

IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA A LA ACIDEZ DE *RHIZOBIUM FAVELUKESII* LPU83

Trabajo de tesis doctoral 2018
Lic. Juliet Fernanda Nilsson

Dirección: Prof. Dr. Mariano Pistorio
Co dirección: Dr. Gonzalo A. Torres Tejerizo

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias biológicas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***“Identificación de determinantes involucrados en la tolerancia
a la acidez de *Rhizobium favelukesii* LPU83”.***

Tesista: Juliet Fernanda Nilsson

Director: Prof. Dr. Mariano Pistorio

Codirector: Dr. Gonzalo Torres Tejerizo

Año: 2018

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Mariano Pistorio y la codirección del Dr. Gonzalo A. Torres Tejerizo.

A mis sobrinas

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata, por ser la institución que me dio el lugar de alumna, de graduada y de docente. Por el cariño que le tengo como Institución y cómo lugar de trabajo.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y al conjunto de gente que lo forma, por brindarme el espacio físico y personal propicio para la realización de este Trabajo de Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET) por haberme otorgado las Becas que significaron el apoyo económico gracias a las cuales pude dedicarme estos años a la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento,

A Mariano, por haberme dado la oportunidad y la confianza de pertenecer a este grupo de trabajo. Sin esa posibilidad nada de esto hubiese sido posible y por lo que siempre te voy a estar agradecida. Gracias por guiarme en esta etapa y formarme como profesional. Gracias por ser paciente, por tratar de corregirme sin quitarme mi impronta. Gracias por intentar siempre que confíe más en mí y, por sobre todo, no limitar el vínculo exclusivamente a lo laboral, lo que fortaleció después nuestros debates científicos. Por todo esto, y por muchas más, te debo tantas gracias como cervezas me he tomado.

A Gonzalo. Nada de lo que diga es suficiente para demostrar mi inmensa gratitud. Gracias por ese “seguime”, por querer siempre que sea mi mejor versión como profesional y hacerme crecer. Gracias por enseñarme incansablemente, por bancar mis millones de dudas y tener siempre una respuesta, por aguantar mis terquedades. Gracias por salvarme en cada momento que estaba al borde del colapso, bancándome siempre hasta el último minuto. Después de cinco años de intensa convivencia, con distancias incluidas, me atrevo a decir que lo mejor con lo me quedo es con tu amistad.

A La Piru, todo en el laboratorio eras vos, tu presencia nos hizo un grupo mejor. Gracias por enseñarme cómo ser mejor persona y ser mi referente en todos los aspectos de la vida. Por tu solidaridad, tu paciencia y apoyo incondicional. Por acompañarme y enseñarme en la docencia. Por incentivar mi conciencia social. Gracias por ser la mejor persona que conozco. Tu compañerismo es de lo más lindo que me llevo de éste tiempo. Toda mi gratitud y un inmenso cariño para vos.

A Ile, gracias por ser incondicional. Pensar que cuando llegué al laboratorio te tenía miedo, hoy sé que tenés un corazón de oro, capaz de conseguir cualquier cosa por alguien que lo necesita. Gracias por tus consejos, por tus retos, por tu paciencia, por entenderme aún cuando no quisieras entenderme. Sobre todo por tu amistad.

A Lucas, por ser una grata sorpresa y romper todos los prejuicios. Gracias por ser tan buen compañero. Por las horas de flujo compartidas, por ceder tu tiempo de trabajo para ayudar a otro sin pensarlo. Por tantas risas y momentos compartidos. Por hacer más ameno el tiempo en el laboratorio y por ser un gran GRAN amigo.

A Charly, por enseñarme muchas cosas en el laboratorio. Por tantos momentos divertidos y por tantos bailes. Por demostrar que se puede ser una becaria ideal sin dejar de lado el resto de la vida.

A Jose, por tantos momentos volados, por las canciones juntos y por las críticas hacia mi tonalidad. Por taaantos mates y tantas gastadas.

A la nueva generación RPS, Mailén, Nico y Eze por aguantar mis locuras. Especialmente, a Ezequiel por ser un salvavidas informático en momentos cruciales. A Fran, a Mauri y a todos los que pasaron por este laboratorio durante estos años.

A Tony, por hacernos ver más allá de los resultados. Gracias por hacerme formar parte de este grupo de trabajo.

A Floppy, por su predisposición inquebrantable y por sus consejos. Por tener siempre lo que uno necesita al alcance de su mano.

A WALLTEER, por su incansable ayuda, por adoptarme, por siempre brindarme una sonrisa pese a TODO. Por ser mi investigador favorito.

A Florcita, por tu inmensa amistad. Por ser una compañera en todos los aspectos de la vida. Por bancarme siempre y cuidarme tanto. Y obviamente por lo mejores tiempos compartidos, sobre todo bailando. Gracias por bancarme tanto y a tantos jajaja!!!

A JPG, por su ayuda constante cuando la proteómica me abrumaba. Por sus consejos de laburo pero sobre todo por sus consejos en las relaciones humanas.

A los R3 chiquitos (aunque ya no tanto), Gabi, Vale, Flor, Caro, Mengü, Esteban y Caro Cogo. Gracias por hacerme sentir una más del *team* de Rtrecitos y disfrutar de tantos momentos juntos. A Julia por las incontables danzas coreográficas y a Nacho y a Elias por aportar su tono humorístico al sector del fondo del IBBM.

A los otros laboratorios del IBBM por siempre cederme sin dudar las cosas que necesité.

A todos mis compañeros becarios, por amenizar y compartir los momentos difíciles así como también de extrema diversión y felicidad

A todo el personal profesional, administrativo y personal de apoyo del Instituto. Gracias por formar parte de este trabajo y su buena predisposición para ayudar.

A la cátedra, por brindarme el espacio de iniciarme como docente. Por enseñarme siempre.

A Flavia y Galle, por ayudarme y guiarme en las obtención de las curvas del bioreactor.

A Laura y Silvana por sembrar en mí, la semilla que culminó en este Título. Por dejarme ser parte del hermoso proyecto de extensión, que estimula la niñez dentro de mí.

Al CEQUIBIEM, y muy especialmente a Pía y Germán, por contribuir de manera significativa en el análisis proteómico de este Trabajo.

Finalmente,

A mi hermana Caro, por ser mi otra mitad y mi sostén. Por ser incondicional y siempre saber qué decir, este logro también es tuyo. A Moni y Tiago por ser mi cable a tierra una vez al año. Por mostrarme que existe otra vida. A mis sobrinas por ser mi alegría y transformar mi mundo.

A mi mamá, por su inagotable esfuerzo para que logremos lo que queremos. Por estar tan presente a pesar de estar tan lejos. A mi papi por su inagotable fuente de energía positiva.

Al Lechu, por su amistad única y por formar parte de este Trabajo aportando el diseño de tapa. A Paula, por su amistad sencilla y contenedora. Por estar siempre presente y acompañarme hasta en los momentos de escritura silenciosa.

A las guachis, por las innumerables salidas, risas y llantos que hemos compartido, que me han fortalecido. Por ser personas admirables. A Vir, además, por los incontables debates sobre nuestro lugar en la ciencia. Por ayudarme siempre.

A las muchas personas a mi alrededor que me ayudaron y apoyaron durante esta etapa. Muchas de las cuales, a pesar de no ser de este ámbito, pasaron horas a la espera de los resultados. Por sentir mis logros como suyos.

A mis amigos del sur, que me apoyan desde lejos, pero se siente su calor.

Índice General

Capítulo I. Introducción	1
<i>I.1. La vida bacteriana. Los microorganismos en el ambiente.</i>	3
<i>I.2. Estrés bacteriano.</i>	3
<i>I.2.a. Aproximación al concepto de estrés.</i>	4
<i>I.2.b. Respuesta al estrés.</i>	5
<i>I.2.b.1. Factores sigma.</i>	6
<i>I.2.b.2. Factores de transcripción.</i>	6
<i>I.2.b.3. La fase estacionaria y el estrés.</i>	7
<i>I.2.b.4. Sensores extracelulares.</i>	7
<i>I.3. Resistencia al estrés ácido.</i>	8
<i>I.3.a. Mecanismos de tolerancia a la acidez.</i>	9
<i>I.3.a.1. Protección y reparación del periplasma bajo estrés ácido.</i>	9
<i>I.3.a.2. La membrana citoplasmática y la membrana externa como barreras para la acidez.</i>	10
<i>I.3.a.3. Alcalinización del periplasma y/o del citoplasma.</i>	10
<i>I.3.a.4. Protección del citoplasma a pH ácido.</i>	14
<i>I.3.a.5. Respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez.</i>	14
<i>I.4. Simbiosis rizobio-leguminosa y la relevancia del estrés ácido.</i>	16
<i>I.4.a. La fijación biológica de nitrógeno.</i>	16
<i>I.4.b. Las leguminosas.</i>	17
<i>I.4.c. Los rizobios.</i>	17
<i>I.4.d. Etapas de la Simbiosis Rizobio-leguminosa.</i>	18
<i>I.4.e. Efectos de la acidez en la simbiosis rizobio-leguminosa.</i>	19
<i>I.4.f. Suelos ácidos.</i>	19
<i>I.4.g. Estudio de la tolerancia a la acidez en los rizobios.</i>	20
<i>I.5. Rhizobium favelukesii.</i>	23
<i>I.6. Técnicas ómicas.</i>	25
<i>I.6.a. Transcriptómica.</i>	25
<i>I.6.b. Proteómica.</i>	27
<i>I.7. Objetivos</i>	31
<i>I.7.a. Consideraciones generales.</i>	31
<i>I.7.b. Objetivo general.</i>	31
<i>i.7.c. Objetivos específicos.</i>	31
Capítulo II. Materiales y métodos.	33
<i>II.1. Técnicas microbiológicas.</i>	35
<i>II.1.a. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.</i>	35
<i>II.1.b. Plásmidos utilizados en este trabajo</i>	35
<i>II.1.c. Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.</i>	35
<i>II.1.c.1. Medios de cultivo.</i>	36
<i>II.1.c.2. Medios de conservación.</i>	38
<i>II.1.c.3. Antibióticos.</i>	38
<i>II.2 Procedimientos microbiológicos.</i>	38
<i>II.2.a. Curvas de crecimiento.</i>	38
<i>II.2.b. Recuento de bacterias en medios líquidos.</i>	38
<i>II.2.c. Curvas de muerte.</i>	38
<i>II.2.d. Conjugaciones biparentales.</i>	39
<i>II.2.e. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de E.coli.</i>	39

