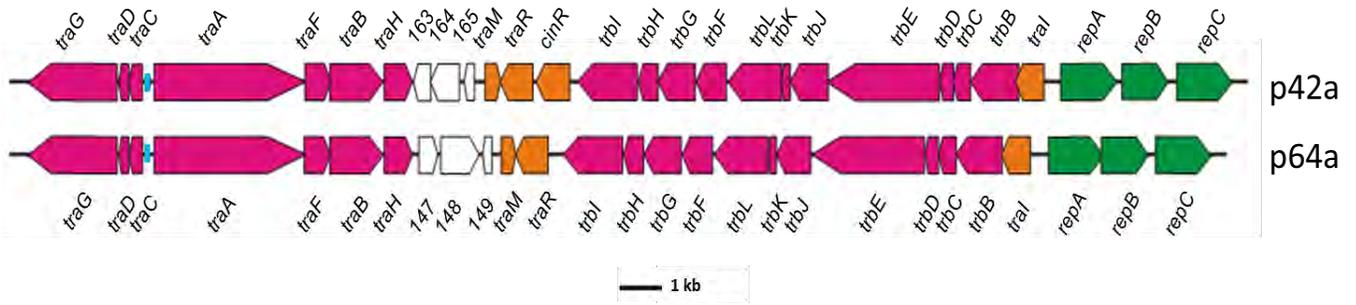
diversificación. La evolución de las variantes de *E. coli* como las conocemos hoy, resulta de eventos de adquisición génica ordenada junto con rearrreglos de DNA y mutaciones puntuales (Dobrindt *et al.* 2010).

Los genomas de *E. coli* tienen una estructura en forma de mosaico, consistiendo de una parte conservada, la cual es también designada como “genoma común o esencial” y regiones intercaladas variables de DNA cepa-específico, el también llamado grupo de genes “flexibles o adicionales”. Este último contiene muchos genes “extraños”, incluyendo genes de virulencia, los cuales presumiblemente han sido adquiridos horizontalmente como elementos genéticos móviles y accesorios (transposones, integrones, elementos de inserción) así como islas genómicas (GEIs, Genomics Islands) o de patogenicidad (Dobrindt *et al.* 2010).

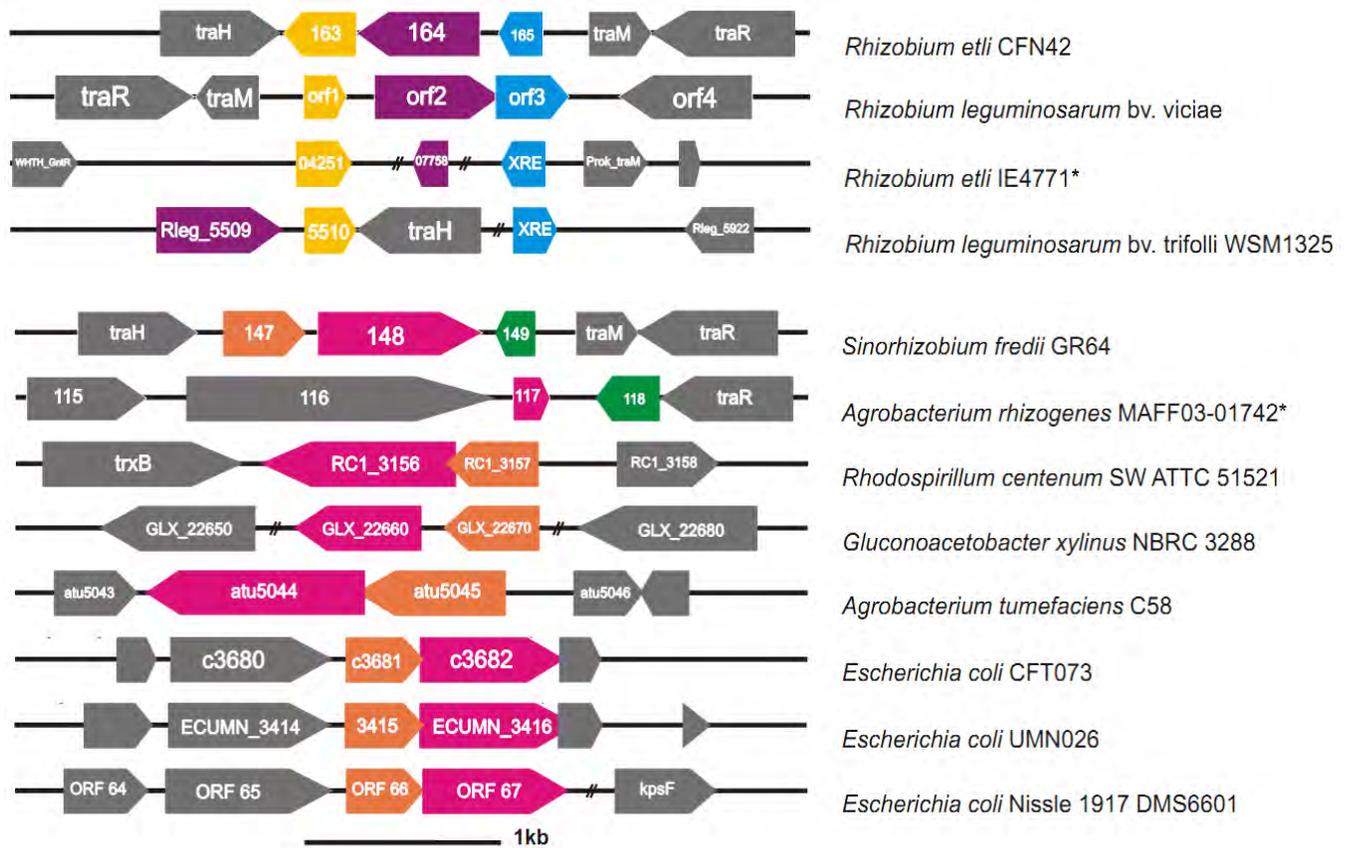
Las GEIs representan un importante tipo de elemento genético flexible; representan entidades de DNA “extraño” de al menos 10 kb en tamaño. Estos elementos pueden proveer una cierta ventaja para la célula huésped bajo condiciones específicas. Si los genes asociados a virulencia están localizados en tal elemento genómico, ésta es considerada una isla de patogenicidad (PAI, Pathogenic Island). Algunas representan regiones de DNA lateralmente transferibles (Dobrindt & Hacker. 2001). Debido a la presencia de genes de movilidad (integrasas, transposasas y elementos IS) o a la existencia de procesos de recombinación o mutaciones puntuales, las PAIs constantemente sufren cambios estructurales. Tras la adquisición e inserción cromosomal, las islas junto con grandes regiones adicionales de secuencias cromosomales flanqueantes pueden ser transferidas por conjugación y recombinación homóloga y así contribuyen a la plasticidad del genoma y a la transferencia simultánea de múltiples características (Schneider *et al.* 2011).

## II. ANTECEDENTES

La cepa tipo de *Rhizobium etli* CFN42 contiene 6 plásmidos (p42a a p42f), y el plásmido p42d corresponde al pSim. Estudios realizados en el laboratorio mostraron que el plásmido p42a es conjugativo, su sistema de conjugación está regulado por quorum-sensing y es capaz de promover la transferencia del p42d (pSim) por cointegración (Tun-Garrido *et al.* 2003; Brom *et al.* 2004). Recientemente, se realizó el análisis del plásmido pSfr64a de la cepa noduladora de frijol *Sinorhizobium fredii* GR64. Este plásmido comparte 3 grandes regiones de homología con otros replicones: una con secuencias del p42d, incluyendo los genes de replicación, una con secuencias del p42a, incluyendo la región de transferencia, y una con secuencias del cromosoma de la cepa *S. fredii* NGR234. El pGR64a es conjugativo y capaz de promover la transferencia del pSim de la cepa GR64. El pGR64a no es capaz de transferirse desde el fondo genómico de *R. etli* CFN42, y viceversa, el p42a no es funcional en el fondo genómico de GR64 (Cervantes *et al.* 2011). El análisis de la región de transferencia del p64a (Cervantes *et al.*, 2011) mostró que posee un sistema de transferencia tipo *tra/trb* y que la organización general de los genes es similar a la del p42a de *R. etli* CFN42 (Fig. 7). Un dato interesante es que las regiones entre los genes *traH* y *traM* de los plásmidos p64a, donde se localizan los *orf147*, *orf148* y p42a (*orf163*, *orf164*) no muestran similitud entre ellas, todas codifican para proteínas hipotéticas conservadas (hcp). Sin embargo, los *orf147* y *orf148* del p64a tienen alta similitud con ORFs que codifican para hcp, y que están contiguos (Fig. 8), como por ejemplo con los *orf66* y *orf67* localizados en una isla genómica de la cepa Nissle 1917 de *E. coli*. Por otra parte, los *orf163* y *orf164* de pRet42a, también tienen similitud con ORFs contiguos. Por ejemplo los *orf2* y *orf3* del plásmido simbiótico pRL1JI de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. El *orf149* de p64a es similar al *orf165* del p42a, ambos pertenecen a una familia de reguladores transcripcionales de respuesta a elementos xenobióticos (XRE). En algunos organismos, como *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum* y *S. medicae*, encontramos únicamente genes similares a los *orf149* y *orf165*. Una mutación en el *orf147* que originalmente fue anotado como una proteína hipotética con función desconocida, anula la capacidad de transferencia del p64a lo cual nos indica que el *orf147* es un gen indispensable para el proceso conjugativo del p64a. Por otro lado la mutación en el *orf148* no afectó la capacidad de transferencia del p64a (Cervantes *et al.*, en preparación).



**Figura 7.** Organización estructural de los genes de transferencia del p64a comparada con el p42a. Las flechas naranjas representan los genes reguladores, las flechas rosas son los genes que participan en la formación del par conjugativo y en el procesamiento del DNA, el cuadro azul representa al *oriT* y las flechas blancas indican a los genes que codifican para proteínas hipotéticas.



**Figura 8.** Organización de regiones genéticas de diferentes cepas que presentan similitud de secuencias con *Rhizobium etli* CFN42 (*orf163*, *orf164* y *orf165*) y *Sinorhizobium fredii* GR64 (*orf147*, *orf148* y *orf149*).

### III. HIPÓTESIS

Los genes que codifican para proteínas hipotéticas, *orf163*, *orf164* y *orf165*, localizados en sitios correspondientes en plásmidos conjugativos participan en el proceso de transferencia conjugativa.

### IV. OBJETIVO

Determinar si los genes que codifican para proteínas hipotéticas *orf163*, *orf164* y *orf165*, localizados en sitios correspondientes son funcionalmente importantes en el proceso de transferencia.

#### 1. Objetivos Específicos

- Obtener derivadas con los genes *orf163*, *orf164* y *orf165* mutagenizados
- Determinar si las mutaciones en los genes *orf163*, *orf164* y *orf165* afectan la capacidad conjugativa de los replicones
- Medir la capacidad de transferencia conjugativa
- Complementar mutantes con sus respectivos genes silvestres
- Complementar la mutante del *orf147* de *S. fredii* GR64, con genes homólogos de *E. coli*

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas o plásmidos	Características relevantes	Referencia
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Cepa silvestre, NaI <sup>R</sup>	Quinto <i>et al.</i> 1982
CFN2001	Derivada de CFN42 p42a <sup>-</sup> p42d <sup>-</sup>	Leemans <i>et al.</i> 1984
CFNX187	Derivada de CFN42 p42a <sup>-</sup> ::Tn5	Brom <i>et al.</i> 1992
CFNX107	Derivada de CFN42 p42a <sup>-</sup> p42d <sup>-</sup> <i>recA</i> <sup>-</sup>	Romero <i>et al.</i> 1995
CFN42 163::pk18mob	Derivada de CFN42 163::pk18mob	Este trabajo
CFN42 163::pk18mob/ pBBMCS53	Derivada de CFN42 163::pk18mob conteniendo pBBMCS53	Este trabajo
CFN42 163::pk18mob/pCT7	Derivada de CFN42 163::pk18mob conteniendo pCT7	Este trabajo
CFN42 163::pk18mob/pCT9	Derivada de CFN42 163::pk18mob conteniendo pCT9	Este trabajo
CFN42/ pBBMCS53	Derivada de CFN42 conteniendo pBBMCS53	Este trabajo
CFNX672	Derivada de CFN42 conteniendo pCT7	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFNX674	Derivada de CFN42 conteniendo pCT9	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFN2001/p42a Tn5	Derivada de CFN2001 conteniendo p42a::Tn5	Este trabajo
CFN2001/p42a 163::pk18	Derivada de CFN2001 conteniendo p42a 163::pk18mob	Este trabajo
CFNX186	Derivada de CFN42 p42f <sup>-</sup>	Brom <i>et al.</i> 1992
CFNX186 p42a Tn5	Derivada de CFN42 p42f <sup>-</sup> conteniendo p42a::Tn5	Este trabajo
CFNX186 163::pk18	Derivada de CFN42 p42f <sup>-</sup> conteniendo p42a 163::pk18	Este trabajo
CFN42 163::pk18mob/pTE3::163	Derivada de CFN42 163::pk18mob complementada con pTE3::163	Este trabajo
CFN42/ <i>raiR</i> :: <i>uidA</i>	Derivada de CFN42/pBBMCS53 conteniendo <i>raiR</i> :: <i>uidA</i>	Este trabajo
CFN42/ <i>rail</i> :: <i>uidA</i>	Derivada de CFN42/pBBMCS53 conteniendo <i>rail</i> :: <i>uidA</i>	Este trabajo
CFN42/ <i>cinI</i> :: <i>uidA</i>	Derivada de CFN42/pBBMCS53 conteniendo <i>cinI</i> :: <i>uidA</i>	Este trabajo
CFN42 163::pk18/ <i>raiR</i> :: <i>uidA</i>	Derivada de CFN42 163::pk18mob/pBBMCS53 conteniendo <i>raiR</i> :: <i>uidA</i>	Este trabajo
CFN42 163::pk18/ <i>rail</i> :: <i>uidA</i>	Derivada de CFN42 163::pk18mob/pBBMCS53 conteniendo <i>rail</i> :: <i>uidA</i>	Este trabajo
CFN42 163::pk18/ <i>cinI</i> :: <i>uidA</i>	Derivada de CFN42	Este trabajo

	163::pk18mob/pBBMCS53 conteniendo <i>cinl::uidA</i>	
CFNX668	Derivada de CFN42, <i>traM::pSUPΩSp</i>	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFNX669	Derivada de CFN42, <i>tral::pSUPΩSp</i>	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFNX670	Derivada de CFN42, <i>traR::loxP</i> Sp	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFNX671	Derivada de CFN42, <i>cinR::loxP</i> Sp	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFNX668 / <i>raiR::uidA</i>	Derivada de CFNX668/pBBMCS53 conteniendo <i>raiR::uidA</i>	Este trabajo
CFNX668 / <i>rail::uidA</i>	Derivada de CFNX668/pBBMCS53 conteniendo <i>rail::uidA</i>	Este trabajo
CFNX668 / <i>cinl::uidA</i>	Derivada de CFNX668/pBBMCS53 conteniendo <i>cinl::uidA</i>	Este trabajo
CFNX669 / <i>raiR::uidA</i>	Derivada de CFNX669/pBBMCS53 conteniendo <i>raiR::uidA</i>	Este trabajo
CFNX669 / <i>rail::uidA</i>	Derivada de CFNX669/pBBMCS53 conteniendo <i>rail::uidA</i>	Este trabajo
CFNX669 / <i>cinl::uidA</i>	Derivada de CFNX669/pBBMCS53 conteniendo <i>cinl::uidA</i>	Este trabajo
CFNX670 / <i>raiR::uidA</i>	Derivada de CFNX670/pBBMCS53 conteniendo <i>raiR::uidA</i>	Este trabajo
CFNX670 / <i>rail::uidA</i>	Derivada de CFNX670/pBBMCS53 conteniendo <i>rail::uidA</i>	Este trabajo
CFNX670 / <i>cinl::uidA</i>	Derivada de CFNX670/pBBMCS53 conteniendo <i>cinl::uidA</i>	Este trabajo
CFNX671 / <i>raiR::uidA</i>	Derivada de CFNX671/pBBMCS53 conteniendo <i>raiR::uidA</i>	Este trabajo
CFNX671 / <i>rail::uidA</i>	Derivada de CFNX671/pBBMCS53 conteniendo <i>rail::uidA</i>	Este trabajo
CFNX671 / <i>cinl::uidA</i>	Derivada de CFNX671/pBBMCS53 conteniendo <i>cinl::uidA</i>	Este trabajo
CFNX672	Derivada de CFN42 / <i>tral::uidA</i>	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
CFNX672 / pTE3::163	Derivada de CFNX672 / pTE3::163	Este trabajo
<u><i>Sinorhizobium fredii</i></u>		
GR64	Cepa silvestre noduladora de frijol (pSfr64a, pSfr64b)	Herrera-Cervera <i>et al.</i> 1999
GR64 147::pk18mob	Derivada de GR64/147::pk18mob	No publicado
GR64 147::pk18mob/pBBR::147	Derivada de GR64/147::pk18mob conteniendo pBBR::147	Este trabajo
GR64 147::pk18mob/pTE3::147	Derivada de GR64/147::pk18mob conteniendo pTE3::147	Este trabajo
GR64 147::pk18mob/pBBR::KO11	Derivada de GR64/147::pk18mob conteniendo pBBR::EKO11_4022- EKO11_4023	Este trabajo
GR64 147::pk18mob/pBBR::W	Derivada de GR64/147::pk18mob conteniendo pBBR::ECW_m4650- ECW_m4651	Este trabajo

GR64 147::pk18mob/pBBR::Nissle	Derivada de GR64/147::pk18mob conteniendo pBBR::orf66 – orf67	Este trabajo
GR64 147::pk18mob/pBBR::83972	Derivada de GR64/147::pk18mob conteniendo pBBR::HMPREF0358_4228- HMPREF0358_4229	Este trabajo
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>		
UIA 143	Derivada de C58 recA <sup>-</sup> pTi <sup>-</sup>	Farrand <i>et al.</i> 1989
GMI 9023	Derivada de C58 pTi <sup>-</sup> pAT <sup>-</sup>	Rosenberg & Hugnet. 1984
UIA 143/p42a::Tn5	Derivada de UIA 143 conteniendo p42a::Tn5	Este trabajo
UIA p42a/163::pk18mob	Derivada de UIA 143 conteniendo p42a 163::pk18mob	Este trabajo
UIA p42a/164::pk18mob	Derivada de UIA 143 conteniendo p42a 164::pk18mob	Este trabajo
UIA p42a/165::Sp	Derivada de UIA 143 conteniendo p42a 165::Sp	Este trabajo
GMI 9023/p42a Tn5	Derivada de GMI 9023 conteniendo p42a::Tn5	Este trabajo
GMI 9023/p42a 163::pk	Derivada de GMI 9023 conteniendo p42a 163::pk18mob	Este trabajo
GMI 9023/p42a 164::pk	Derivada de GMI 9023 conteniendo p42a 164::pk18mob	Este trabajo
GMI 9023/p42a 165::Sp	Derivada de GMI 9023 conteniendo p42a 165::Sp	Este trabajo
UBAPF2	Derivada de C58 pTi <sup>-</sup> pAT <sup>-</sup> , Gm <sup>R</sup>	Hynes <i>et al.</i> 1985
<u>Escherichia coli</u>		
DH5α	Receptora para transformación, Nal <sup>R</sup>	Sambrook <i>et al.</i> 1989
S17-1	C600::RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7)	Simon, 1984
S17/pCT7	Contiene pCT7	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
S17/pCT9	Contiene pCT9	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
<u>Plásmidos</u>		
pK18 mob	Plásmido movilizable, Km <sup>R</sup>	Schäfer <i>et al.</i> 1994
pK18 mobsacB	Plásmido movilizable, Km <sup>R</sup>	Schäfer <i>et al.</i> 1994
pBBR1MCS-5	Vector de clonación, Gm <sup>R</sup>	Kovach <i>et al.</i> 1995
pCT7	pBBMCS53 <i>tral::uidA</i>	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
pCT9	pBBMCS53 <i>traM::uidA</i>	Tun-Garrido <i>et al.</i> 2003
pBBMCS53	Δ <i>lacZ</i> pBBR1MCS-5 conteniendo el promotor del gene <i>uidA</i> de pWM5, Gm <sup>R</sup>	Girard <i>et al.</i> 2000
pTE3	Vector, promotor <i>trp</i>	Egelhoff & Long. 1985
pk18mob::163	Vector pk18mob conteniendo un fragmento del orf163 de 332 pb	Este trabajo

	<i>EcoRI-BamHI</i>	
pk18mob::164	Vector pk18mob conteniendo un fragmento del orf 164 de 316 pb <i>EcoRI-BamHI</i>	Este trabajo
pk18mobsacB::165::Sp	Vector pk18mobsacB conteniendo un fragmento del orf 165 de 175 pb <i>EcoRI-BamHI</i> interrumpido con un cassette de Sp	Este trabajo
pBBR1MCS-5::147	Vector pBBR1MCS-5 conteniendo un fragmento del orf 147 de <i>S. fredii</i> <i>EcoRI- BamHI</i>	Este trabajo
pTE3::147	Vector pTE3 conteniendo un fragmento del orf 147 de <i>S. fredii</i> <i>EcoRI- BamHI</i>	Este trabajo
pBBR1MCS-5::KO11	Vector pBBR1MCS-5 conteniendo un fragmento de los genes <i>EKO11_4022-EKO11_4023</i> de <i>E. coli</i> KO11 de 1508 pb <i>BamHI-EcoRI</i>	Este trabajo
pBBR1MCS-5::Nissle	Vector pBBR1MCS-5 conteniendo un fragmento de los genes <i>ORF 66-ORF 67</i> de <i>E. coli</i> Nissle de 1422 pb <i>EcoRI-BamHI</i>	Este trabajo
pBBR1MCS-5::W	Vector pBBR1MCS-5 conteniendo un fragmento de los genes <i>ECW_m4650-ECW_m4651</i> de <i>E. coli</i> W de 1548 pb <i>EcoRI-BamHI</i>	Este trabajo
pBBR1MCS-5::83972	Vector pBBR1MCS-5 conteniendo un fragmento de los genes <i>HMPREF0358_4228-HMPREF0358_4229</i> de <i>E. coli</i> 83972 de 1228 pb <i>EcoRI-BamHI</i>	Este trabajo
pTE3::163	Vector pTE3 conteniendo el orf163 de 514 pb <i>PstI-BamHI</i>	Este trabajo
pBBMCS53:: <i>raiR</i>	Vector pBBMCS53 conteniendo <i>raiR::uidA</i> de 315 pb <i>EcoRI-XhoI</i>	Este trabajo
pBBMCS53:: <i>rail</i>	Vector pBBMCS53 conteniendo <i>rail::uidA</i> de 344 pb <i>SmaI-EcoRI</i>	Este trabajo
pBBMCS53:: <i>cinI</i>	Vector pBBMCS53 conteniendo <i>cinI::uidA</i> de 514 pb <i>EcoRI-XhoI</i>	Este trabajo

## 2. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se presentan en la Tabla 2 y las concentraciones adicionadas de antibióticos en caso de ser necesario se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 2.** Medios de cultivo utilizados.

Medios de cultivo	Componentes	Referencia
PY ( <i>Peptone-Yeast extract</i> )	0.5% Peptona de caseína 0.3 %Extracto de levadura CaCl <sub>2</sub> 7 mM	Noel <i>et al.</i> 1984
LB (Luria Bertani)	1% Peptona de caseína 0.5% Extracto de levadura 1% NaCl	Sambrook <i>et al.</i> 1989
MM (Medio Mínimo)	Ácido succínico 10 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.1 g/lit K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.22 g/lit CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.22% FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O 0.0005%	Bravo & Mora. 1988

Para medios sólidos, se agregó agar al 1.5%.

**Tabla 3.** Antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentración
Ácido nalidíxico (Nal)	20 µg/ml
Kanamicina (Km)	15 o 30 µg/ml
Gentamicina (Gm)	30 µg/ml
Rifampicina (Rif)	50 o 100 µg/ml
Eritromicina (Ery)	25 µg/ml
Espectinomicina (Sp)	100 µg/ml
Neomicina (Nm)	60 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml
Estreptomina (Sm)	100 µg/ml
Cloranfenicol	100 µg/ml

### 3. Diseño de oligonucleótidos

#### 3.1. Oligonucleótidos para los *orf163*, *orf164* y *orf165* de *Rhizobium etli* CFN42

Se diseñaron oligonucleótidos de las regiones internas de los genes para obtener mutaciones (Tabla 4). Los oligonucleótidos *Forward* tienen en el extremo 5' un sitio de restricción para *EcoR1* y los *Reverse* un sitio de restricción para *BamH1*.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos diseñados para los orfs que codifican proteínas hipotéticas conservadas.

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Posición en p42a	Producto de PCR
<i>orf163</i>	Forward: 5' GCT <u>GAA TTC</u> CAC GGC CAC GAT TGC TT 3'	176724-176740	332 pb
	Reverse: 5' CAG <u>GGA TCC</u> CGC CAT CGA GGA TCA CT 3'	176461-176477	
<i>orf164</i>	Forward: 5' TGC <u>GAA TTC</u> CCG CAA ACG CTT GTT CGA T 3'	177208-177226	316 pb
	Reverse: 5' ACG <u>GGA TCC</u> CCT CGA CGA TTT CCG CTG T 3'	176967-176985	
<i>orf165</i>	Forward: 5' AAA <u>GAA TTC</u> ACA AGC CGA TGC TCT CT 3'	177735-177751	175 pb
	Reverse: 5' CAG <u>GGA TCC</u> TAC CAC ATC GAT GCT CG 3'	177577-177593	

También se diseñaron oligonucleótidos para sobreexpresar este ORF y complementar la mutante CE3 *orf163::pk18mob*. El *Forward* tiene un sitio *PstI* y el *Reverse* un sitio *BamHI* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Oligonucleótidos diseñados para el *orf163*.