II.2.g. Determinación de actividad β -Galactosidasa.	40
II.3. Técnicas de biología molecular.	40
II.3.a. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreps").	40
II.3.b. Extracción de ADN total.	40
II.3.c. Electroforesis de ADN.	41
II.3.c.1. Geles de lisis in situ.	41
II.3.c.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.	41
II.3.c.3. Revelado de geles y fotografía.	41
II.3.c.4. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.	42
II.3.c.5. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	42
II.3.c.6. Precipitación del ADN con etanol.	42
II.3.d. Tratamientos enzimáticos del ADN.	42
II.3.e. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).	42
II.3.f. Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple.	44
II.3.g. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	44
II.3.h. Secuenciación de ADN.	45
II.3.i. Obtención de la cepa R. favelukesii LPU83-pSym-.	45
II.4. Análisis transcriptómico, RNA-Seq.	47
II.5. Técnicas utilizadas para los análisis proteómicos.	48
II.5.a. Extracción de proteínas totales.	48
II.5.b. Fraccionamiento subcelular para separar proteínas citosólicas y de membrana.	48
II.5.c. Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	49
II.5.d. Cuantificación, reducción, alquilación y precipitación de las proteínas.	49
II.5.e. Identificación de proteínas por LC/MS-MS.	49
II.5.f. Análisis de los datos.	50
II.6. Ensayos con plantas.	51
II.6.a. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.	51
II.6.b. Condiciones de cultivo.	51
II.6.b.1 Cultivo axénico de plantas de alfalfa.	51
II.6.b.2. Solución nutritiva.	51
II.6.c. Inoculación de los cultivos.	52
II.6.d. Ensayos de nodulación de plantas de alfalfa	52
II.7. Programas estadísticos y análisis bioinformático.	52
Capítulo III. Caracterización fenotípica de la tolerancia a la acidez de Rhizobium favelukesii LPU83	53
III.1. Introducción.	55
III.2. Determinación de las condiciones de cultivo a utilizar en la caracterización de la tolerancia a la acidez de R. favelukesii.	56
III.2.a. Elección del medio de cultivo y valores de pH a estudiar.	56
III.2.b. Estudio del crecimiento de R. favelukesii en diferentes medios de cultivo en un rango amplio de pHs.	56
III.2.c. Selección del pH a utilizar como condición de estrés ácido en R. favelukesii. Análisis del pH límite en el cual se evidencia crecimiento.	57
III.2.d. Determinación de los parámetros cinéticos de la condición de estrés (pH: 4,6).	59
III.2.e. Avance en la caracterización de la tolerancia a acidez. Estudios en bioreactores a pH constante.	60
III.2.f. Análisis de la cinética de muerte de R. favelukesii a pH inferiores de 4,6.	60

Capítulo IV. Búsqueda de determinantes involucrados en la tolerancia a la acidez en <i>Rhizobium favelukesii</i> a través de análisis proteómicos.	63
IV.1. Introducción.	65
IV.2. Análisis comparativo de los perfiles proteicos de <i>R. favelukesii</i> ante un estrés ácido por medio de geles 2D.	66
IV.3. Análisis proteómico en condiciones de estrés ácido de <i>R. favelukesii</i> LPU83 a través de espectrometría de masas de alta resolución, Orbitrap.	67
IV.3.a. Respuesta global del proteoma de <i>R. favelukesii</i> al estrés ácido.	67
IV.3.b. Análisis <i>in silico</i> de las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente.	70
Capítulo V. Búsqueda de determinantes involucrados en la tolerancia a la acidez en <i>Rhizobium favelukesii</i> mediante transcriptómica	83
V.1. Introducción.	85
V.2. Optimización de la secuenciación de alto rendimiento de ARNs mensajeros de <i>R. favelukesii</i> LPU83.	85
V.2.a. Optimización del protocolo de purificación de ARN.	85
V.2.b. Estrategia de secuenciación de ARNs mensajeros presentes en <i>R. favelukesii</i> en condiciones de acidez y neutras.	87
V.3. Análisis transcriptómico de <i>R. favelukesii</i> LPU83 en condiciones de estrés ácido a través de RNA-Seq.	89
V.3.a. Análisis de las funciones (<i>in silico</i>) de los transcritos expresados diferencialmente como respuesta a la acidez.	90
V.3.b. Metabolismos que contienen genes expresados diferencialmente en condiciones de acidez.	93
Capítulo VI. Evaluación fenotípica de mutantes en genes involucrados en la tolerancia a la acidez en <i>Rhizobium favelukesii</i>.	103
VI.1. Introducción	105
VI.1. Determinación del nivel de expresión de los transcritos de genes seleccionados a partir de los estudios ómicos a través de una técnica no masiva.	105
VI.2. Efectos del pH en la permeabilidad celular de <i>R. favelukesii</i> LPU83.	106
VI.3. Evaluación del fenotipo de mutantes en genes de expresión diferencial en respuesta a la acidez.	107
VI.3.a. Caracterización del crecimiento en acidez de mutantes en genes expresados diferencialmente en respuesta a la acidez.	107
VI.3.b. Caracterización de la cinética de muerte en acidez de los mutantes.	111
VI.4. Evaluación del fenotipo en respuesta a la acidez de una cepa de <i>R. favelukesii</i> carente de plásmido simbiótico.	111
VI.4.a. Obtención de una cepa de <i>R. favelukesii</i> curada de su plásmido simbiótico.	112
VI.4.a.1. Análisis del contenido plasmídico de los transconjugantes Gm sensible.	112
VI.4.a.2. Búsqueda de la pérdida de secuencias específicas del pSym por PCR.	113
VI.4.a.3. Ensayos de nodulación	113
VI.4.a.4. Secuenciación	114
VI.4.b. Cinética de crecimiento de <i>R. favelukesii</i> LPU83-pSym ⁻ en condiciones de estrés ácido.	116
VI.4.c. Cinética de muerte de <i>R. favelukesii</i> LPU83-pSym ⁻ en condiciones de estrés ácido.	116
Capítulo VII. Discusión general y conclusiones.	119
VII.1. Discusión general	121
VII.2. Conclusiones	130
VII.3. Perspectivas	131
Anexo	133

Índice de Figuras

Figura.I.1. La zona de “confort”.	5
Figura.I.2. Representación esquemática de la función del sistema GAD en condiciones ácidas severas.	12
Figura.I.3. Representación de dos escenarios diferentes sobre el destino de los protones derivados del glutamato y la fuente de los protones eliminados por la descarboxilación del glutamato.	13
Figura.I.4. Etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa.	20
Figura.I.5. Flujo de trabajo en un experimento de RNA-Seq donde la muestra de partida proviene de células procariotas.	26
Figura.I.6. Flujo de trabajo de un experimento proteómico típico.	27
Figura.I.7. Flujos de trabajo más frecuentes de espectrometría de masas cuantitativos.	29
Figura.I.8. Esquema representativo del método de cuantificación label-free.	30
Figura II.1. Esquema de la construcción del plásmido que contiene la región de replicación del pSym de <i>R. favelukesii</i> LPU83.	46
Figura II.2. Esquema de la obtención de la cepa de <i>R. favelukesii</i> LPU83 curada de su pSym.	47
Figura II.3. Esquema de los pasos realizados en el análisis transcriptómico, RNA-Seq, en <i>R. favelukesii</i> LPU83.	48
Figura II. 4. Esquema de los pasos realizados en el análisis proteómico, shotgun proteomics, en <i>R. favelukesii</i> LPU83	50
Figura III.1. Curvas de crecimiento de <i>R. favelukesii</i> en medio GS a distintos pHs en un rango entre 4,0 y 7,0.	58
Figura III.2. Determinación del tiempo de duplicación de <i>R. favelukesii</i> a diferentes pHs.	59
Figura III.3. Curvas de crecimiento de <i>R. favelukesii</i> manteniendo la concentración de protones constante en bioreactor.	60
Figura III.4. Cinética de muerte para <i>R. favelukesii</i> a pHs inferiores a 4,0.	61
Figura IV.1. SDS-PAGE unidimensional de las fracciones proteicas de <i>R. favelukesii</i> en condiciones neutras y de acidez.	66
Figura IV.2. Geles bidimensionales de proteínas de membrana de <i>R. favelukesii</i> en condiciones control y bajo estrés ácido.	68
Figura IV.3. Representación de la razón de cambio en función del valor de p-value de las proteínas expresadas diferencialmente en <i>R. favelukesii</i> en condiciones de acidez.	69
Figura IV.4. Distribución genómica de las proteínas expresadas diferencialmente en condiciones de estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	70
Figura IV. 5. Representación de las diferentes categorías de productos ortólogos (COGs) en que se agrupan las proteínas expresadas diferencialmente en los cultivos de <i>R. favelukesii</i> .	71
Figura IV.6. Red de interacciones de las proteínas con menor expresión en condiciones de estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	72
Figura IV.7. Red de interacciones de las proteínas sobre-expresadas diferencialmente en condiciones de estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	73
Figura IV.8. Rutas involucradas en el metabolismo de GABA.	78
Figura V.1. Perfiles de muestras de ARN purificado analizados a través del sistema Agilent 2100 Bioanalyzer.	88
Figura V.2. Representación de la razón de cambio en función del valor de p-value de los transcritos expresados diferencialmente en <i>R. favelukesii</i> en condiciones de acidez.	90
Figura V.3. Distribución genómica de los genes expresados diferencialmente en condiciones de estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	91
Figura V.4. Representación de las diferentes categorías de productos ortólogos (COGs) en que se agrupan los genes expresados diferencialmente en acidez en <i>R. favelukesii</i> .	91