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Posición	Producto de PCR
<i>orf163</i> completo	F: 5' AAG <u>CTG CAG</u> TCC GTG AAG CGC CTG AGC 3'	176817 – 176834	506 nt
	R: 5' AGG <u>GGA TCC</u> CGT TGG ATC GGC AGA AAT 3'	176329 – 176346	

### 3.2. Oligonucleótidos para los genes de *E. coli*

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes en la región de transferencia del p64a de *Sinorhizobium fredii* (*orf147* y *orf148*) (Tabla 6), homólogos a los genes de *E. coli*, para realizar complementaciones heterólogas.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos diseñados para genes de *E. coli*.

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Posición	Producto de PCR
<i>EKO11_4022- EKO11_4023</i>	F: 5' TGT GGA TCC ACA TGT ATA CTC AGC GCG AT 3'	4235630 - 4235649	1508 nt
	R: 5' GAA GAA TTC ATG TTT GCT ATC TAA AAT GTC 3'	4237117 - 4237137	
<i>ORF 66 – ORF 67</i>	F: 5' CGC GAA TTC ACA TGT CAT ATT TTT GCT A 3'	76112 – 76130	1422 nt
	R: 5' TTT GGA TCC ATC ATT TGG TCT GGT TCG A 3'	77515 -77533	
<i>ECW_m4650 - ECW_m4651</i>	F: 5' ATG GAA TTC GTA TGT TTG CTA TCT AAA A 3'	4775730 - 4775748	1548 nt
	R: 5' ATT GGA TCC AAT GTG ATT TAT TAA CCC A 3'	4777259 - 4777277	
<i>HMPREF0358_4228 - HMPREF0358_4229</i>	F: 5' GTC GAA TTC TTG CTA TCA TTG TGA AAA T 3'	1876 – 1894	1228 nt
	R: 5' ACA GGA TCC TCC CGG AGT GCA TCC AGC 3'	3086 – 3103	

### 3.3. Oligonucleótidos de los genes: *rail*, *raiR* y *cinI*.

Se diseñaron oligonucleótidos para realizar fusiones transcripcionales a un gen reportero. Los oligos de *raiR* y *cinI* tienen sitios *EcoRI* (Forward) y *XhoI* (Reverse) y los de *rail* tienen un sitio *SmaI* (Forward) y *EcoRI* (Reverse) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Oligonucleótidos de los genes: *raiR*, *rail* y *cinI*.

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Posición	Producto de PCR
<i>raiR</i>	Forward: 5' TTC <u>GAA TTC</u> AAG CCT CTC CCA ATC CTG 3'	492801 – 492819	315 pb
	Reverse: 5' TGC <u>CTC GAG</u> GCA TAG ATG TGG CGG ACT 3'	492505 – 492523	
<i>rail</i>	Forward: 5' CTT <u>CCC GGG</u> AGA TAT CGC CTC TCG AAT 3'	493612 – 493630	344 pb
	Reverse: 5' CTC <u>GAA TTC</u> TGA TCA CGG ACA TCG ACC 3'	493287 – 493305	
<i>cinI</i>	Forward: 5' TGA <u>GAA TTC</u> CAC GCT TCA AGC TCG GCT 3'	3049998 – 3050016	514 pb
	Reverse: 5' TCG <u>CTC GAG</u> TCG TCG GCA TCA GGC GCA 3'	3050493 – 3050511	

3.4. Oligonucleótidos utilizados para analizar las construcciones CE3 *orf163::pk18mob*, CE3 *orf164::pk18mob* y CE3 *orf165::Sp* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Oligonucleótidos utilizados para analizar las construcciones CE3 *orf163::pk18mob*, CE3 *orf164::pk18mob* y CE3 *orf165::Sp*

	<b>Secuencia del oligonucleótido</b>
M13	Forward: 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'
	Reverse: 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'
Sp	5' CGG TGG ATG ACC TTT TGA AT 3'

4. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Las condiciones del PCR consistieron de 30 ciclos, cada ciclo fue de: 94°C, 1 min; 56-64°C, 1 min y 72°C, 1 min.

5. Digestiones de vectores y productos de PCR

Las enzimas de restricción se utilizaron aplicando las recomendaciones del proveedor. Generalmente se colocan en un tubo eppendorf 3 ng de DNA en un volumen final de 20 µl con la solución amortiguadora adecuada (1X) y se digieren con 5U de enzima (una unidad (U) se define como la cantidad de enzima requerida para digerir 1 µg de DNA en una hora). Las digestiones se verificaron en una electroforesis en geles de agarosa.

6. Ligación con T4 DNA Ligasa

El producto de PCR es ligado al vector con la enzima T4 DNA ligasa, ambos previamente digeridos. La reacción de ligación se realiza usando una relación 3:1, inserto:vector y se incuba por 12 hrs a 21°C.

7. Transformación

La ligación (inserto:vector) se transforma en células competentes de *E. coli* DH5α por medio de choque térmico. Se adiciona la ligación a las células competentes; se deja en hielo por 30 minutos; posteriormente se da un choque térmico durante 2 min a 42°C y después en hielo por 5 min. Se añade 1 ml de medio líquido LB y se incuba durante 1 hr a 37 °C con agitación. La mezcla se plaquea en cajas conteniendo medio LB con X-gal (40 mg/ml disuelto en DMSO) y el antibiótico requerido, para poder seleccionar entre colonias blancas y azules. Posteriormente se realiza lisis alcalina para el aislamiento de plásmidos, el producto de la lisis se transforma a *E. coli* S17.1.

8. Verificación de la construcción en *E. coli* DH5α y S17.1

8.1. Purificación de DNA de plásmidos por lisis alcalina

La purificación de DNA de plásmidos se realizó como lo describe Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989): Se inocularon 5 ml de medio de cultivo con antibiótico, con la cepa de interés,

se incubó por 12 hrs a 37°C con agitación (250 rpm). Se centrifugaron 1.5 ml del cultivo a la máxima velocidad (14 Krpm) durante 2 min, se retiró totalmente el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió en 200 µl de la Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) y se mezcló con vortex. Se adicionaron 200 µl de la Solución II (1% SDS, 0.2 N NaOH; preparada al momento) y se mezcló por inversión. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Después se adicionaron 200 µl de solución III (5 M acetato de potasio, pH 5.5). Se mezcló por inversión y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó a máxima velocidad (14 Krpm) a temperatura ambiente durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Se realizaron dos extracciones con 0.5 ml de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24/24/1), se centrifugaron 2 min a temperatura ambiente, se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf. Posteriormente se hicieron otras dos extracciones con coloroformo isoamílico (24/1). Se centrifugó 2 min a temperatura ambiente y la fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf. Se adicionó al sobrenadante 1 ml de etanol puro. Se mezcló por inversión varias veces, y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a la máxima velocidad durante 10 min. Se retiró todo el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla de DNA y se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla de DNA con ayuda del Savant. Se resuspendió en 20 µl de solución amortiguadora TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) + RNasa (20 µg/ml) y se almacenó a -20 °C.

#### 8.2. Digestiones del DNA plasmídico

El plásmido ligado con el inserto (3 µg) obtenido de la lisis alcalina se digirió con las enzimas de restricción (5 U) correspondientes en un volumen final de 20 µl con la solución amortiguadora correspondiente (1X). Se analizaron en un gel de electroforesis.

#### 8.3. PCR para amplificar el fragmento clonado en el plásmido

Se utilizó como templado el DNA obtenido de la lisis alcalina y se amplificó por medio de PCR el fragmento clonado en *E. coli* usando oligonucleótidos que se alinean en el plásmido. Las condiciones del PCR consistieron de 30 ciclos, cada ciclo fue de: 94°C, 1 min; 56-64°C, 1 min y 72°C, 1 min.

### 9. Conjugación bacteriana

La transferencia de las construcciones de los plásmidos con los diferentes insertos en *E. coli* S17.1 a *R. etli* se realizaron por conjugación. La cepa *E. coli* S17.1 contiene los genes de transferencia integrados al cromosoma (Simon, 1984). Las cepas de interés fueron inoculadas en 2.5 ml de PY e incubadas por 12 hrs a 30°C con agitación. Posteriormente se mezclaron la cepa receptora con la donadora en una relación 2:1 y esta mezcla se goteó en medio PY sólido y se incubó por 12 hrs a 30°C. Posteriormente se colectó el crecimiento celular y se resuspendió en 1 ml de solución estéril de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, 0.01% Tween 40. Se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> y se platearon 100 µl de cada una de las diluciones en el medio selectivo apropiado para la obtención de transconjugantes. Se incubaron las placas de 2 a 3 días a 30°C.

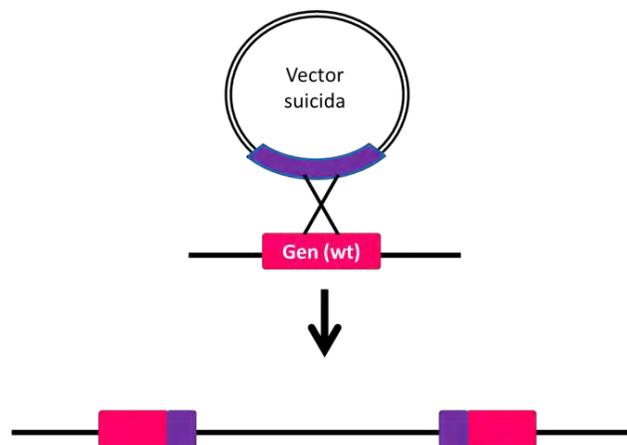
## 10. Generación de mutantes

### 10.1. Mutantes obtenidas por recombinación homóloga en los *orf163* y *orf164*

Las mutantes CE3 *orf163*::pk18mob y CE3 *orf164*::pk18mob fueron construidas por la interrupción con el vector pk18mob introducido por recombinación homóloga. Para mutar el *orf163*, un fragmento interno *EcoRI* – *Bam*HI de 332 pb fue clonado en el pk18mob; en el caso del *orf164*, un fragmento interno *EcoRI* – *Bam*HI de 326 pb fue clonado en el pk18mob.

#### 10.1.1. Estrategia para generar la mutación

La transferencia del plásmido pk18mob hacia *R. etli* CFN42, se realizó por conjugación. El pk18mob es un vector suicida por lo que se tiene que integrar para poder replicarse, esto sucede por recombinación homóloga, por lo cual obtenemos dos copias incompletas del gen interrumpidas por el pk18mob (Figura 9).



**Figura 9.** Estrategia utilizada para generar la mutación

### 10.2. Mutante en el *orf165*

Se clonó un fragmento interno *EcoRI* – *Bam*HI de 175 pb en el vector pk18\*mobsacB. Ésta construcción fue digerida con *EcoRV*, se introdujo un cassette de Sp y esto fue transformado en *E. coli* S17. Posteriormente se transfirió la construcción a CE3 por conjugación seleccionando con los antibióticos Sp y Km. Las recombinantes sencillas fueron plateadas en sacarosa para la obtención del doble crossing.

#### 10.2.1. Estrategia para generar la mutación

El vector pk18\*mobsacB tiene un gen *sacB*, el cual produce levansacarasa, que es letal para células creciendo en presencia de sacarosa.

## 11. Comprobación de las mutantes construidas

### 11.1. Aislamiento de DNA total

El aislamiento de DNA total se realizó como lo describe Maniatis (Maniatis *et al.*, 1989). Inoculamos 5 ml de medio de cultivo con la cepa de interés, se incubaron 12 hrs a 30°C con agitación (250 rpm). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 14 Krpm a temperatura ambiente y lavadas con 1 ml de una solución amortiguadora TE 50/20, pH 8.0 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 8.0). Se centrifugó durante 2 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla celular fue resuspendida en 550 µl de TE (50/20), con vortex. Adicionamos 20 µl de lizosima 20 mg/ml (disuelta en H<sub>2</sub>O), se mezcló e incubó por 5 min a 37°C. Agregamos 50 µl de pronasa (5 mg/ml en TE 50/20, predigerida 1 hr a 37 °C), se mezcló e incubó por 5 min a 37 °C. Agregamos 50 µl de SDS al 10% (diluido en H<sub>2</sub>O), se mezcló e incubó 10 min a 37°C (o hasta que haya una lisis total). Incubamos la muestra a 80 °C por 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Agregamos 3 µl de RNasa (10 mg/ml en TE 10/1, pretratada 10 min a 95 °C), se mezcló e incubó 10 min a 37°C. Adicionamos 220 µl de acetato de amonio (saturado), se mezcló vigorosamente e incubó 5 min en hielo. Se centrifugó 5 min a 14 Krpm. El pellet contiene restos celulares y proteínas precipitadas. El sobrenadante fue transferido a otro tubo eppendorf (800 µl), y se agregaron 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24/24/1), mezclamos vigorosamente y centrifugamos por 3 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf (800 µl), adicionamos 500 µl de cloroformo/isoamílico (42/1), fue mezclado vigorosamente y se centrifugó por 3 min a 14 Krpm. Transferimos el sobrenadante a tubo eppendorf nuevo, se agregaron 600 µl de isopropanol y se mezcló varias veces (si hay formación de hebras de DNA, se recomienda, transferirlas a otro tubo eppendorf conteniendo etanol al 70%). Se centrifugó por 3 min la pastilla, que contiene el DNA. Se descartó el sobrenadante. Se lavó dos veces con 1 ml de Etanol al 70% (a temperatura ambiente). Retiramos el sobrenadante y secamos la pastilla de DNA en el Savant. Fue resuspendido en 100 µl de TE 10/1 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) + RNasa (20 µl/ml) y se almacenó a -20 °C.