Figura V.5. Red de interacciones de las proteínas codificadas por los transcriptos sobre-expresados diferencialmente en condiciones de estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	92
Figura V.6. Red de interacciones de las proteínas expresadas con menor expresión en condiciones de estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	93
Figura V.7. Estructura genómica de la región que codifican para la NADH deshidrogenasa y su expresión en respuesta al pH ácido en <i>R. favelukesii</i> .	94
Figura V.8. Esquema de la fosforilación oxidativa en el que se representa la expresión diferencial de los transcriptos involucrados como respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	95
Figura V.9. Esquema de las reacciones involucradas en el metabolismo del glutamato en <i>R. favelukesii</i> .	96
Figura V.10. Esquema de la estructura del flagelo en el que se representa la expresión diferencial de los transcriptos involucrados en la respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	97
Figura V.11. Esquema de quimiotaxis bacteriana donde se representa la expresión diferencial de los transcriptos involucrados en la respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	99
Figura VI.1. Niveles de expresión por RT-PCR de GED identificados a partir de transcriptómica y proteómica en <i>R. favelukesii</i> .	106
Figura VI.2. Determinación de la actividad β -galactosidasa en células de <i>R. favelukesii</i> cultivadas en condiciones de acidez y de neutralidad.	107
Figura VI.3. Curvas de crecimiento de <i>R. favelukesii</i> LPU83-pLPU83a_0021 ⁻ y de la cepa salvaje en medio GS en acidez y neutralidad.	108
Figura VI.4. Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación correspondientes al mutante <i>R. favelukesii</i> LPU83-livK ⁻ y a la cepa salvaje, a pH 7,0 y 4,6.	109
Figura VI. 5. Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación correspondientes al mutante <i>R. favelukesii</i> LPU83-braD ⁻ y a la cepa salvaje, a pH 7,0 y 4,6.	110
Figura VI.6. Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación correspondientes al mutante <i>R. favelukesii</i> LPU83-2016 ⁻ y a la cepa salvaje, a pH 7,0 y 4,6.	110
Figura VI.7. Determinación del tiempo de reducción decimal (D) en medio GS a pH 3,5.	111
Figura VI.8. Perfiles plasmídicos de las posibles cepas curadas de su plásmido simbiótico.	113
Figura VI.9. Amplificación por PCR de marcadores específicos del pSym de <i>R. favelukesii</i> .	114
Figura VI.10. Capacidad de nodulación del clon 16 de <i>R. favelukesii</i> en alfalfa.	115
Figura VI.11. Porcentaje de secuencias pertenecientes a cada replicón del clon 16 y de la cepa salvaje.	115
Figura VI.12. Cinética de crecimiento de <i>R. favelukesii</i> LPU83-pSym ⁻ .	116
Figura VI.13. Porcentaje de sobrevivencia de <i>R. favelukesii</i> LPU83-pSym ⁻ .	117
Figura VII.1. Esquema de la fosforilación oxidativa en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcriptos como de las proteínas involucrados como respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	125
Figura VII.2. Esquema del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcriptos como de las proteínas involucrados como respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	126
Figura VII.3. Esquema de la biosíntesis del peptidoglicano en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcriptos como de las proteínas involucrados en la respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	128
Figura VII.4. Esquema de la biosíntesis del exopolisacárido en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcriptos como de las proteínas involucrados en la respuesta al estrés ácido en <i>R. favelukesii</i> .	129

Índice de Tablas

Tabla II.1. Cepas Bacterianas utilizadas en el Presente Trabajo.	35
Tabla II.2. Plásmidos utilizados en este Trabajo.	35
Tabla II.3. Medio de cultivo.	36
Tabla II.4. Lista de cebadores utilizados en este Trabajo.	43
Tabla II.5. Composición de la solución Fåhræus	51
Tabla V.1. Protocolos utilizados en la optimización de la purificación de ARN mensajeros.	86
Tabla V.2. Comparación de las distintas secuenciaciones del transcriptoma de <i>R. favelukesii</i> bajo estrés ácido o a pH neutro.	89
Tabla A.1. Lista de proteínas expresadas diferencialmente.	136
Tabla A.2. Lista de genes expresadas diferencialmente por RNAseq.	139
Tabla A.3. Lista de genes identificados con la misma tendencia en su nivel de expresión.	159

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATR	Tolerancia a la acidez adquirida (<i>Acid-tolerance resistance</i>)
COG	<i>Cluster of orthologs</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad Óptica
EPS	Exopolisacárido bacteriano
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
g	Gramo
Gb	Gigabase= 1×10^9 pb
GED	Genes expresados diferencialmente
GFP	Proteína verde fluorescente
Gm	Gentamicina sulfato
hs	Horas
Kb	Kilobase= 1×10^3 pb
Km	Kanamicina sulfato
l	Litro
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
M	Molar
Mb	Megabase= 1×10^6 pb
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Nal	Acido Nalidixico
Nm	Neomicina sulfato
pb	Pares de Bases
PCR	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i> , reacción en cadena de la polimerasa.
PED	Proteínas expresadas diferencialmente
pH	Potencial Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sm	Estreptomina
Sp	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
TY	Medio de cultivo triptona extracto de levadura
ufc	Unidades Formadoras de Colonias.
X-gal	5-bromo-4cloro-3indolil- β -galactopiranósido
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. La vida bacteriana. Los microorganismos en el ambiente.

Los seres vivos constituyen un sistema que no se halla nunca en equilibrio con el entorno. En un organismo vivo, la composición de moléculas e iones contenidos dentro del mismo difiere a la de su entorno. Esta composición se mantiene relativamente constante en el transcurso del tiempo, a pesar de que su entorno cambie constantemente. Ejemplo de esto es un pez en el océano o una bacteria en el suelo. La concentración constante de moléculas e iones dentro del organismo es resultado de un *estado estacionario dinámico*, el cual se encuentra lejos del equilibrio. En consecuencia, mantener este estado estacionario requiere un aporte constante de energía. De esta manera, cuando la célula ya no es capaz de obtener energía, muere y se inicia su degradación hacia el equilibrio con su entorno.

Las bacterias y arqueas habitan prácticamente la totalidad de nichos ecológicos de la biosfera. Se estima que existen alrededor de 5×10^{30} células procariotas en la biosfera terrestre, localizadas principalmente en la sub-superficie terrestre, en la sub-superficie oceánica, en el suelo y en aguas oceánicas (Whitman *et al.*, 1998). Este número encierra una inmensa cantidad y variedad de microorganismos, evidenciando la abrumadora diversidad bacteriana. Se ha reportado que una tonelada de suelo puede contener hasta 4×10^6 taxas distintas (Curtis *et al.*, 2002). Así, en esta diversidad, existen organismos capaces de usar casi todos los tipos de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. En el transcurso de la evolución, los organismos han adquirido una serie de mecanismos reguladores que permiten mantener la homeostasis a nivel molecular y celular. La supervivencia de un organismo depende, al menos en parte, de su habilidad para percibir y responder a cambios en su entorno. Hecho que se ve reflejado en la proporción relativa de genes que codifican para determinantes involucrados en mecanismos regulatorios.

Como consecuencia de las perturbaciones en un ecosistema natural, las bacterias crecen, probablemente como una estrategia, a una tasa de crecimiento baja o incluso entran en un estado de latencia para evadir la muerte y lisis celular (Kjelleberg, 1993, Morita, 1997). De la interacción entre las bacterias y un conjunto cambiante de estímulos que restringen el crecimiento se han desarrollado, tras largo tiempo de coexistir, redes de adaptación muy complejas. Las células se encuentran frecuentemente en inanición y sumado a esto también deben, probablemente, lidiar con estreses osmóticos, ácidos, térmicos, oxidativos o incluso una combinación de ellos (Hecker & Volker, 2001).

1.2. Estrés bacteriano.

A lo largo de la evolución, las bacterias han colonizado exitosamente cada nicho en el planeta. Esto incluye desde los lugares más inhóspitos hasta lugares donde no existen fluctuaciones y comprende bacterias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, que habitan los suelos; bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, que puede ser encontrada habitando el intestino de mamíferos; como así también *Deinococcus radiodurans*, que persiste en reactores nucleares pudiendo tolerar dosis de radiación que a otras formas de vida las lleva a la

muerte (Cox & Battista, 2005). En este vasto rango de ambientes diferentes, como se mencionó, las bacterias son expuestas constantemente a fluctuaciones medioambientales. Estas fluctuaciones resultan estresantes para las mismas e incluyen cambios en la temperatura, pH, osmolaridad, radiación y concentración de nutrientes y toxinas, entre otros (Aertsen & Michiels, 2004). Para asegurar su supervivencia, a pesar de estas adversidades, las bacterias pueden moverse hacia sectores más favorables por natación (*swimming*) utilizando los flagelos (Mitchell & Kogure, 2006), o pueden adaptarse a los cambios en su entorno inmediato como respuesta a la naturaleza del estrés impuesto. Esta respuesta al estrés impuesto involucra cambios en los patrones de expresión génica, de manera que se expresen genes cuyos productos se requieren para combatir la naturaleza dañina del estrés (Hecker & Volker, 2001). En consecuencia, los organismos cuentan con una notable colección de mecanismos reguladores que permiten responder y mantener la homeostasis a nivel molecular y celular.

1.2.a. Aproximación al concepto de estrés.

Cuando sucede una perturbación ambiental que supera la capacidad para reparar el daño o cuando no existe un mecanismo ante dicha perturbación, la célula se encuentra bajo un estrés severo. Existe la percepción en la comunidad científica de que a un determinado estrés se lo denomina como tal por causar desviaciones de las condiciones “normales”, que alteran los patrones metabólicos “normales”. Sin embargo, teniendo en cuenta la dificultad y ambigüedad que involucra definir el término “normal” en un contexto evolutivo, se hace necesario encontrar otro tipo de definición. En esta dirección, podría definirse como estrés a “cualquier cambio en el genoma, proteoma o entorno que impone o reduce el crecimiento o la potencial supervivencia. Dichos cambios conducen a la célula a intentar restaurar un patrón metabólico que se ajuste a la supervivencia o a un crecimiento rápido” (Booth, 2002). Booth *et al.* (2002) definieron así tres zonas o capas donde representan los distintos estados en los que se podría encontrar una célula. En la Figura I.1 se muestra un gráfico tridimensional donde cada eje es una condición diferente del entorno, donde se encuentran representadas estas tres zonas. La zona más interna, representa el rango donde las células se reproducen a una tasa de crecimiento limitado. La zona intermedia, es la zona de supervivencia, donde no hay crecimiento y la tasa de muerte es baja. Por último, la zona externa presenta una tasa de crecimiento negativa, donde las tasas de muerte son altas. La dimensión de cada zona queda definida por las propiedades características de cada especie bacteriana; es consecuencia de la sensibilidad a las diferentes condiciones de estrés, como también de su habilidad de adaptación frente a las fluctuaciones ambientales. Cabe destacar que dentro de cada una de las tres zonas existen innumerables estados intermedios posibles. Las condiciones por las cuales la célula sale de una zona para entrar en la zona contigua son dependientes del grado de estrés impuesto por el ambiente y de la capacidad de respuesta celular. Una bacteria con un potencial adaptativo

moderado (o una alta sensibilidad al estrés) presentará zonas de supervivencia y crecimiento muy reducidas, lo contrario pasará con una bacteria que posea un poder adaptativo alto.

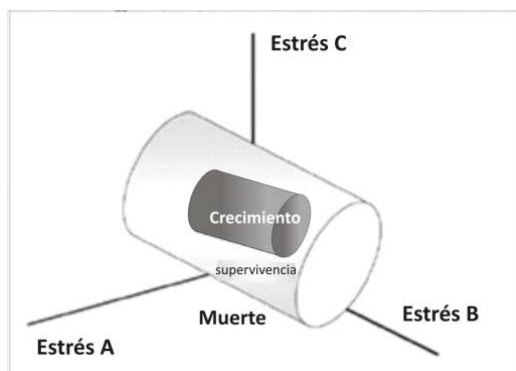


Figura.I.1. La zona de "comfort". Para un estrés dado, cada bacteria tiene un rango dentro del cual la tasa de incremento de unidades formadoras de colonias (ufc) es positiva (zona de crecimiento), cero (zona de supervivencia) o negativa (zona de muerte). Adaptado de Booth, 2002.

I.2.b. Respuesta al estrés.

Las bacterias utilizan diferentes estrategias para adaptarse a las variaciones ambientales. Estas variaciones inducen en ellas una respuesta que involucra cambios en los patrones de expresión génica característicos. Así, a través de esta respuesta, se pueden proteger procesos vitales, restablecer la homeostasis celular e incrementar la resistencia contra futuros estreses. Muchos de los genes involucrados en la respuesta al estrés son conservados a través de las distintas especies bacterianas. Hecho que resulta remarcable si se considera la gran variabilidad de los diferentes nichos medioambientales donde las bacterias pueden vivir (da-Silva *et al.*, 2017). Dependiendo de la condición de estrés y del tipo de reacción al mismo, suelen considerarse dos tipos de respuesta: general y específica (Hickey & Hirshfield, 1990, Foster, 1999, Yuan *et al.*, 2008). Las respuestas generales al estrés son inducidas por varias condiciones ambientales y, en consecuencia, pueden otorgar funciones de protección cruzada sobre varios tipos de estrés. Este tipo de respuesta podría estar dada por una única respuesta que se desencadena a través de unos pocos reguladores. Por otro lado, las respuestas del tipo específicas están orientadas a mejorar la resistencia o supervivencia del organismo y/o a reparar el daño generado por la condición de estrés. Los mecanismos puestos en juego en esta respuesta tienen poco efecto protector frente a otros tipos diferentes de estrés. El estrés oxidativo o por las variaciones de pH, por ejemplo, involucra este tipo de respuestas. En este sentido, se han realizado numerosos estudios sobre este tipo de respuestas (específicas y generales) en distintos tipos de bacterias. Los resultados de dicho estudios, han puesto de manifiesto la existencia de un conjunto de mecanismos bioquímicos enormemente variado y complejo, dirigido a tolerar mejor la condición de estrés y a mejorar la supervivencia (Storz & Hengge-Aronis, 2000).

Una de las habilidades primordiales para la supervivencia de las bacterias en condiciones distintas a las óptimas es la capacidad de percibir fluctuaciones del entorno inmediato. En este sentido, un cambio extracelular puede percibirse a través de proteínas sensores periplásmicas, capaces de detectar, por ejemplo, fluctuaciones en el pH o en la concentración de sales, entre otros (Tschauner *et al.*, 2014). Otra manera de percibir un cambio en el ambiente, puede involucrar moléculas de ARN que actúan en *cis*, siendo éste el caso

de los sensores de temperatura (Narberhaus, 2010). No menos relevante para la supervivencia celular, resulta la habilidad de modular la expresión génica de manera de ajustar la fisiología bacteriana a las nuevas condiciones. Una vía de la modulación de la expresión génica rápida y eficiente es una clase particular de regulación que involucra un tipo de reguladores transcripcionales denominados factores sigma.

I.2.b.1. Factores sigma.

Los factores sigma son necesarios para iniciar la transcripción y permiten la expresión diferencial de los genes dirigiendo la ARN polimerasa a promotores específicos (Feklistov *et al.*, 2014). Por ejemplo, el factor σ^{70} (o RpoD) en *E. coli* es el factor sigma que regula genes *housekeeping*, ya que dirige la transcripción de genes importantes para el crecimiento y metabolismo bacteriano. Mientras que el factor σ^{32} (o RpoH) regula la respuesta al choque térmico (Nonaka *et al.*, 2006). La respuesta al choque térmico ha sido ampliamente estudiada en muchas bacterias (Schumann, 2016) y se conoce que un incremento de temperatura induce genes codificantes para las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs). Existen principalmente dos clases de HSPs involucradas en proteger a la célula de la desnaturalización proteica causada por el incremento en la temperatura, las chaperonas y las proteasas (da-Silva *et al.*, 2017). Los sistemas de chaperonas, como GroESL y DnaKJ, tienen un importante rol, ya que rescatan las proteínas mal plegadas y permiten su re-plegado hacia la conformación nativa. Por otro lado, las proteasas, como FtsH y ClpXP, están involucradas en la degradación de agregados proteicos (proteínas mal plegadas que no son capaces de adquirir su conformación funcional). Estas HSPs, además, están frecuentemente involucradas en la respuesta a otros tipos de estrés. A su vez, las chaperonas y proteasas también son importantes bajo condiciones normales para el correcto plegamiento de los polipéptidos recién sintetizados (da-Silva *et al.*, 2017). Otro factor sigma relevante, es el que se encuentra involucrado en el ingreso a la fase estacionaria. Para el caso de *E. coli*, estos factores se denominan σ^H y σ^S respectivamente (Lange & Hengge-Aronis, 1991, Mauri & Klumpp, 2014). Otro ejemplo, son los factores σ^H , σ^F , σ^E , σ^G , σ^K en *B. subtilis*, los cuales están involucrados en la regulación de la esporulación (Mauri & Klumpp, 2014). El factor sigma σ^S (RpoS) en *E. coli* o σ^B (SigB) en *B. subtilis* han sido ampliamente identificados como factores que responden al estrés general tanto en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Boor, 2006). En consecuencia, los factores sigma resultan de particular interés ya que las evidencias sugieren que, en los patógenos bacterianos, estas proteínas reguladoras sirven como enlaces entre las capacidades bacterianas de responder a los cambios impuestos por el entorno del huésped (Kim *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, para comprender completamente las contribuciones biológicas de los factores sigma, es de vital importancia identificar los genes regulados por estas proteínas, que en gran parte aún son desconocidos.

I.2.b.2. Factores de transcripción.

Dentro de la regulación génica, los factores de transcripción ocupan un lugar relevante. Las bacterias contienen una serie de factores de transcripción que son apropiados para su estilo de vida, sus mecanismos de crecimiento y como respuesta al estrés dentro de un nicho ecológico (Kidd, 2011). Los factores de

transcripción bacterianos pueden ser clasificados en familias discretas basadas en la similitud de secuencia o estructura, de función y de sus mecanismos de activación o represión. Recientemente, numerosos factores de transcripción han sido caracterizados por responder a distintos tipos de estreses, incluso a estreses diferentes de los que habían sido descritos originalmente (Kidd, 2011). Dentro de las familias de los factores de transcripción, la familia MerR incluye a proteínas que contienen un motivo HTH N-terminal (Brown *et al.*, 2003). El dominio de detección o dominio efector de estas proteínas se encuentra en el extremo C-terminal. Este dominio variable, es la región que detecta la señal ambiental a la que responde. Esta familia resulta interesante ya que dentro de ella alberga una gama de reguladores tipo MerR para la detección de iones metálicos (proteínas que responden a níquel, cobre, zinc, plomo, cobalto o cadmio), reguladores de bombas de expulsión (para diferentes compuestos potencialmente tóxicos) y reguladores específicos que detectan el estrés oxidativo, osmótico, cambios de pH y temperatura, o señales ambientales para los cambios fenotípicos como la nodulación, así como también, la detección de la falta de nutrientes y el control del metabolismo del nitrógeno (Kidd, 2011). Dentro de la familia MerR se encuentra SoxR, un regulador de respuesta que regula SoxS, el cual es un importante regulador a nivel global en defensa del estrés oxidativo (Kidd, 2011).

I.2.b.3. La fase estacionaria y el estrés.

El ingreso en la fase estacionaria involucra cambios drásticos en la fisiología y morfología celular, como pueden ser cambios estructurales en la envoltura celular, en la composición de la membrana y diferencias en el superenrollamiento y compactación del ADN (Siegele & Kolter, 1992). Debido a que las células en fase estacionaria presentan una mayor resistencia, por ejemplo, al calor y a altas concentraciones de H₂O₂ y NaCl, se debe inducir en esta fase la síntesis de proteínas que poseen un rol de protección contra cierto tipo de estrés (Jenkins *et al.*, 1988, Jenkins *et al.*, 1990, Hengge-Aronis, 1993). La habilidad de sobrevivir bajo condiciones adversas indica que las células en fase estacionaria poseen sistemas que no son expresados en las células en fase exponencial. Esta respuesta no es específica del estrés y se contrasta con las respuestas específicas del estrés por temperatura (Gross *et al.*, 1990) u oxidativo (Amabile-Cuevas & Demple, 1991, Farr & Kogoma, 1991). Las señales intracelulares, comunes a todas las condiciones, que dan lugar a la respuesta de la fase estacionaria aún no han sido completamente dilucidadas. Sin embargo, varios genes han sido descritos por estar involucrados. Uno de ellos es *rpoS*, un factor sigma, regulador central de la expresión génica durante la transición hacia la fase estacionaria. En este sentido, existe un fenómeno de adaptación. Las células que han sido cultivadas en un medio con un nivel de estrés moderado y se encuentran en fase estacionaria, adquieren una mayor tolerancia frente a futuros incrementos más severos de dicho estrés. Este fenómeno de adaptación se aplica a una diversidad de estreses y la tolerancia adquirida es relativamente, aunque no exclusivamente, específica del estrés inductor (Ashburner, 1982, Demple & Halbrook, 1983, Christman *et al.*, 1985).