### 11.2. PCR usando un oligonucleótido externo que se alinea a un gen contiguo al gen interrumpido

Se realizó un PCR usando como templado DNA total con las condiciones antes descritas. Se utilizó un oligonucleótido externo adecuado y un oligonucleótido que se alinea al gen *lacZ* ubicado en el vector *pk18mob*.

Para analizar la mutante en el *orf165* se utilizó un oligo que se alinea con el cassette de Espectinomicina y oligos externos que se alinean con los genes contiguos.

## 12. Cruzas

Los experimentos de conjugación se realizaron como se describe en el punto 9 de este apartado.

### 12.1. Medición de la capacidad de transferencia conjugativa

La capacidad de transferencia conjugativa se expresó como No. de transconjugantes entre el No. de donadoras.

### 13. Perfiles de plásmidos

Se utilizó la técnica de Eckhardt (Eckhardt, 1978) para detectar los plásmidos en las diferentes cepas.

### 14. Fusiones transcripcionales

Las construcciones pCT7 (pBBRIMCS53 *tral::uidA*) y pCT9 (pBBRIMCS53 *traM::uidA*) (Tun-Garrido *et al.* 2003) fueron introducidas a *R. etli* CFN42 y a CE3/*orf163::pk18mob* por medio de conjugación.

Para construir las fusiones transcripcionales al gen reportero *uidA*, de los genes *raiR*, *rail* y *cinI*, se clonaron los fragmentos (315, 344 y 514 nt respectivamente) que contienen las regiones intergénicas y el inicio del gen de interés en el vector PBBR1GUS con la orientación adecuada. Estas construcciones fueron introducidas a *R. etli* CFN42, a la CE3/*orf163::pk18mob* y a las mutantes en los diferentes genes regulatorios (*traR*<sup>-</sup>, *cinR*<sup>-</sup>, *traM*<sup>-</sup> y *traI*<sup>-</sup>) por conjugación.

#### 14.1. Medición de la actividad de β-glucuronidasa

Los cultivos de las derivadas de *R. etli* CFN42 conteniendo las fusiones transcripcionales fueron crecidas hasta la fase estacionaria. La actividad cuantitativa de *uidA* fue medida en muestras de 1 ml de cultivo con *p*-nitrofenil glucorónido como sustrato. La actividad específica de β-glucuronidasa se expresó como nm/min/mg proteína.

### 15. Complementación heteróloga

Se clonaron los productos de PCR de los pares de genes de *E. coli* homólogos a los *orf147* y *orf148* (cepas: W, KO11, Nissle y 83972) en el vector pBBRMCS5, un vector replicable en *Rhizobium*. Estas construcciones se introdujeron a la cepa de *S. fredii* GR64 *orf147::pk18mob* por conjugación.

## VI. RESULTADOS

### 1. Papel de *orf163* en la regulación de la transferencia del p42a de *R. etli* CFN42.

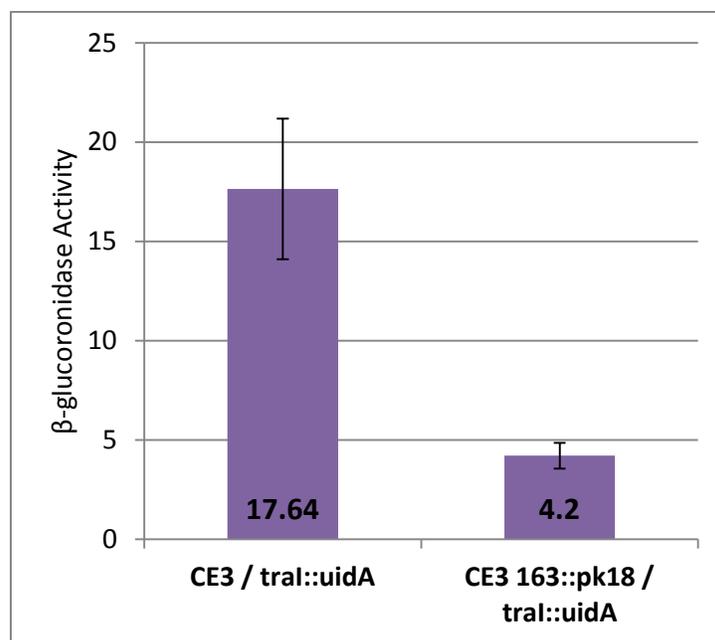
En el plásmido transferible de CFN42, p42a, el *orf163* se encuentra en la región de transferencia de este plásmido y está anotado como una proteína hipotética conservada de 377 pb, con un dominio conservado putativo llamado COG4634, miembro de la superfamilia cl18792.

Para analizar el papel del *orf163*, examinamos la habilidad de transferencia del p42a en una cepa conteniendo una mutación en este orf. La frecuencia de transferencia fue más alta (10-100 veces) al usar como donadora la cepa con la mutación en el *orf163* que en la silvestre (CFNX187) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Frecuencias de transferencia del p42a entre diferentes donadoras y receptoras.

Donadora	Receptora	Frecuencia de transferencia (No. de transconjugantes /Donadoras)
CFNX187 wt	UIA 143	$1.4 \times 10^{-1} \pm 1.6 \times 10^{-1}$
CE3 <i>orf163::pk18</i>	UIA 143	$3.7 \times 10^0 \pm 3.8 \times 10^0$
CFNX187 wt	CFN2001	$4.1 \times 10^{-3} \pm 4.4 \times 10^{-3}$
CE3 <i>orf163::pk18</i>	CFN2001	$1.6 \times 10^{-1} \pm 2.7 \times 10^{-1}$

Para entender mejor el papel que pudiera estar jugando el *orf163*, decidimos introducir las fusiones transcripcionales de algunos genes regulatorios (*tral::uidA* y *traM::uidA*) a la cepa con la mutación y a la silvestre. Al examinar la expresión de estas fusiones, observamos que en el fondo genómico de la mutante la expresión de *tral* disminuye 5.2 veces en comparación con la silvestre (Fig. 10). Esto es contradictorio con lo obtenido en los experimentos de conjugación, donde la frecuencia de transferencia aumenta en comparación con la silvestre, por lo que lo esperado hubiera sido que la expresión de *tral* aumentara, sin embargo no fue así. Esto nos hizo pensar que otra HSL pudiera estar jugando un papel en la transferencia de este plásmido, y que de algún modo el *orf163* la podría estar regulando. Algunos posibles candidatos serían genes anotados como HSL sintasas tales como RHE\_PA00032 (ubicada en p42a), *cinI* (RHE\_CH02916, ubicada en cromosoma) y *rail* (RHE\_PF00440, ubicada en p42f).



**Figura 10.** Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa de la fusión *tral::uidA* en diferentes fondos genómicos.

Posteriormente, analizamos la transferencia del p42a desde otros fondos genómicos y observamos que el efecto de la mutación del *orf163* solo se observa si la donadora es la CFN42 conteniendo todos sus replicones. Este aumento de la frecuencia de transferencia no se observa al usar como donadora CFN42 carente de los plásmidos p42f o p42d (Tabla 10), es decir, la frecuencia de transferencia es la misma entre la cepa con la mutación en el *orf163* y en la silvestre.

**Tabla 10.** Cruzas donde no observamos el efecto de mutar el *orf163*.

DONADORA	RECEPTORA	Cepa	Características
2001/ p42a (Tn5 o 163::pk)	GMI	CFNX186	pf <sup>-</sup>
CFNX186/ p42a (Tn5 o 163::pk)	GMI	GMI	pTi <sup>-</sup> pAT <sup>-</sup>
CFNX186/ p42a (Tn5 o 163::pk)	CFNX2001	CFNX2001	pa <sup>-</sup> , pd <sup>-</sup>

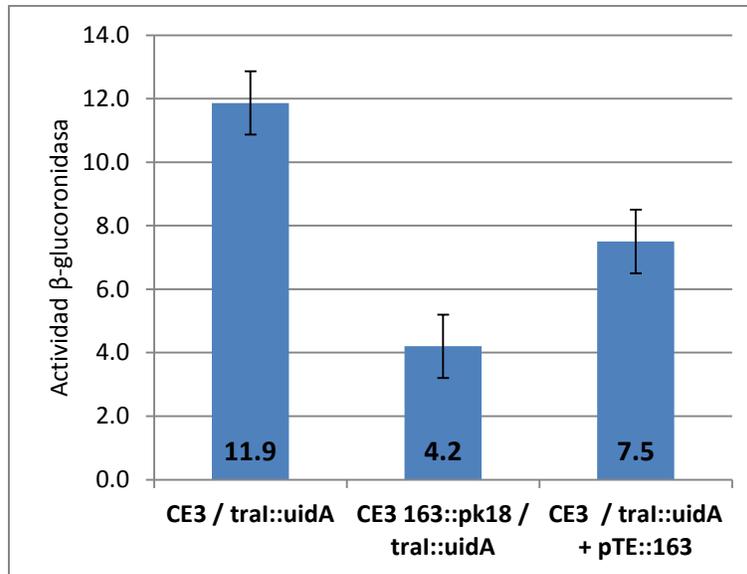
Para tener una idea más clara del papel de este orf, lo sobreexpresamos en un vector de amplio rango de hospedero con un promotor *trp* de *Salmonella typhimurium*, llamado pTE3. Esta construcción fue introducida por conjugación a la cepa silvestre y a la cepa CE3/*orf163::pk18mob* y se examinó la habilidad de transferencia del p42a. El análisis mostró que la frecuencia de transferencia de la cepa complementada con el *orf163* en el vector pTE3, también tiene

variaciones dependiendo de la receptora utilizada (Tabla 11). Cuando usamos una cepa de *Agrobacterium* sin plásmidos (GMI), la frecuencia de transferencia de la cepa complementada aumenta aún más que desde la mutante; pero al usar otra cepa de *Agrobacterium* pAT<sup>+</sup> (UIA), la F.T. se iguala con la de la silvestre.

**Tabla 11.** Análisis de transferencia del p42a sobreexpresando el *orf163*.

DONADORA	RECEPTORA	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA
CFNX187	GMI	2.80 E- <b>02</b> ± 0.008
CE3 163::pk	GMI	1.43 E- <b>01</b> ± 0.16
CE3 163::pk / pTE3::163	GMI	1.60 E+ <b>00</b> ± 0.17
CFNX187	UIA	1.34 E- <b>01</b> ± 0.13
CE3 163::pk	UIA	3.11 E- <b>00</b> ± 3.3
CE3 163::pk / pTE3::163	UIA	1.36 E- <b>01</b> ± 0.028

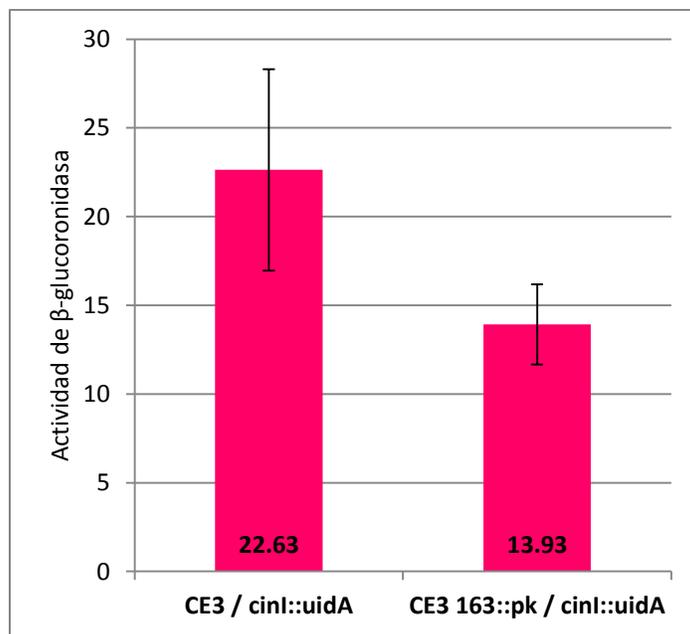
Debido a un experimento anterior (Figura 10), decidimos introducir la construcción pTE3::163 a la cepa CFNX672 (CE3/ *tral*::*uidA*) para analizar de qué manera afecta la expresión de *tral*, cuando sobreexpresábamos el *orf163*. Observamos en la gráfica, (Figura 11) que al sobreexpresarlo en el vector pTE3, la expresión de *tral* es menor que en la cepa silvestre pero se recupera parcialmente comparada con la mutante del *orf163*.