I.2.b.4. Sensores extracelulares.

Por otra parte, una respuesta interesante ha surgido a partir de diversos estudios, los cuales han

descubiertos factores de señalización extracelular capaces de disparar una respuesta al estrés y aumentar la supervivencia de células no estresadas. Rowbury (2001, 2003) propuso que las poblaciones de bacterias pueden producir sensores extracelulares de naturaleza proteica (*extracellular sensing components*, ESCs). Frente a la presencia de un estrés determinado, estos componentes son capaces de convertirse en componentes extracelulares de inducción (*extracellular induction components*, EICs). Dicha conversión no necesita de la presencia del organismo, es decir, que la presencia de estos EICs en el medio puede inducir una respuesta al estrés en células no inducidas. En este sentido, al ser moléculas pequeñas, los EICs pueden difundir lejos de su sitio de formación, pudiendo advertir a células que se encuentran localizadas en un sitio que aún no ha sido alcanzado por el estrés. Este hecho incrementa las posibilidades de supervivencia para las bacterias que aún no han sido expuestas al estrés. Asimismo, estos factores permiten la posibilidad de transferir tolerancia desde cultivos que alcanzaron la muerte celular a organismos vivos (Aertsen & Michiels, 2004). Li *et al.* (2002) encontraron que *Streptococcus mutans* produce EICs durante la exposición a pH bajos y los mismos, actúan como una señal secundaria que amplifica la inducción de la adaptación a la acidez.

1.3. Resistencia al estrés ácido.

Los ambientes ácidos están globalmente distribuidos y el origen de los mismos puede ser natural o antropogénicos. Los ambientes con valores de pH por debajo de 5 están distribuidos ampliamente a lo largo de la litósfera, abarcando desde suelos a cuerpos de agua. Los ambientes que poseen valores de pH por debajo de 3 son menos frecuentes. El rango de ambientes se amplía en el caso de las bacterias que pueden colonizar huéspedes, por ejemplo mamíferos. Éstas se exponen a ambientes, como el estómago, donde los valores de pH pueden alcanzar valores muy bajos (*ca.* 1,5), siendo éste uno de los ambientes más inhóspito de la anatomía en mamíferos. La acidez gástrica es una barrera a través de la cual deben pasar todos los organismos que se establecen en el intestino. En consecuencia, todos los organismos gastrointestinales, tanto los patógenos como los comensales beneficiosos, deben tener la capacidad de sobrevivir a un cambio extremo en el pH. En consecuencia, han llamado la atención de la comunidad científica. Los estudios más completos respecto a la tolerancia a la acidez han sido realizados en bacterias entéricas. Hay varios ejemplos de estos microorganismos, los cuales contienen además diferentes estrategias para sobrellevar esta adversidad. *Vibrio cholerae* es uno de ellos y utiliza principalmente una "táctica de asalto" (*assault tactic*) que involucra un aumento de su población, con la esperanza de que algunos sobrevivan y lleguen al intestino. Otro ejemplo es *Helicobacter pylori*, que es uno de los principales agentes causales de las úlceras gástricas y es reconocido por ser un experto en sobrevivir a la acidez gástrica. Uno de los ejemplos más destacables, es *E. coli*, un microorganismo intestinal que prefiere crecer a pH neutro, pero sorprendentemente puede sobrevivir a valores de pH de 2 durante horas, siendo casi tan eficaz como *H. pylori* para resistir al estrés ácido extremo (Gorden & Small, 1993, Small *et al.*, 1994). En este sentido, aunque los dos organismos son similares en términos de nivel de resistencia, los mecanismos que utilizan son notablemente diferentes

(Audia *et al.*, 2001, Richard & Foster, 2003). Los estudios sobre estos microorganismos han proporcionado evidencia convincente de que la tolerancia a la acidez no es una respuesta única gobernada por un regulador global. De hecho, el mejor modelo de tolerancia a la acidez surge de varios sistemas que perciben los cambios de pH de formas diferentes, utilizando estructuras reguladoras diferentes y en algunos casos superpuestas (Baik *et al.*, 1996, Foster, 1999, Foster & Moreno, 1999, Rowbury, 1999, Bang *et al.*, 2000).

I.3.a. Mecanismos de tolerancia a la acidez.

Cuando las células son expuestas al estrés ácido, principalmente tres aspectos de la función celular pueden verse afectados. Uno de ellos es la capacidad de adquirir nutrientes y la consecuente obtención de energía, otro es la homeostasis del pH citoplasmático, y por último, la estabilidad de las proteínas y el ADN. La homeostasis del pH parecería ser de central importancia para las células en crecimiento ya que ha sido evidenciado que perturbaciones moderadas en el pH intracelular son capaces de alterar la tasa de crecimiento (Roe *et al.*, 1998). Por otro lado, los datos disponibles sugieren que el pH citoplasmático alcanza valores cercanos a 4 cuando el estrés ácido es muy extremo (Foster & Hall, 1991, Jordan *et al.*, 1999). Por lo tanto, resulta necesario para la supervivencia de cualquier organismo, que frente a un cambio rápido de pH, se desencadenen mecanismos de protección que permitan a las estructuras de la superficie mantener su funcionalidad y además proteger y/o reparar el ADN y las proteínas citoplasmáticas. En este sentido, la evidencia actual sugiere que existen principalmente dos mecanismos que contribuyen a la protección de las estructuras superficiales: las chaperonas y la alcalinización del periplasma.

I.3.a.1. Protección y reparación del periplasma bajo estrés ácido.

Cuando las células se exponen a un ambiente ácido, la actividad de las proteínas asociadas a la superficie celular se ve afectadas de manera inmediata. Dicha superficie celular involucra a la superficie externa de la membrana citoplasmática, el periplasma, la membrana externa y la pared celular. Por consiguiente, actuar sobre el entorno celular puede ser crucial. Se ha identificado un sistema en el periplasma de *E. coli* y de *Shigella flexneri* que contribuye de manera relevante a la supervivencia en pH ácido (Waterman & Small, 1996, Link *et al.*, 1997, Gajiwala & Burley, 2000). Ejemplo de esto es la proteína HdeA, una de las proteínas más abundantes en el periplasma de *E. coli* durante la fase estacionaria en cultivos líquidos. Se ha evidenciado que mutantes en HdeA muestran una capacidad de supervivencia 10.000 veces menor a la cepa salvaje luego de una exposición a un valor de pH 3 (Waterman & Small, 1996). Esta proteína se expresa a partir del operón *hdeAB*, el cual es regulado por el factor sigma RpoS y por una proteína H-NS. Las evidencias sugieren que la presencia de HdeA, a pesar de no tener propiedades de chaperona, evita la agregación de proteínas que suele producirse en condiciones de acidez. Cuando el pH es neutro, se conoce que HdeA y HdeB son secretadas y forman un heterodímero en el periplasma. Sin embargo, en presencia de pH ácido, este heterodímero se disocia y HdeA se encuentra disponible para unirse a otras proteínas plegadas de manera

incorrecta como consecuencia del estrés. De esta manera, este sistema es capaz de prevenir la agregación proteica en el periplasma frente a condiciones de estrés ácido (Gajiwala & Burley, 2000).

1.3.a.2. La membrana citoplasmática y la membrana externa como barreras para la acidez.

La permeabilidad de la membrana a los protones posee una importancia crítica frente a la presencia de estrés ácido. Las bicapas lipídicas son, en sí mismas, relativamente impermeables a los protones, siendo esto necesario no sólo para la homeostasis del pH intracelular, sino también para la obtención de energía. En células de *E. coli* previamente expuestas a un estrés ácido leve (adaptadas), se evidencia que las mismas poseen una reducción significativa en la permeabilidad de los protones (Jordan *et al.*, 1999, Booth, 2002). A su vez, dichas células presentan un aumento de la tolerancia a la acidez, lo cual se correlaciona con lo antes mencionado (Jordan *et al.*, 1999). Por otro lado, algunos ajustes de la composición de la membrana pueden afectar la permeabilidad de la misma. En este sentido, la supervivencia a la exposición a pH 3 de células de *E. coli* O157 adaptadas, presenta una correlación con el aumento de ácidos grasos con anillos ciclopropano en la membrana (Brown *et al.*, 1997). Cabe destacar que durante la fase estacionaria existe un aumento en este tipo de ácidos grasos en la membrana y se cree que este aumento podría ser responsable parcialmente del aumento de la tolerancia a la acidez en *E. coli* (Chang & Cronan, 1999).

Otro aspecto importante a considerar son los complejos de proteínas de la membrana, los cuales representan una gran amenaza para la permeabilidad de H⁺ al interior celular. En células de *E. coli* ha sido demostrado que la combinación de un estrés ácido a pH 3,6 en conjunto a un estrés hipoosmótico leve, provoca una muerte rápida en las células (Levina *et al.*, 1999). Ninguno de estos dos estreses por separado (ni pH 3,6 solo, ni el choque hipoosmótico solo) son suficientes para causar esta muerte celular rápida. En este sentido, se debe tener en cuenta que un choque hipoosmótico provoca la apertura de canales mecanosensibles en la membrana citoplasmática. Estos canales no discriminan, en gran medida, entre iones y moléculas, permitiendo a los H⁺ atravesar la membrana citoplasmática y, en consecuencia, producir una disminución rápida del pH citoplasmático. Esto puede explicar la rápida muerte de las células ya que el brusco colapso del pH intracelular es seguido inmediatamente por la desnaturalización de las proteínas y subsiguiente muerte celular (Booth *et al.*, 2002). Estos experimentos evidencian fehacientemente que el control estricto sobre la apertura de los canales y/o la operación de los sistemas de transporte es crítico para mantener la impermeabilidad de la membrana a los protones.

1.3.a.3. Alcalinización del periplasma y/o del citoplasma.

El ejemplo más sorprendente de alcalinización del periplasma como mecanismo de supervivencia a pH bajos es el de *H. pylori* (Meyer-Rosberg *et al.*, 1996, Rektorschek *et al.*, 2000). *H. pylori* sobrevive en la pared del estómago, que periódicamente (durante los períodos de ayuno) puede alcanzar un pH de 2,5 (Schade *et al.*, 1994). Este organismo también coloniza el estómago y puede crecer en este ambiente. Estudios moleculares han identificado que la ureasa y el transportador Urel poseen un papel clave en esta colonización

(Ferrero *et al.*, 1992, Tsuda *et al.*, 1994, Skouloubris *et al.*, 1998, Rektorschek *et al.*, 2000). La ureasa cataliza la conversión de la urea en CO₂ y amoníaco, los cuales luego se difunden en el periplasma causando un aumento en el pH periplásmico cercano a un pH de 6 (Athmann *et al.*, 2000). En este sentido, se cree que el aumento del pH en el periplasma es uno de los principales mecanismos de protección contra el estrés ácido. Sin embargo, se debe destacar que también existen otras proteínas inducibles por las condiciones de acidez involucradas significativamente en la protección contra el mismo (Bijlsma *et al.*, 1998, Sachs *et al.*, 2000).

Sistema de descarboxilasas.

Existe un fuerte paralelismo entre el ejemplo de *H. pylori* y el rol de las aminoácido descarboxilasas, el cual es central en la protección contra el estrés ácido en una variedad de bacterias (Curran *et al.*, 1995, Lin *et al.*, 1995, Park *et al.*, 1996, Merrell & Camilli, 1999, Cotter *et al.*, 2001). El sistema de descarboxilasas generalmente consiste de dos componentes. Uno de los componentes es una o más enzimas descarboxilasas, que convierten su sustrato (aminoácido) en su amina relacionada, con producción de CO₂ (o bicarbonato). El otro componente es un transportador con sistema antiporte que intercambia el aminoácido por la amina (producto de la descarboxilación). Las descarboxilasas más abundantes involucradas en la tolerancia a la acidez son las que descarboxilan arginina, lisina o glutamato. En el caso de la glutamato descarboxilasa, la misma cataliza la conversión de glutamato a γ -aminobutirato (GABA), consumiendo un protón (Figura I.2). La descarboxilación del glutamato se produce en el citoplasma, probablemente cerca de la membrana, adyacente al transportador GadC que extrae el producto (GABA) de la célula intercambiándolo por el glutamato (Figura I.2). Mutantes de *S. flexneri* y *E. coli* que carecen de este sistema de descarboxilasa están extremadamente comprometidos en su supervivencia cuando se incuban a pH 2.5 (Waterman & Small, 1996, Castanie-Cornet *et al.*, 1999). El sistema de descarboxilasas se encuentra presente, no sólo en *E. coli* sino también en una variedad de microorganismos (Feehily & Karatzas, 2013), en los cuales también ha sido demostrado que juega un rol en la resistencia a la acidez (Cotter *et al.*, 2001, Capitani *et al.*, 2003, Su *et al.*, 2011).

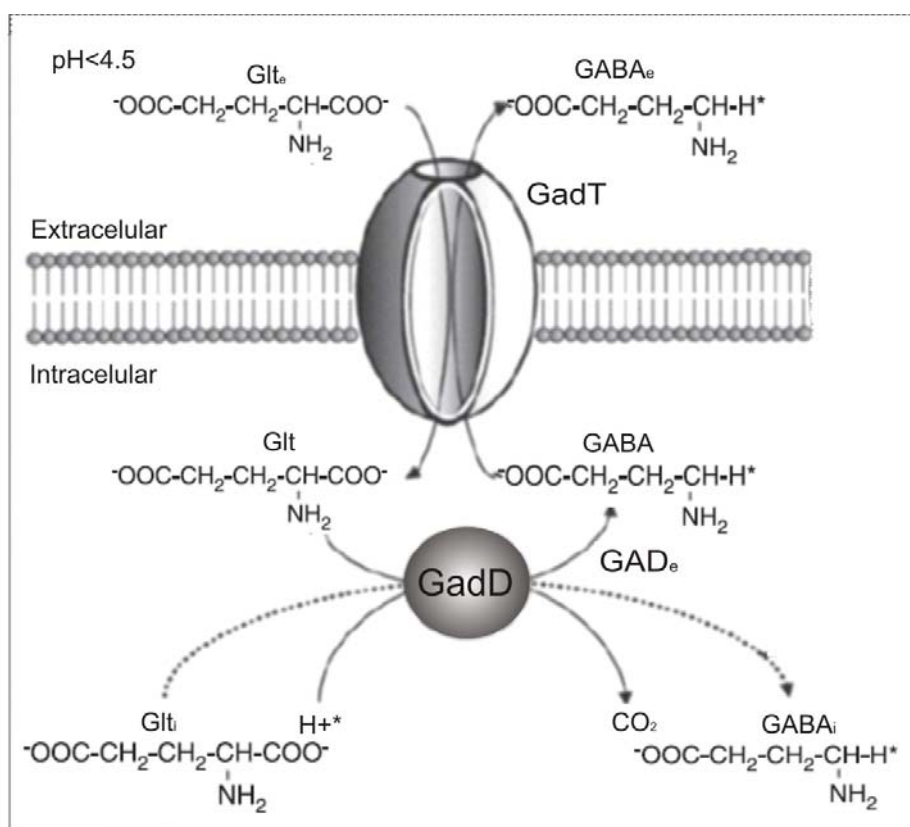


Figura.I.2. Representación esquemática de la función del sistema GAD en condiciones ácidas severas. La glutamato descarboxilasa GadD convierte el glutamato (Glt) en GABA, el cual luego es exportado por el transportador antiporte GadT, ingresando nuevamente una molécula de glutamato extracelular (adaptado de Feehily & Karatzas, 2013).

El mecanismo por el cual las descarboxilasas otorgan protección contra el estrés no está completamente claro. En este sentido, varios trabajos han sugerido que el mecanismo por el cual el sistema de descarboxilasas otorga resistencia a la acidez es a través del consumo de un protón en el citoplasma durante la descarboxilación, lo que provocaría un subsiguiente aumento del pH citoplasmático (Park *et al.*, 1996). Otros han sugerido que la protección está relacionada a la alcalinización del periplasma durante la descarboxilación (Slonczewski & Foster, 1996). Un factor que favorecería al mecanismo periplásmico es que la capacidad amortiguadora en muchos medios externos a menudo es bastante baja, lo que facilitaría un rápido aumento del pH periplásmico. Sin embargo, la entrada rápida de protones a través de la membrana externa supondría una gran amenaza para un mecanismo que requiere cambios de pH localizados. Una cuidadosa investigación sobre el pKa del glutamato, del GABA y del rango de valores de pH intracelular y extracelular, lleva a dos posibilidades diferentes que se muestran en la Figura I.3 (Feehily & Karatzas, 2013); en el escenario (A), se detalla un estrés de pH leve donde el pH extracelular es mayor a 4,5. En dicho escenario, el glutamato extracelular (Glt_e) está principalmente desprotonado y, de esta manera, se importa a la célula, donde posteriormente es descarboxilado removiendo un protón intracelular (H^{+*}). Luego, el GABA traslada este protón al exterior celular, provocándose así, un beneficio para la célula. Sin embargo, en la segunda posibilidad, representada en el escenario (B), el pH extracelular es más bajo (por ejemplo, 3,5). En este segundo escenario, el grupo carboxilo de la cadena del glutamato está principalmente protonado. Esto significa que el transportador importa glutamato en un estado protonado. Una vez en el interior celular, este

protón (H^+) se libera al medio. De esta manera, el beneficio del protón consumido por el proceso de descarboxilación se contrarresta. No obstante, considerando que es evidente que el sistema GAD otorga un aumento en la resistencia a la acidez en condiciones de pH extracelular bajo (3,5), el mecanismo en estas condiciones probablemente aún es desconocido. En este sentido, se ha sugerido que un posible mecanismo es una vía de generación o regeneración de glutamato endógeno que trabaje en conjunto con el sistema GAD (Castanie-Cornet *et al.*, 1999, Tucker *et al.*, 2002). En este caso, el glutamato generado intracelularmente no introduciría protones en el medio intracelular y, por lo tanto, su descarboxilación podría eliminar protones, produciendo una diferencia a favor de la célula. Una posible vía candidata que podría generar glutamato intracelular (Glt_i) podría involucrar una glutaminasa que convierte glutamina en glutamato (Castanie-Cornet *et al.*, 1999, Tucker *et al.*, 2002, Waterman & Small, 2003). El único carboxilo de la glutamina tiene un pKa de 2, y se desprotonaría a $pH > 2$. Por lo tanto, su importación no introduciría ningún protón en el medio intracelular, y la descarboxilación del glutamato resultaría en una pérdida neta de protones y un beneficio para la célula. Otra vía alternativa podría provenir de GABA, que por acción de la GABA-AT (GABA *shunt pathways*), conduce a la regeneración del glutamato intracelular (Feehily & Karatzas, 2013).