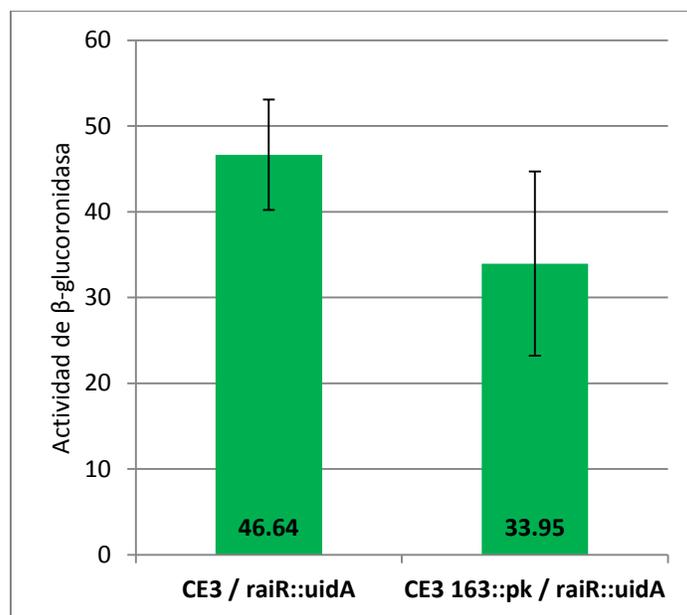
**Figura 11.** Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa de la fusión transcripcional *tral*, en diferentes fondos genómicos.

Al obtener todos los resultados antes mencionados y para elucidar que otros genes podría estar regulando el *orf163*, se construyeron derivadas conteniendo fusiones de algunas HSL sintasas (*rail* y *cinI*) y un regulador tipo LuxR (*railR*) a un gen reportero. La expresión de estas fusiones fue examinada en el fondo genómico silvestre y CE3/*orf163::pk*.

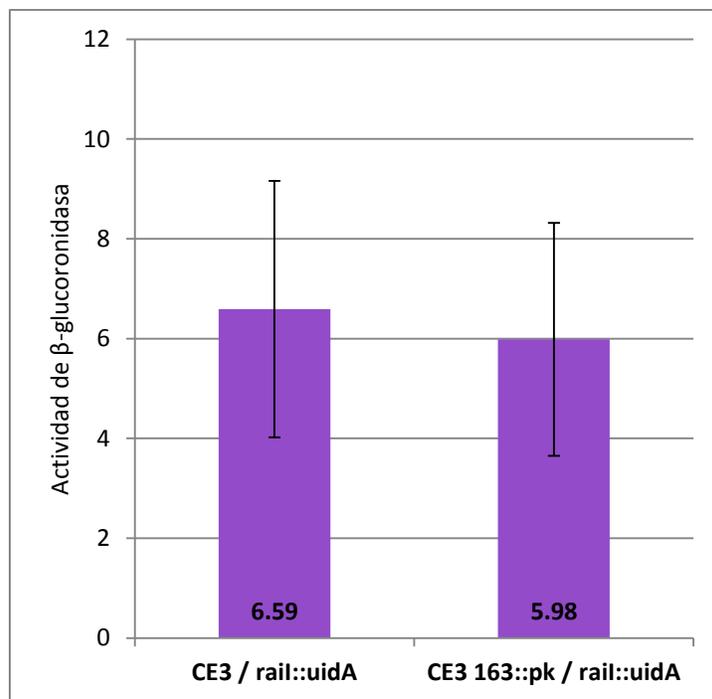
El análisis mostró (Figura 12) que la expresión de *cinI::uidA* en el fondo genómico de la mutante disminuye 1.62 veces en comparación con la silvestre, esto nos permite predecir que la producción de HSL dependiente de *cinI* podría estar afectado en esta mutante, donde el *orf163* podría estar activando la expresión de *cinI*. Referente a *railR::uidA*, observamos que su expresión también se reduce, aunque ligeramente. Y la expresión de *rail::uidA* no se ve afectada (Fig. 13 y 14 respectivamente).



**Figura 12.** Expresión de *cinI* en el fondo genómico de *R. etli* silvestre y CE3/*orf163::pk18mob*.



**Figura 13.** Expresión de *raiR* en el fondo genómico de *R. etli* silvestre y CE3/*orf163::pk18mob*.



**Figura 14.** Expresión de *rail* en el fondo genómico de *R. etli* silvestre y CE3/*orf163::pk18mob*.

Estos resultados nos sugieren que el *orf163* regula positivamente la expresión de *tral* y *cinI*. Esto no provee una explicación clara para los resultados previos donde vemos que la frecuencia de transferencia aumenta cuando este orf está mutado. En el apartado de la Discusión se presenta un modelo con una posible explicación para los resultados.

## 2. Análisis de la participación del *orf164* en la transferencia del p42a.

El *orf164* se encuentra contiguo al *orf163* en la región de transferencia del p42a, de *R. etli* CFN42. Este orf está anotado como una proteína hipotética conservada de 632 pb; tiene un dominio conservado DUF433 de la superfamilia cl01030. Para examinar si el *orf164* tiene un papel en la regulación de la transferencia del p42a, se generó una mutación en este orf y se probó la capacidad conjugativa del plásmido (Tabla 12). En estos resultados observamos que esta mutación no afecta la frecuencia de transferencia del p42a, cuando la donadora es *Rhizobium* con todos sus replicones, bajo las condiciones de los laboratorios utilizadas.

Posteriormente, decidimos analizar la frecuencia de transferencia del p42a con la mutación en el *orf164* desde fondos de *Agrobacterium* (UIA y GMI). Al usar como donadora UIA obtuvimos frecuencias de transferencias bajas ( $10^{-6}$ ) y curiosamente al utilizar como donadora GMI/p42a *orf164::pk* y como receptora CFNX2001, el plásmido con esta mutación no se transfiere; siendo la frecuencia de transferencia del plásmido silvestre en esta cruce de  $10^{-3}$  (Tabla 13).

**Tabla 12.** Transferencia del p42a *orf164::pk18mob*.

Donadora	Receptora	Frecuencia de transferencia
CFNX187	UIA143	1.34 E-01 ± 0.13
CFNX187	GMI	2.80 E-02 ± 0.008
CFNX187	CFN2001	3.40 E-03 ± 0.004
CE3 164::pk	UIA	1.11 E-01 ± 0.015
CE3 164::pk	GMI	4.45 E-02 ± 0.0078
CE3 164::pk	CFN2001	1.66 E-03 ± 0.0012

**Tabla 13.** Transferencia del p42a *orf164::pk18mob* desde *Agrobacterium*.

Donadora	Receptora	Frecuencia de transferencia
GMI/p42a::Tn5	CFN2001	1.34 E-03 ± 0.009
GMI/p42a 164 <sup>-</sup>	CFN2001	ND
UIA/p42a 164 <sup>-</sup>	CFN2001	4.24 E-06

### 3. Análisis de la participación del *orf165* en la transferencia del p42a.

El *orf165* se encuentra en la región de transferencia del p42a entre los genes *orf164* y *traM*, está anotado como una proteína de unión a DNA perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales de respuesta a elementos xenobióticos, y tiene 221 pb. En su secuencia tiene un sitio de unión a DNA no específico y uno específico de secuencia, además de un puente salino y un dominio putativo conservado HTH\_XRE perteneciente a la superfamilia cl17200.

Para analizar el papel del *orf165*, examinamos la habilidad de transferencia del p42a usando como donadora una cepa de *Rhizobium* conteniendo una mutación en este orf. Observamos que la frecuencia de transferencia no tiene variación con respecto al silvestre (Tabla 14) bajo las condiciones probadas en el laboratorio. También se analizó la transferencia del plásmido p42a *orf165::Sp* desde fondos genómicos de *Agrobacterium* hacia *Rhizobium* y nos dimos cuenta que desde UIA hacia *Rhizobium* con todos sus replicones, no hay transferencia, pero si la receptora es *Rhizobium* p42a<sup>-</sup>, p42d<sup>-</sup> (CFN2001), el plásmido con la mutación se transfiere a una frecuencia de 10<sup>-4</sup> (Tabla 15).

**Tabla 14.** Transferencia del p42a *orf165::Sp*

Donadora	Receptora	Frecuencia de transferencia
CFNX187	UIA143	1.34 E-01 ± 0.13
CFNX187	GMI	2.80 E-02 ± 0.008
CFNX187	CFN2001	3.40 E-03 ± 0.004
CE3 165::Sp	UIA143	5.27 E-01 ± 0.74
CE3 165::Sp	GMI	1.23 E-02 ± 0.013
CE3 165::Sp	CFN2001	3.58 E-04 ± 0.0002

**Tabla 15.** Transferencia del p42a *orf165::Sp* desde *Agrobacterium*.

Donadora	Receptora	Frecuencia de transferencia
GMI/p42a::Tn5	CFNX187	1.41 E-04 ± 0.00005
GMI/p42a 165::Sp	CFNX187	2.32 E-05
UIA/p42a 165::Sp	CFNX187	ND
UIA/p42a 165::Sp	CFN2001	3.18 E-04 ± 0.0003

Los resultados anteriores nos sugieren que el *orf164* y *orf165* tiene un papel en la regulación de la transferencia del p42a en ciertas condiciones.

#### 4. Transferencia del p42a: Efecto de la receptora

La regulación de la transferencia del p42a está mediada por reguladores transcripcionales tipo LuxR, tales como *cinR* y *traR*; y un regulador positivo, *traI*, responsable de la síntesis de una HSL, la cual forma un complejo con TraR o CinR, los cuales activan la expresión de los genes de transferencia (Tun-Garrido *et al.*, 2003).

Al estar realizando algunos experimentos de conjugación para elucidar el papel del *orf163*, observamos que la receptora también juega un papel importante en la transferencia del p42a silvestre. La frecuencia de transferencia varía dependiendo de la donadora y la receptora utilizadas (Tabla 13). Otro dato notable es que la frecuencia de transferencia disminuye (100 o 1000 veces) cuando la cepa donadora es *Agrobacterium* y la receptora *Rhizobium* (Tabla 16).

**Tabla 16.** Efecto de la donadora y la receptora en la transferencia del p42a.

DONADORA	RECEPTORA	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA
CFNX187	CFN2001	3.40 E-03 ± 0.004
CFNX187	GMI	2.80 E-02 ± 0.008
2001/p42a::Tn5	GMI	1.68 E-02 ± 0.012
GMI/p42a::Tn5	CE3	1.41 E-04 ± 5.3 E-05
GMI/p42a::Tn5	CFNX186	1.19 E-05 ± 4.12 E-06

Al usar como donadora *Agrobacterium* conteniendo el p42a, se analizó su transferencia hacia distintas receptoras. Observamos que al usar como receptora una cepa carente del plásmido p42f (CFNX186), la frecuencia de transferencia disminuye, al igual que con una cepa con una delección en el plásmido f, la cual cubre los genes 308 al 637, faltándole los genes *rail* (440) y *raiR* (439) (Tabla 17). Para elucidar si este efecto se debía a alguna molécula difusible como una HSL, en este caso inferimos que se trata de la HSL sintasa, *rail*, por lo que colocamos los sobrenadantes tanto de la silvestre como de la cepa carente del pf y observamos que la frecuencia se reestablece al

adicionar el sobrenadante de la silvestre (Tabla 17), lo cual nos confirma que algún gen del plásmido f, probablemente *rail* juega un papel en la regulación de la transferencia del p42a.

**Tabla 17.** Transferencia del p42a desde *Agrobacterium*.

DONADORA	RECEPTORA	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA
GMI/p42a::Tn5	CE3	1.41 E-04 ± 5.3 E-05
GMI/p42a::Tn5	CFNX186 (pf <sup>-</sup> )	1.19 E-05 ± 4.12 E-06
GMI/p42a::Tn5	CE3 pf Δ308-637	5.60 E-05 ± 3.9 E-05
GMI/p42a::Tn5 (+CE3)	CFNX186 (pf <sup>-</sup> )	1.17 E-04
GMI/p42a::Tn5 (+186)	CFNX186 (pf <sup>-</sup> )	5.75 E-05

En Brom *et al.*, 2000, se describió al p42a como autotransferible ya que era capaz de transferirse desde *Agrobacterium* a *Rhizobium* p42a<sup>-</sup>. En experimentos de conjugación analizamos la transferencia del p42a entre cepas de *Agrobacterium* y observamos que no hay transferencia (Tabla 18). Estos resultados claramente indican que hay genes en el fondo genómico de *Rhizobium* que se encuentran en cromosoma y/o plásmidos que también están involucrados en la regulación de la transferencia del p42a.

Por lo anterior decidimos realizar un experimento de conjugación entre cepas de *Agrobacterium*, colocando los sobrenadantes de las cepas CFNX186 y la silvestre. En ambas cruces el plásmido p42a fue transferido, a una frecuencia de E-07 (Tabla 18). No observamos diferencia entre los distintos sobrenadantes, sugiriéndonos que la HSL ubicada en el p42f (*rail*) participa en la regulación de la transferencia pero en otras condiciones. Este experimentos nos sugiere que moléculas difusibles producidas por los distintos replicones de *Rhizobium* (posiblemente HSLs), además de la maquinaria del p42a *per se*, son suficientes para la realizar la transferencia del p42a, aunque a frecuencias muy bajas.