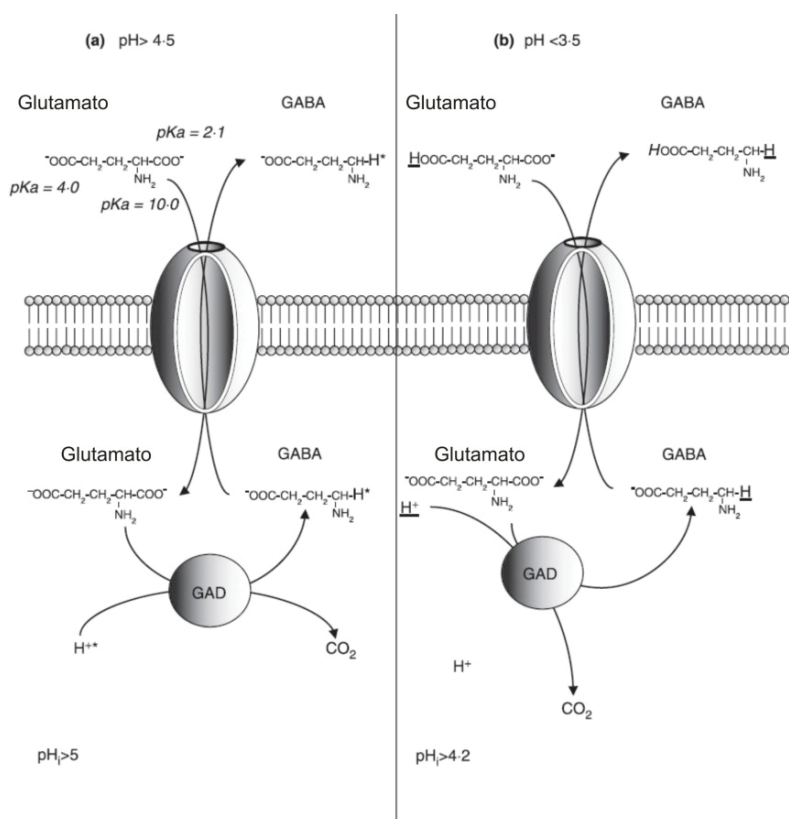


Figura.I. 3. Representación de dos escenarios diferentes sobre el destino de los protones derivados del glutamato y la fuente de los protones eliminados por la descarboxilación del glutamato. El escenario (a) describe el destino del glutamato, el GABA y los protones en condiciones ácidas leves. En este caso, ambos grupos carboxilo de glutamato están desprotonados ya que su pKa es más bajo que el pH extracelular. En el caso del escenario (b), el pH extracelular es muy bajo (<3,5) en el rango letal para la mayoría de las bacterias. En este caso, el grupo carboxilo de la cadena lateral está principalmente protonado porque su pKa es más alto que el pH extracelular. En este estado protonado, el glutamato se importa en la célula. Posteriormente, este protón (H^+) se libera en el medio intracelular y se consume durante la descarboxilación del glutamato a GABA y, por lo tanto, se exporta fuera de la célula. En este caso, no se elimina ningún protón del medio intracelular y, por lo tanto, no existe ningún beneficio para la célula. Figura adaptada de Feehily & Karatzas, 2013.

I.3.a.4. Protección del citoplasma a pH ácido.

Una acidificación en el citoplasma trae aparejado ineludiblemente una disminución en la estabilidad de las proteínas, lo que puede afectar indirectamente la integridad del ADN por la falla en los procesos de reparación. Con respecto a la estabilidad de las proteínas, cuando células de *E. coli* son expuestas a pH 3 en una solución con *buffer* fosfato-citrato, se observa un deterioro en la actividad de la β -galactosidasa en paralelo con la pérdida de viabilidad de dichas células. De otro modo, si las que se exponen a pH 3 son células adaptadas (crecimiento previo a pH 5,8) no se evidencia pérdida en su viabilidad y las células presentan una actividad β -galactosidasa constante. Esto sucede a pesar del hecho de que ambos conjuntos de células exhiben valores similares del pH citoplásmico, aprox. pH 4,5–5,0 (Jordan *et al.*, 1999, Booth *et al.*, 2002). Esto induce a pensar que dicho fenómeno, en las células adaptadas a la acidez, podría estar dado por un aumento en la actividad de las chaperonas. En este sentido, se ha descrito que se existe un incremento en las chaperonas DnaK como GroEL/ES en respuesta al crecimiento a pH ácido (Olson, 1993, Jan *et al.*, 2001). No obstante, no está claro si las chaperonas simplemente estarían estabilizando las proteínas desplegadas, facilitando el replegamiento una vez eliminado el estrés, o si realmente son chaperoninas que catalizan el replegamiento de las proteínas de manera activa y con dependencia de energía.

Por otro lado, con respecto al daño en el ADN, el estrés ácido puede generar reacciones químicas aberrantes que además no pueden ser reparadas por fallas en el sistema de reparación (afectados también por el estrés). En este sentido, ha sido descrito que mutantes en los sistemas de reparación del ADN alcanzan la muerte más rápido en condiciones de acidez que la cepa salvaje (Sinha, 1986). Asimismo, mutantes de *H. pylori* en *recA* también presentaron una menor capacidad de supervivencia en condiciones de acidez con respecto a su cepa parental (Thompson & Blaser, 1995). Además, cuando se utiliza ADN para transformar células se observa que el ADN purificado de células de *H. pylori* adaptadas expuestas a estrés ácido severo, es más efectivo en la transformación que las células no adaptas. Esto implica que el sistema de reparación en dichas células se encuentra menos afectado (Raja *et al.*, 1991). Por último, en un mutante resistente a la acidez de *Listeria monocytogenes* se encontró una proteína que se sobre-expresa en condiciones de acidez, la cual presenta homología con las ADN ligasas bacterianas (Booth *et al.*, 2002).

I.3.a.5. Respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez.

Como se ha descrito, se ha demostrado que las células presentan una respuesta adaptativa a varios tipos de estrés, incluyendo el estrés ácido. En esta dirección, y como se explicó previamente, es conocido desde hace tiempo que células cultivadas a pHs moderadamente ácidos que se encuentran en fase estacionaria, inducen una respuesta que las protege frente a futuras condiciones severas de acidez. Respuesta que, en este caso, se denomina respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez (ATR); dicha respuesta requiere de la síntesis proteica (Goodson, 1989, Foster & Hall, 1990, Foster & Hall, 1991, Foster, 1993, Rowbury, 1999). La ATR ha sido bien caracterizada en bacterias entéricas e incluye varios sistemas que se expresan en fase de crecimiento logarítmica y estacionaria. La clave de esta respuesta es la síntesis de proteínas capaces de

inducirse por estrés ácido, las cuales le confieren a la célula un estado fisiológico de mayor tolerancia a pHs ácidos extremos. La ATR contiene dos componentes principales. Uno involucra el conjunto de proteínas que se inducen de manera específica cuando las mismas se cultivan en un medio levemente ácido. El otro componente involucra la tolerancia otorgada por la "fase estacionaria" de las células, la cual se encuentra controlada principalmente por el factor sigma RpoS (Hengge-Aronis, 1993). Así, la ATR desencadena al menos tres sistemas de resistencia genética y fisiológicamente distintos bajo estrés ácido (Smith *et al.*, 1992, Shi & Bennett, 1994, Lin *et al.*, 1995, Lin *et al.*, 1996, Stim-Herndon *et al.*, 1996, Castanie-Cornet & Foster, 2001, Tramonti *et al.*, 2002). La única característica común a los tres sistemas es que la protección de cada una se da en células en fase estacionaria. Estos sistemas fueron denominados como sistemas de resistencia a la acidez 1, 2 y 3 (AR1, AR2 y AR3).

Sistema de resistencia a la acidez 1.

El sistema de resistencia a la acidez 1 (AR1), a veces denominado sistema oxidativo o reprimido por la glucosa, es distinto de los otros dos sistemas de respuesta adaptativa donde no hay requisitos de sustratos de aminoácidos exógenos durante la condición de estrés (ver siguiente sección). La activación de este sistema ocurre cuando las células se cultivan en medios complejos (LB) levemente ácidos (pH 5,5) en ausencia de glucosa. De esta manera, al trasladarlas luego, a una condición de estrés más severa (pH 2,5 en un medio mínimo con glucosa), las células presentan una mayor capacidad de supervivencia en estas condiciones (Castanie-Cornet & Foster, 2001). Este sistema es el menos esclarecido de los tres. Los reguladores clave incluyen al factor sigma alternativo RpoS, al AMP cíclico (AMPC) y a la proteína receptora de AMPC (CRP). El factor sigma alternativo RpoS, como ya se ha descrito, es importante para la expresión génica durante las transiciones de la fase logarítmica a la fase estacionaria y es sumamente importante para la supervivencia durante diversos estreses ambientales, incluido el desafío ácido (Hengge-Aronis, 1993, Cheville *et al.*, 1996). Los genes diana específicos de AR1 controlados por estos reguladores son desconocidos. Un posible gen diana podría incluir a *hdeA* (ver sección I.3.a.1), ya que su regulación depende de RpoS (Gajiwala & Burley, 2000). Por otro lado, existe evidencia que vincula la ATPasa translocadora de protones F₀/F₁ con AR1, pero no está claro aún si este complejo produce ATP para alimentar AR1 o es un componente del sistema para extraer protones directamente del citoplasma, como parece ser el caso en *Streptococcus spp.* (Quivey *et al.*, 2000, Martin-Galiano *et al.*, 2001). De ser así, esta ATPasa podría actuar como una bomba de protones durante el estrés ácido, extrayendo protones fuera de la célula concomitantemente con la hidrólisis de ATP y de esta manera, mantener el pH interno y generar una fuerza protón motriz (Richard & Foster, 2003, Foster, 2004).

Además del posible bombeo de protones por la ATPasa F₀/F₁, un factor importante para disminuir la permeabilidad de los protones durante el estrés ácido, puede ser la modificación en el contenido de ácidos grasos derivados del ciclopropano (CFA) de la membrana. Como se comentó previamente, la síntesis de CFA se produce durante la transición de la fase logarítmica a la fase estacionaria y depende de RpoS (Wang &

Cronan, 1994, Castanie-Cornet *et al.*, 1999). Aunque la síntesis de CFA no es el único factor involucrado en la supervivencia a pH 3, es probable que desempeñe un papel en la protección proporcionada por AR1, así como por AR2 y AR3.

Sistema de resistencia a la acidez 2.

El sistema de resistencia a la acidez 2 (AR2), es el más ampliamente estudiado de los sistemas de resistencia a la acidez en fase estacionaria. AR2 es un sistema dependiente de glutamato inducido durante la fase estacionaria. La activación del sistema ocurre cuando las células se cultivan en medios complejos (LB), que en este caso si contienen glucosa (LBG). El crecimiento en glucosa reprime a AR1, lo que permite el estudio directo de AR2. Cuando estas células adaptadas se trasladan a un medio de mínimo con glucosa y presencia de glutamato a pH 2, las mismas presentan una mayor supervivencia. Los componentes estructurales de este sistema incluyen las isozimas GadA y GadB, dos glutamato descarboxilasas, y un transportador antiporte glutamato: GABA, codificado por *gadC* (Hersh *et al.*, 1996). Los detalles de este sistema se describieron previamente en este capítulo (Sección I.3.a.3).

Sistema de resistencia a la acidez 3.