**Tabla 18.** Transferencia del p42a entre cepas de *Agrobacterium*.

DONADORA	RECEPTORA	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA
GMI/p42a::Tn5	UIA	ND
UIA/p42a::Tn5	GMI	ND
UIA/p42a::Tn5 (+CE3)	GMI	4.9 E-07
UIA/p42a::Tn5 (+186)	GMI	5.3 E-07

Para obtener un panorama más amplio de la regulación de la transferencia de este plásmido, se construyeron fusiones transcripcionales de algunas HSL sintasas (*rail* y *cinI*) y de un regulador tipo LuxR (*raiR*) a un gen reportero, éstas fueron introducidas en las derivadas *traM*<sup>-</sup>, *traI*<sup>-</sup>, *traR*<sup>-</sup> y *cinR*<sup>-</sup> y se analizó su expresión.

En general, la expresión basal de *raiR* es más alta que la de las demás fusiones. No observamos diferencia de la expresión de *raiR* en los diferentes fondos genómicos (Figura 15).

En cuanto a la expresión de *rail* (Figura 16), observamos que cuando *traM* está mutado su expresión aumenta, al igual que cuando *cinR* está mutado. Un efecto drástico es observado cuando *traI* no está presente, la expresión de *rail* se reduce más del doble, por lo que inferimos que *traI* con algún otro regulador induce la expresión de *rail*, y que además esta HSL sintasa ubicada en el p42f juega un papel en la regulación del p42a (datos anteriores) formando una red de regulación mucho más compleja de lo que se pensaba.

Por último, al evaluar la expresión de *cinI::uidA* en los diferentes fondos genómicos (Figura 17), vimos que cuando *traM*, *traI* o *cinR* están mutados, la expresión de *cinI* disminuye hasta la mitad, lo que nos permite predecir que estos genes regulatorios podrían estar induciendo la expresión de *cinI*, y nuevamente haciendo más compleja la regulación de la transferencia del p42a. En experimentos posteriores observamos que al mutagenizar el gen *cinI* (ubicado en cromosoma) la conjugación del p42a se anula (Datos no mostrados).

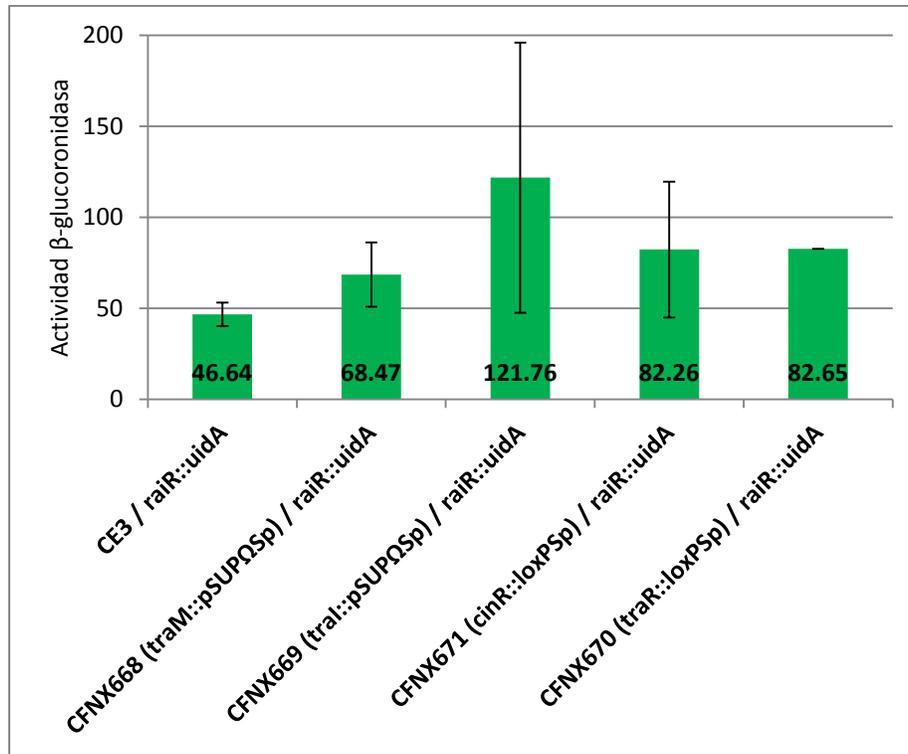


Figura 15. Expresión de *raiR::uidA* en el fondo genómico silvestre, *traM*<sup>-</sup>, *tral*<sup>-</sup>, *cinR*<sup>-</sup> y *traR*<sup>-</sup>

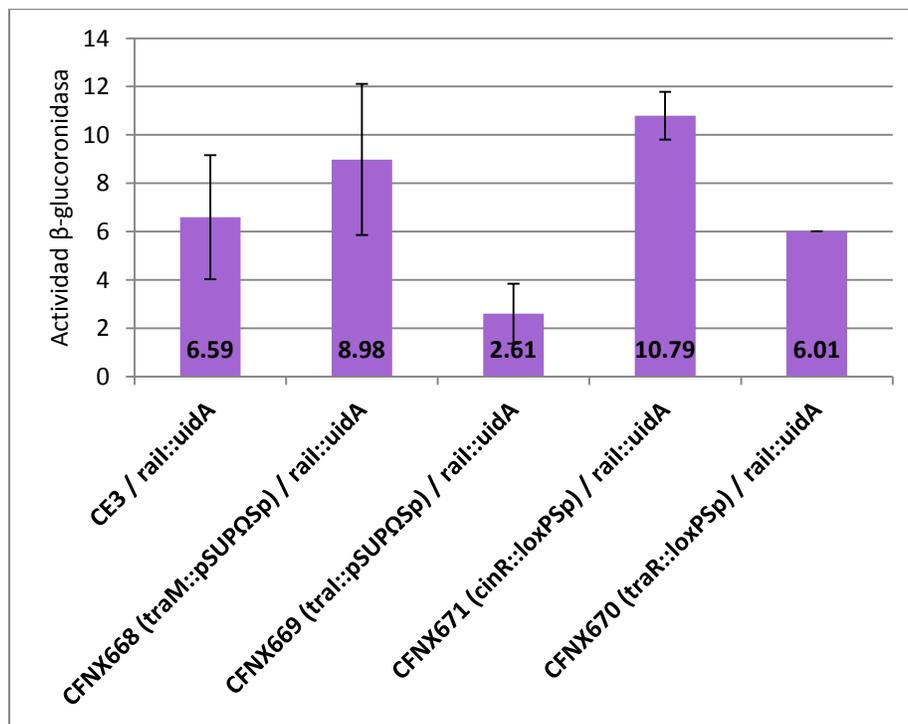
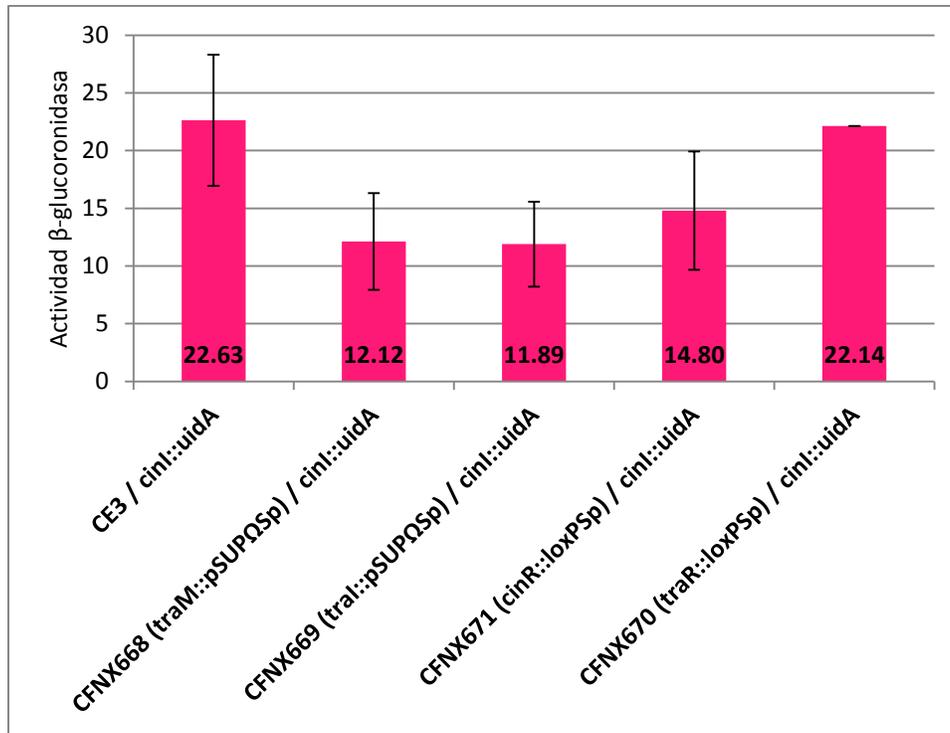


Figura 16. Expresión de *rail::uidA* en el fondo genómico silvestre, *traM*<sup>-</sup>, *tral*<sup>-</sup>, *cinR*<sup>-</sup> y *traR*<sup>-</sup>



**Figura 17.** Expresión de *cinI::uidA* en el fondo genómico silvestre, *traM*<sup>-</sup>, *tral*<sup>-</sup>, *cinR*<sup>-</sup> y *traR*<sup>-</sup>

Los resultados anteriores nos sugieren que el plásmido p42a no es autotransferible, requiere otros genes codificados en otros replicones, como el *railR* (p42f) y *cinIcH* (cromosoma). Existe una red más compleja de la regulación de transferencia, Tral regula positivamente a *rail*, CinR regula negativamente a *rail* y al parecer TraM y Tral regulan positivamente a *cinIcH*.

## 5. Complementación heteróloga

Otro objetivo del proyecto, es complementar la mutante del *orf147* de *Sinorhizobium fredii* con genes heterólogos, ya que al estar interrumpido el *orf147*, el plásmido p64a no se transfiere. En el análisis bioinformático realizado anteriormente (Figura 3), nos dimos cuenta que existen genes en *Escherichia coli* homólogos a genes de *S. fredii*, encontrados en la región de transferencia, por lo que decidimos tratar de complementar la mutante en el *orf147* de *S. fredii*, con los pares de genes homólogos encontrado en *E. coli* (Figura 18 y Tabla 19).



**Figura 18.** Organización de regiones genéticas de cepas de *E. coli* con similitud de secuencias con *S. fredii*.

**Tabla 19.** Porcentaje de identidad de los genes homólogos en *E. coli* a los genes de *S. fredii*

	% Identidad (proteína)		Ubicación
	<i>S. fredii</i> GR64	ORF 147	ORF 148
<i>E. coli</i> Nissle	31 %	41 %	IG II
<i>E. coli</i> KO11	43 %	28 %	Cromosoma
<i>E. coli</i> W	43 %	43 %	Cromosoma
<i>E. coli</i> 83972	41 %	31 %	Contig 00155

Simultáneamente realizamos la complementación heteróloga y homóloga de la mutante de *S. fredii* en el *orf147* del plásmido p64a. Se clonaron los genes respectivos en un vector replicable en *Rhizobium*, incluido el *orf147* completo. Posteriormente se complementó la cepa GR64 *orf147::pk18mob* con las diferentes construcciones (Tabla 20) y fueron analizadas en experimentos de conjugación.

En ninguna de las distintas cruzas realizadas se obtuvieron transconjugantes, el fenotipo de transferencia permanecía igual que el de la mutante, tanto para las cepas complementadas con el *orf147*, como para las complementadas con los genes de *E. coli*. La complementación homóloga se probó con 4 construcciones diferentes. Por lo anterior, inferimos que el *orf147* solo actúa en *cis*, y al clonarlo en un plásmido, su papel en la conjugación queda anulado, por lo que nunca vemos transferencia del plásmido p64a.

Posteriormente transferimos el p64a silvestre a la cepa con la mutación en el *orf147*, para corroborar que el fondo genómico de *S. fredii* no estuviera afectando la transferencia del plásmido. Se probó la cepa complementada con el plásmido silvestre y su frecuencia de transferencia fue normal ( $10^{-3}$ ).

**Tabla 20.** Construcciones analizadas para complementar la cepa de *S. fredii orf147::pk18*.

Construcciones probadas
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pBBR vacío
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pBBR::147
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pTE3 vacío
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pTE3::147
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pBBR::Nissle
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pBBR::W
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pBBR::83972
<i>S. fredii</i> GR64 147::pk / pBBR::KO11

## VII. DISCUSIÓN

Existen diversos mecanismos que regulan los pasos iniciales de la conjugación. Estos mecanismos controlan, ya sea la activación o represión de genes involucrados en la transferencia conjugativa.

Los estudios sobre la regulación de la transferencia conjugativa de plásmidos de *Rhizobium* han puesto de manifiesto dos diferentes mecanismos de regulación: plásmidos regulados por Quorum Sensing (QS) (Wilkinson *et al.*, 2002; Danino *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003; Tun-Garrido *et al.*, 2003), y plásmidos regulados por RctA que solo se transfieren bajo condiciones que interrumpen la actividad del represor transcripcional RctA (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005).

En *Rhizobium etli* CFN42, se identificó y caracterizó la región de transferencia del plásmido conjugativo p42a (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Los genes de transferencia están regulados por QS, a través de TraI-TraR y otro regulador transcripcional llamado CinR.

En este trabajo, determinamos si los *orf163*, *orf164* y *orf165* que codifican para proteínas hipotéticas conservadas (HCP, hypothetical conserved proteins), localizadas en la región de transferencia del plásmido p42a de CFN42 son funcionalmente importantes en el proceso de transferencia, bajo ciertas condiciones.

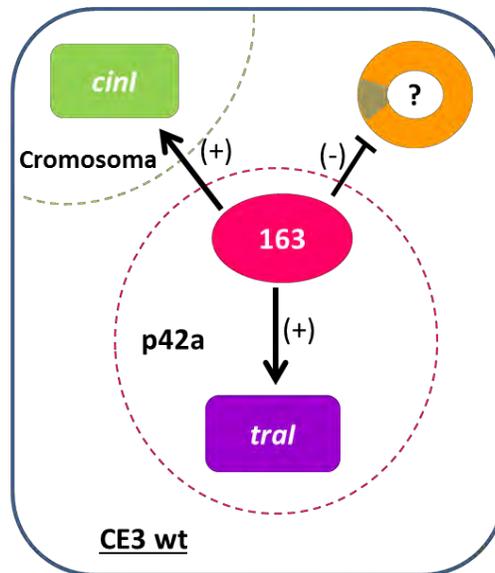
Los resultados mostraron que al mutar uno de estos genes, el *orf163*, la frecuencia de transferencia aumenta (10-100 veces) con respecto a la silvestre. Este efecto lo observamos solo cuando la donadora contiene todos sus replicones y no, cuando utilizamos una cepa carente de p42d o p42f. Inferimos que el *orf163* podría estar involucrado en la regulación de genes ubicados en estos plásmidos, que participan en el mecanismo de transferencia. En el p42d no tenemos ningún gen identificado como candidato, pero en el p42f se encuentran los genes *rail* y *railR*, que corresponden a una acil-homoserina lactona sintasa y su regulador transcripcional correspondiente. Además, en el cromosoma también se localiza un gene (*cinI*) que codifica para una homoserina-lactona sintasa. Pensando que estos genes pudieran ser candidatos a ser regulados por el *orf163*, y de esta manera afectar la transferencia conjugativa, se construyeron fusiones transcripcionales con sus regiones reguladoras y se realizaron ensayos de expresión, tanto en fondo genómico silvestre, como en el mutante del *orf163*. El análisis de la actividad de  $\beta$ -glucoronidasa mostró que en el fondo genómico con el *orf163* mutado, disminuye la expresión de *tral::uidA*, al igual que de *cinI::uidA*. Estos datos sugieren que el *orf163* actúa como un activador,

aunque no muy fuerte, para *tral* y *cinI*, ya sea de manera directa o indirecta. Para explicar que la frecuencia de transferencia aumente cuando esta mutado, sugerimos que el *orf163* regula negativamente un gen X, no identificado, el cual suponemos que puede inducir la expresión de los genes de transferencia. Así, en la mutante del *orf163*, X se estaría expresando, permitiendo el incremento en la transferencia conjugativa. También es posible que el *orf163* actúe a un nivel distinto del transcripcional. Este modelo se esquematiza en la Figura 19.

Posteriormente al sobreexpresar el *orf163* en el fondo genómico CE3/*orf163*::pk18mob, observamos que el efecto de sobreexpresarlo varía dependiendo de la receptora y donadora utilizada. Cuando utilizamos como receptora, una cepa de *Agrobacterium* sin plásmidos, la frecuencia de transferencia aumenta aún más comparada con la de la mutante, por lo que proponemos que al estarse sobreexpresando, la inducción de la expresión de *tral*, *cinI* y *raiR* se intensifique y por ello la frecuencia de transferencia sea aún más alta, viendo solo un panorama parcial de lo que pudiera estar regulando el *orf163*.

El *orf163* parece actuar como un regulador dual, participando de una manera muy fina en la regulación de la transferencia de este plásmido. *In vivo*, nosotros inferimos que este orf es regulado por alguna señal externa, como sucede en *Agrobacterium* con las opinas (Piper *et al.*, 1993) y así en determinadas condiciones favorece ciertas vías para realizar lo que más le convenga a la célula en ese momento, ya que altas tasas de conjugación representan altos costos para la célula (Harrison & Brockhurst. 2012; Rankin *et al.*, 2011).

Referente a las otras 2 proteínas hipotéticas conservadas, los *orf164* y *orf165*, no parecen jugar un papel en la transferencia del p42a cuando la donadora es *Rhizobium* con todos sus replicones y bajo las condiciones utilizadas en el laboratorio. Sin embargo, cuando examinamos la capacidad de transferencia de mutantes de estos orfs, usando como donadoras dos derivadas de *Agrobacterium* C-58, que son la UIA143, que carece del pTi, pero conserva el pAT, y la GMI9023 que carece de los dos plásmidos endógenos, encontramos que la transferencia se anula en la mutante del *orf164*, cuando la donadora es la GMI9023, y en la mutante del *orf165* la transferencia se anula cuando la donadora utilizada es la UIA143. Lo anterior nos sugiere que definitivamente estos orfs tienen un papel en la transferencia del p42a, aunque solamente se evidencia en determinadas circunstancias.



**Figura 19.** Modelo propuesto para la participación del *orf163* en la regulación de la transferencia del p42a.

Al estar realizando algunos experimentos de conjugación para elucidar el papel del *orf163*, observamos que la receptora también juega un papel importante en la transferencia del p42a silvestre. Encontramos que cuando la donadora es una cepa de *Agrobacterium*, *rail*, localizada en el p42f regula finamente la transferencia del p42a, ya que al estar ausente (en la receptora) la frecuencia de transferencia disminuye 10 veces (Tabla 17) y al colocar el sobrenadante de la silvestre, ésta se recupera.

Originalmente el p42a se definió como autotransferible porque se pudo movilizar desde *Agrobacterium* a *Rhizobium* carente de p42a (Brom *et al.*, 2000), pero no se habían realizado cruza donde ambas cepas, tanto la donadora como la receptora fueran *Agrobacterium*. En este trabajo encontramos que entre estas cepas, el p42a no se transfiere. Estos resultados nos sugieren que el p42a necesita algo de los demás replicones de CFN42 para poder transferirse, ya que al usar ya sea como donadora o receptora a alguna cepa de *Rhizobium*, la frecuencia se recupera. Sin embargo cuando colocamos en esta misma cruza, sobrenadante de *Rhizobium*, el plásmido puede transferirse, aunque a frecuencias muy bajas, lo cual nos dice que moléculas difusibles (probablemente HSLs) tienen papeles claves en la regulación de la transferencia y que están codificadas en los distintos replicones, ya que sin ellas la transferencia de este plásmido no ocurre.

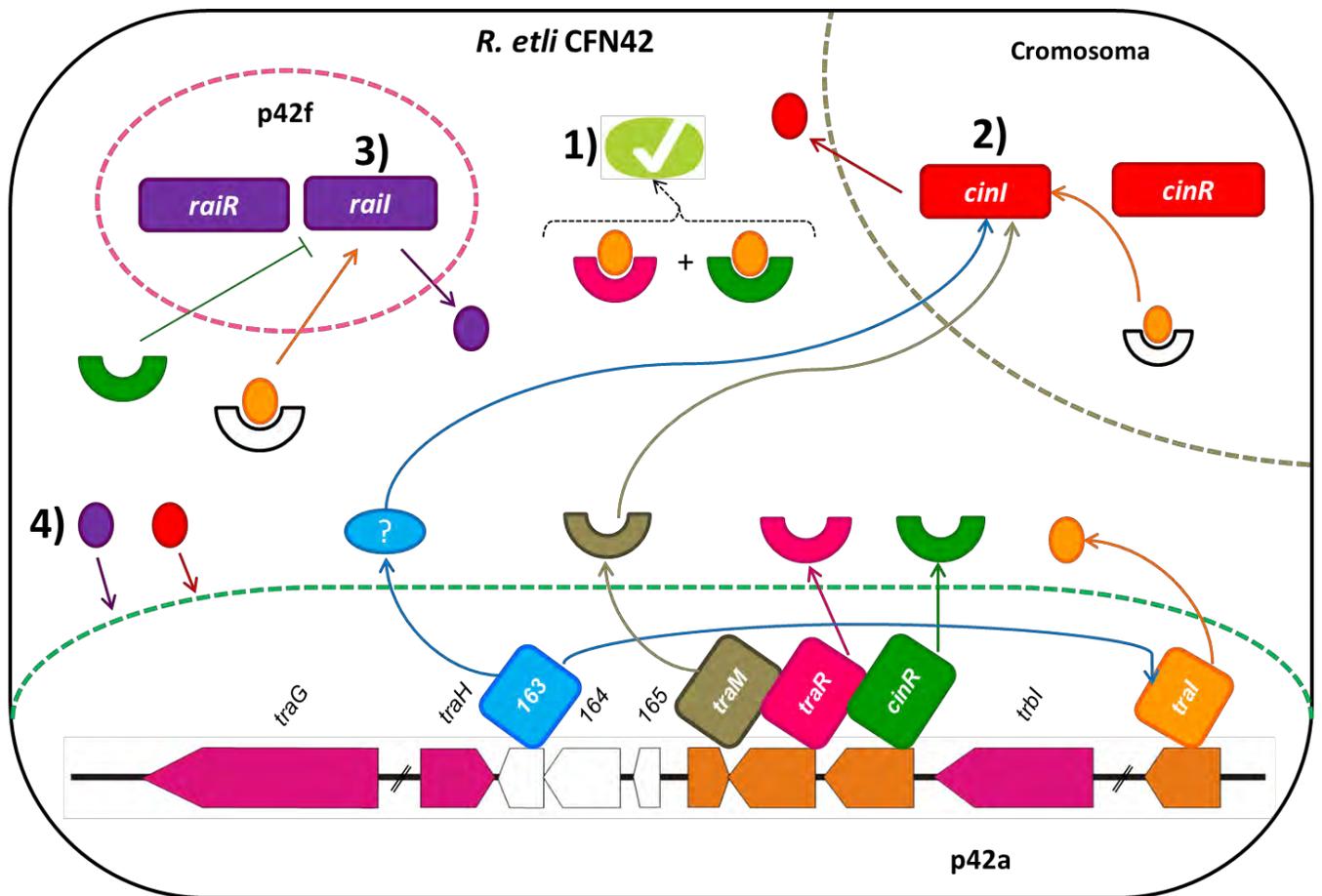
Al realizar análisis de la actividad de  $\beta$ -glucoronidasa observamos que los niveles de expresión de *raiR::uidA* (regulador tipo *luxR*) son más altos comparados con las otras fusiones transcripcionales, incluso en la silvestre, pero la expresión de *raiR::uidA* no es significativamente diferente en los distintos fondos genómicos.

Cuando analizamos la expresión de *rail::uidA*, vemos que en el fondo de *cinR<sup>-</sup>*, la expresión aumenta 1.6 veces, sugiriendo que esta HSL sintasa es regulada negativamente por *cinR*. Sin embargo, en la mutante de *tral* la expresión se ve reducida más del doble (2.5 veces) por lo que inferimos que *tral* regula a *rail* de manera positiva, posiblemente a través de algún otro regulador. Se ha reportado que algunas HSL sintasas, como *cinI* de *R. leguminosarum* influye positivamente en el nivel de expresión de otras HSL sintasas y estimula la formación de varias HSL diferentes a través de un locus *rail*-like; y este locus (*cinI*) está involucrado en la regulación de la transferencia del plásmido pRL1JI (Lithgow *et al.*, 2000).

Es importante mencionar que los genes *rail* y *raiR* se encuentran contiguos pero cada uno tiene su propio promotor. Se ha reportado que en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, los genes *railR* son requeridos para la producción de HSLs, la expresión de *rail* es dependiente de *raiR* y que puede ser inducida por otras HSLs, siendo parte del sistema de QS (Wisniewski-Dyé *et al.* 2002; Rosemeyer *et al.*, 1998). Por lo que parece probable que estos genes (*railR*) pudieran estar jugando un papel similar en *R. etli* CFN42.

Referente a la expresión de *cinI::uidA*, observamos que en las mutantes *traM<sup>-</sup>* y *traI<sup>-</sup>* se ve reducida, por lo que proponemos que estos genes podrían inducir el locus *cinI*. En experimentos posteriores se mutagenizó el gen *cinI* y se analizó en experimentos de conjugación, y no se obtienen transconjugantes (Datos no mostrados). Lo anterior nos dice que este gen está involucrado en la red de regulación de transferencia del p42a, jugando un papel muy importante.

Basados en experimentos anteriores y en los ensayos de las fusiones, proponemos un modelo regulatorio para la transferencia del p42a (Figura 20), incluyendo nuevos elementos de p42a, como también de otros replicones, mostrando un esquema más complejo que el que se había propuesto.



**Figura 20.** Modelo propuesto para la transferencia del p42a. 1) La HSL lactona (naranja) se une a TraR (rosa) y a CinR (verde), las proteínas con las moléculas inductoras unidas activan la expresión de genes de transferencia. 2) La HSL sintasa, *cinI* (roja) es regulada positivamente por *tral* (naranja), posiblemente a través de un regulador (blanco), por TraM (gris) y el *orf163* (azul). 3) La HSL sintasa, *rail*, ubicada en el p42f está regulada positivamente por *tral* y negativamente por CinR (verde). 4) Las moléculas difusibles, HSL, producidas por *cinI* y *rail* también participan en la regulación de transferencia del p42a.

## VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Los tres genes que codifican para proteínas hipotéticas conservadas, localizadas en la región de transferencia del p42a juegan algún papel en la transferencia del plásmido:
- ✓ El *orf163* parece asegurar que en diversas condiciones el p42a tenga la posibilidad de transferirse, ya que al estar inactivado por mutación o sobreexpresado se incrementa un poco la frecuencia de transferencia.
- ✓ El *orf163* juega finamente un papel en la regulación de la transferencia del p42a. Regula de manera positiva algunas HSLs sintetasas, como *tral* y *cinI*; y un regulador tipo *luxR*, *raiR*.
- ✓ El *orf164* es requerido para que el p42a pueda transferirse desde una donadora que lleva el cromosoma de *Agrobacterium* carente de plásmidos endógenos.
- ✓ El *orf165* es requerido para que el p42a pueda transferirse desde una donadora que lleva el cromosoma de *Agrobacterium* y el plásmido pAT.
- ✓ En donadoras de *Agrobacterium*, la capacidad conjugativa del p42a depende del fondo genómico de la receptora.
- ✓ La presencia de los genes *rail* y *raiR*, codificados en el p42f, permiten incrementar 10 veces la frecuencia de transferencia del p42a desde donadoras de *Agrobacterium*.
- ✓ El p42a no es un plásmido autotransferible, requiere otros genes codificados en otros replicones de *Rhizobium*, como *cinI*ch o *railf*.
- ✓ El plásmido p42a no puede conjugarse cuando tanto la donadora como la receptora son cepas de *Agrobacterium*, a menos que se adicione el sobrenadante que lleva las HSL difusibles, de una cepa de *Rhizobium*.

## IX. PERSPECTIVAS

1. Continuar con la elucidación de la interacción entre los distintos genes propuestos en el modelo de regulación para la transferencia del p42a.
  - 1.1. Introducir las distintas fusiones transcripcionales construidas (*tral*, *traM*, *raiR*, *rail* y *cinI*) a la mutante en *cinI*.
  - 1.2. Realizar cruces con el sobrenadante de la mutante en *cinI*.
2. Determinar cómo actúa el orf 163.
3. Utilizar otras estrategias para tratar de complementar funcionalmente la mutante del orf 147 de *S. fredii* GR64, tanto por el gene silvestre, como por los homólogos de *E. coli*.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Martinez, C. E., & Christie, P. J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 73(4), 775-808. doi:10.1128/MMBR.00023-09
2. Bravo A, Mora J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol.* Feb;170(2):980-4.
3. 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.
4. Brom, S., A. García de los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, G. Dávila, D. Romero, and R. Palacios. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174:5183–5189.
5. Brom, S., L. Girard, A. García-de los Santos, J. M. Sanjuán-Pinilla, J. Olivares and J. Sanjuán. (2002). Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2555–2561.
6. Brown, J. R. (2003). Ancient horizontal gene transfer. *Nature reviews. Genetics*, 4(2), 121-32. doi:10.1038/nrg1000
7. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guédon, G. (2002). The ICSt1 element of *Streptococcus thermophiles* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* 48: 77–97.
8. Cervantes L. (2011). Identificación y caracterización de la región de transferencia de plásmido pGR64a de *Sinorhizobium fredii* GR64. (Maestría en ciencias, Universidad del Estado de Morelos).
9. Cervantes L., P. Bustos, L. Girard, R. I. Santamaría, G. Dávila, P. Vinuesa, D. Romero and S. Brom. (2011). The conjugative plasmid of a bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain is assembled from sequences of two *Rhizobium* plasmids and the chromosome of a *Sinorhizobium* strain. *BMC Microbiology* 11:149.
10. Clewell, D. B., S. E. Flanagan, and D. D. Jaworski. (1995). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* 3:229–236.
11. Danino, V. E., Wilkinson, A., Edwards, A., & Downie, J. A. (2003). Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is regulated by a quorum-sensing relay. *Molecular Microbiology*, 50(2), 511-525. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03699.x
12. Danino, V.E., Wilkinson, A., Edwards, A., and Downie, J.A. (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* 50: 511–525.
13. Ding, H., & Hynes, M. F. (2009). MINIREVIEW / MINISYNTHESIS Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Genome*, 927, 917-927. doi:10.1139/W09-056

14. Ding, H., Yip, C. B., & Hynes, M. F. (2013). Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM. *Journal of bacteriology*, 195(2), 328-39. doi:10.1128/JB.01234-12.
15. Hynes, M. F., R. Simon, and A. Pühler. (1985). The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAEC58. *Plasmid* 13:99–105.
16. Dobrindt, U., & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4(5), 550-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587932>
17. Dobrindt, U., Chowdary, M. G., Krumbholz, G., & Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical microbiology and immunology*, 199(3), 145-54. doi:10.1007/s00430-010-0161-2
18. Eckhardt T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1 :584-588.
19. Ellis, J. G., A. Kerr, A. Petit, and J. Tempe. (1982). Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids the role of agrocinosines. *Mol. Gen. Genet.* 186:269-273.
20. Farrand SK, O ' Morchoe SP, McCutchan JJ. (1989) Construction of an *Agrobacterium tumefaciens* C58 *recA* mutant. *J Bacteriol*, 171:5314-5321.
21. Egelhoff, T. T., & Long, S. R. (1985). *Rhizobium meliloti* nodulation genes: identification of *nodDABC* gene products, purification of NodA protein, and expression of NodA in *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 164(2), 591-9.
22. Farrand, S.K. (1998). Conjugal plasmids and their transfer. In *The Rhizobiaceae: molecular biology of plant-associated bacteria*. Edited by H. Spaink, A. Kondorosi, and P.J.J. Hooykaas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 199–233.
23. Flores, M., González, V., Pardo, M. a, Leija, a, Martínez, E., Romero, D., Piñero, D., et al. (1988). Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *Journal of bacteriology*, 170(3), 1191-6.
24. Frost, L. S., & Koraimann, G. (2010). Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future microbiology*, 5(7), 1057-71. doi:10.2217/fmb.10.70.
25. Girard, L., S. Brom, A. Dávalos, O. López, M. Soberón, and D. Romero. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1283-1292.
26. Gogarten, J. P., & Townsend, J. P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), 679-87. doi:10.1038/nrmicro1204
27. González, J. E. & Marketon, M. M. (2003). Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Society*, 67(4). doi:10.1128/MMBR.67.4.574
28. González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., et al. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3834-9. doi:10.1073/pnas.0508502103
29. Grohmann, E., & Espinosa, M. (2003). Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Society*, 67(2), 277-301. doi:10.1128/MMBR.67.2.277

30. Grohmann, E., & Espinosa, M. (2003). Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Society*, 67(2), 277-301. doi:10.1128/MMBR.67.2.277
31. He, X., Chang, W., Pierce, D. L., Seib, L. O., Wagner, J., & Fuqua, C. (2003). Quorum Sensing in *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Regulates Conjugal Transfer (*tra*) Gene Expression and Influences Growth Rate. *Society*, 185(3), 809-822. doi:10.1128/JB.185.3.809
32. Johnston, A.W.B., Beynon, J.L., Buchanan-Wollanston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R., and Beringer, J.E. (1978). High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, 276: 634–636. doi:10.1038/276634a0.
33. Koonin, E.V., Makarova, A.S. y Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in Prokaryotes. Quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 709-742.
34. Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
35. Kurland, C. G., Canback, B., & Berg, O. G. (2003). Horizontal gene transfer: A critical view. *PNAS*, 100(17), 9658-9662.
36. Landeta C, Dávalos A, Cevallos MA, Geiger O, Brom SS, Romero D. (2011) Plasmids with a chromosome-like role in Rhizobia. *J Bacteriol*, 193:1317-1326.
37. Lawrence, J. G., & Ochman, H. (1998). Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9413-7.
38. Lederberg J. (1952). «Cell genetics and hereditary symbiosis». *Physiol. Rev.* 32 (4):pp. 403-30.
39. Lederberg, J. & Tatum, E.L (1946). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158: 558.
40. Leemans J, Soberón G, Cevallos MA, Fernandez L, Pardo MA, de la Vega H, Flores M, Quinto C, Palacios R. (1984). General organization of *R. phaseoli* plasmids. In *Advances in nitrogen fixation research*. Edited by: Veeger C, Newton VE. The Hague, Nijhoff, Junk and Pudoc; 1984:710.
41. Lloret, L. & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47 (1-2):43.
42. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology*, 17(10), 458-66. doi:10.1016/j.tim.2009.07.004
43. Mercado-Blanco, J., and N. Toro. (1996). Plasmids in rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:535–545.
44. Merrick, M. J., & Edwards, R. A. (1995). Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiology*, 59(4), 604-622.
45. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(June), 948-950.
46. Noel KD, Sánchez A, Fernández L, Leemans J, Cevallos MA. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol.* 158:148-155.

47. Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. (2000). Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *Nature* 405, 299–304.
48. Pérez-Mendoza D, Sepúlveda E, Pando V, Muñoz S, Nogales J, Olivares J, Soto MJ, Herrera-Cervera JA, Romero D, Brom SS, Sanjuán J. (2005). Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J. Bacteriol*, 187:7341-7350.
49. Perez-Mendoza, D. et al. (2005). Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J. Bacteriol*. 187, 7341–7350. (doi:10.1128/JB.187.21.7341-7350.2005).
50. Piper, K. R., Beck von Bodman, S. & Farrand, S. K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* 362 , 448–450.
51. Pueppke, S. G., and W. J. Broughton. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 12:293–318.
52. Quinto C, de la Vega, Flores HM, Fernández L, Ballado T, Soberón GG, Palacios R. (1982). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli* . *Nature*, 299:724-728.
53. Raz, Y., & Tannenbaum, E. (2010). The influence of horizontal gene transfer on the mean fitness of unicellular populations in static environments. *Genetics*, 185(1), 327-37. doi:10.1534/genetics.109.113613
54. Romero, D., and S. Brom. (2004). Chapter 12. The Symbiotic Plasmids of the Rhizobiaceae. In: *Biology of Plasmids*. G. Phillips and B. Funell (eds.) pag. 271- 290. ASM Press, Washington, D.C.,USA.
55. Romero, D., J Martínez-Salazar, L Girard, S Brom, G Dávilla, R Palacios, M Flores, C Rodríguez. (1995). Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J Bacteriol*. February; 177(4): 973–980.
56. Rosenberg, C., and T. Huguet. (1984). The pTiC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol. Gen. Genet*. 196:533-536.
57. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
58. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 145(1):69-73.
59. Schneider, G., Dobrindt, U., Middendorf, B., Hochhut, B., Szijártó, V., Emody, L., & Hacker, J. (2011). Mobilisation and remobilisation of a large archetypal pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* in vitro support the role of conjugation for horizontal transfer of genomic islands. *BMC microbiology*, 11(1), 210. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1471-2180-11-210.

60. Schröder, G., & Lanka, E. (2005). The mating pair formation system of conjugative plasmids. A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*, 54(1), 1-25. doi:10.1016/j.plasmid.2005.02.001
61. Sepúlveda, E., D. Pérez-Mendoza, M. A. Ramírez-Romero, M. J. Soto, I. M. López-Lara, O. Geiger, J. Sanjuán, S. Brom, and D. Romero. (2008). Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 190:4189-4197.
62. Simon R. (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol Gen Genet.* 196 :413-420.
63. Spaink H. P., A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (ed.). (1998). *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria.* Kluwer Academic Publ.
64. Szpirer, C. Y., M. Faelen, and M. Couturier. (2001). Mobilization functions of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J. Bacteriol.* 183:2101–2110.
65. Thomas, C.M. (2004). Evolution and population genetics of bacterial plasmids. *Plasmid Biology.* Chapter 25:509-528.
66. Tun-Garrido, C., P. Bustos, V. Gonzalez, and S. Brom. (2003). Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 185:1681-1692.
67. Villaseñor Tomás; Brom Susana; Dávalos Araceli; Lozano Luis; Romero David and De los Santos Alejandro. (2011). Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiology.* 11:66.
68. Wai-Leung, Ng. & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43, 197-222. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134304
69. Walsh, Christopher. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* Vol. 416.
70. Wilkinson, A., Danino, V.E., and Downie, J.A. (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.
71. Zechner, E. L., F, de la Cruz, R. Eisenbrandt, A. M. Grahn, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, B. M. Wilkins, and M. Zatyka. (2000). Conjugative-DNA transfer processes, p. 87–174. In C. M. Thomas (ed.), *The horizontal gene pool. Bacterial plasmids and gene spread.* Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.