El último sistema, AR3, es dependiente de arginina y tiene componentes estructurales similares a los de AR2. AR3 involucra la arginina descarboxilasa (codificada por *adiA*) y un transportador antiporte arginina:agmatina, recientemente identificado codificado por el gen *yjdE* (Gong *et al.*, 2003). *E. coli* posee dos genes de arginina descarboxilasa, *speA* y *adiA*. Sin embargo, sólo *AdiA*, que es inducible por el estrés ácido, funciona en AR3. El pH óptimo de estas dos enzimas es pH 8,4 y 5,2 respectivamente. Cada uno de estos pHs es consistente con su función en las células no estresadas y bajo estrés ácido (Boeker, 1972). Es decir que en condiciones de estrés ácido (pH 2,5), donde el pH intracelular se encuentra entre 4 y 5, únicamente funciona *AdiA* (Richard & Foster, 2004). Dadas las similitudes de los componentes estructurales en la resistencia a la acidez dependiente de glutamato y arginina, los mecanismos por los que protegen también se consideran similares.

1.4. Simbiosis rizobio-leguminosa y la relevancia del estrés ácido.

1.4.a. La fijación biológica de nitrógeno.

El nitrógeno, a pesar de ser uno de los componentes más abundantes en la atmósfera, no es biológicamente asimilable por todos los organismos. En este sentido sólo unos pocos organismos son capaces de utilizar el nitrógeno molecular (N₂) y convertirlo en amonio, el cual es apto para ser utilizado como nutriente por el resto de los organismos. Como consecuencia, se denomina a este proceso fijación biológica de nitrógeno (FBN). Todos los organismos capaces de realizar la FBN, descriptos hasta el momento, son procariotas y se los denomina diazótrofos. La capacidad de fijar nitrógeno está determinada por la presencia

de la enzima nitrogenasa, la cual es responsable del proceso de fijación. Dicha enzima se encuentra ampliamente distribuida entre los dominios Bacteria y Arquea, no conociéndose hasta el momento ningún organismo eucariota que posea dicha actividad. Algunos microorganismos son capaces de realizar la FBN en vida libre, mientras que otros, para realizarla, deben encontrarse en asociación simbiótica con organismos superiores como las plantas (Raymond *et al.*, 2004). Esta asociación le otorga beneficios a ambos participantes, ya que la planta obtiene una fuente de nitrógeno asimilable mientras que el microorganismo adquiere de la planta fotosintatos para metabolizar. La asociación planta-microorganismo puede ser una asociación de baja especificidad como es el caso de *Azotobacter paspali* y la gramínea *Paspalum* (Dobereiner, 1970) o contrariamente, esta asociación se puede dar de manera altamente específica como es el caso de las plantas leguminosas y los rizobios. Estas últimas producen un nuevo órgano en la planta, el cual otorga el ambiente necesario para que se produzca la FBN.

I.4.b. Las leguminosas.

Las leguminosas son la tercera familia más grande de plantas superiores, conteniendo unas 20.000 especies. Asimismo, constituye la segunda familia en importancia agronómica a nivel global después de las gramíneas (Gepts *et al.*, 2005), aunque sólo una pequeña fracción del total de las especies de este grupo es explotado agronómicamente. La capacidad de establecer relaciones simbióticas con los rizobios está limitada sólo a la familia *Leguminosae* (*Fabaceae*), con una única excepción conocida presente en el género *Parasponia* de la familia *Cannabaceae* (Trinick, 1980).

En el laboratorio donde se ha realizado este trabajo de Tesis se ha estudiado desde hace muchos años la interacción rizobio-leguminosa. Donde se utiliza como planta modelo, la leguminosa *Medicago sativa* (alfalfa). La alfalfa posee un alto contenido proteico en comparación con otras leguminosas y una alta producción de materia seca y digestibilidad, por lo que posee un gran valor agronómico. En este sentido, el cultivo de alfalfa ocupa más de 32 millones de hectáreas en el mundo (Michaud *et al.*, 1988) y representa la principal fuente de forraje para alimento vacuno. En Argentina, ca. 4 millones de hectáreas son utilizadas para su producción (Perticari *et al.*, 1989, Hijano & Basigalup, 1995, <https://inta.gob.ar/noticias/segundo-congreso-mundial-de-alfalfa>). Además, se debe destacar que es una planta muy versátil, pudiéndose adaptar a un amplio rango de condiciones climáticas (Duke, 1983). Sin embargo, no soporta bien períodos de inundaciones y falla al crecer en suelos ácidos.

I.4.c. Los rizobios.

Se denomina rizobios a las bacterias capaces de realizar la FBN a través de la simbiosis con leguminosas. Los rizobios son taxonómica y fisiológicamente diversos; estos involucran a α - y β -proteobacterias y mayoritariamente comprende los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*. Como se describió previamente, la simbiosis rizobio-leguminosa tiene una marcada especificidad. En este sentido, los rizobios son capaces de realizar asociaciones con una o unas pocas especies

de leguminosas. En un principio, su clasificación se basó en el concepto de grupos de inoculación cruzada, de acuerdo al cual los rizobios fueron agrupados según su capacidad para infectar y fijar nitrógeno específicamente en un determinado grupo de leguminosas (Fred *et al.*, 1932). Más tarde, la utilización de nuevas técnicas para la clasificación de los rizobios, abarcando características morfológicas, nutricionales, metabólicas y serológicas mostró una imagen compleja sobre la diversidad de los rizobios. En la actualidad, las especies bacterianas comenzaron a ser delineadas comprensiblemente por una aproximación polifásica en niveles fenotípicos, genotípicos y filogenéticos.

Los rizobios, además de convivir en simbiosis con las plantas leguminosas, pueden sobrevivir como saprófitos por largos períodos en ausencia de las mismas (Brunel *et al.*, 1988). Esto se debe a que los mismos son habitantes del suelo que han adquirido, por transferencia horizontal de genes, la capacidad de asociarse en simbiosis con raíces de plantas leguminosas y formar nódulos radiculares fijadores de nitrógeno (MacLean *et al.*, 2007). De hecho, los genes relevantes para la infección y la fijación de nitrógeno suelen encontrarse generalmente agrupados en plásmidos (plásmidos simbióticos, pSym) o en islas genómicas (*Symbiotic Islands*, SIs) (MacLean *et al.*, 2007). Esta vida multifacética adoptada por los rizobios ha influenciado en el tamaño, la complejidad y también el contenido de sus genomas (Bentley & Parkhill, 2004, Boussau *et al.*, 2004). Los genomas rizobianos están altamente dotados con sistemas de transporte, de regulación y sistemas relacionados al estrés. Todos estos sistemas son esencialmente necesarios para la interacción con el ambiente externo y se adquirieron por las α -proteobacterias relacionadas a las plantas con posterioridad a la divergencia de *Rhizobiales* (Boussau *et al.*, 2004).

Para poder persistir en los suelos en vida libre, los rizobios probablemente deban lidiar con una amplia variedad de estreses bióticos y abióticos, entre los que se encuentran la inanición, grandes variaciones en la temperatura, estrés osmótico y variaciones en el pH. Así, los eventos de vida libre son determinantes en la competitividad y vida simbiótica del rizobio. Este hecho es bien conocido desde hace décadas y quizás el ejemplo más claro lo represente el llamado “problema de la competición”, que es la incapacidad que presentan algunos rizobios utilizados como inoculantes por su alta capacidad de fijar nitrógeno de competir con las cepas de rizobios nativas. Estos rizobios nativos, parecen encontrarse “adaptados” a esta vida libre y logran ser más competitivos por los nichos de la planta que las cepas seleccionadas, aun cuando los niveles de inóculos exceden los niveles de rizobios nativas (Triplett & Sadowsky, 1992).

1.4.d. Etapas de la Simbiosis Rizobio-leguminosa.

La simbiosis es la culminación de un proceso altamente complejo (Figura 1.4). Este proceso involucra como primer paso intercambios de señales moleculares entre la planta y la bacteria (Helal & Sauerbeck, 1989, Perret *et al.*, 2000). Luego se produce la formación de hilos de infección en los pelos radicales por donde los rizobios penetran a la raíz y culmina con la formación de los bacteroides y la organogénesis del nódulo que confiere el microambiente protector para la actividad nitrogenasa de los bacteroides. Los bacteroides son las células diferenciadas de los rizobios capaces de fijar N_2 dentro de las células de la planta (Jones *et al.*, 2007,

Oldroyd & Downie, 2008). Recientemente, se han identificado péptidos secretados por las plantas que inducen la correcta diferenciación a bacteroide (Van de Velde *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010, Haag *et al.*, 2011). Defectos tanto en la planta como en los rizobios pueden resultar en una falla en la formación del simbiosoma, impidiendo la FBN.

1.4.e. Efectos de la acidez en la simbiosis rizobio-leguminosa.

Durante la pre-infección, cuando los rizobios todavía no han ingresado aún a la raíz de la planta huésped, factores ambientales tales como la temperatura, salinidad y pH (entre otros) pueden ser condicionantes absolutos del establecimiento y desarrollo de la simbiosis. El suelo en particular, y el medio ambiente en términos más generales, deben ser considerados por lo tanto como partícipes inseparables de este proceso simbiótico. Lamentablemente, los suelos ácidos suelen ser perjudiciales para los cultivos, ya que restringe significativamente la simbiosis rizobio-leguminosa y por ende la FBN. Por un lado, esto se debe a una baja tolerancia intrínseca de la planta a tal condición, y por otro a una disminución de la supervivencia de su simbionte. Si bien el pH óptimo de crecimiento de la mayoría de las leguminosas es cercano a la neutralidad, algunas de ellas presentan buen desarrollo en condiciones de acidez moderada, por ejemplo *Lotus tenuis* tolera relativamente bien la acidez (Correa, 1997). Sin embargo, cualquiera sea el caso, se ha observado que la acidez del suelo tiene un efecto más severo sobre el crecimiento de la planta cuando el aporte de nitrógeno depende de la fijación simbiótica de nitrógeno (Bordeleau, 1994). Si se aporta nitrógeno mineral en cantidad que no limite el crecimiento, las plantas pueden desarrollarse en suelos con pHs bajos (Pijnenborg *et al.*, 1990).

1.4.f. Suelos ácidos.

Más de 1.500 millones de hectáreas de los suelos del mundo son ácidos (pH <5.5), con hasta un 40% de las tierras cultivables afectadas por la acidez del suelo (Munns D, 1986, Von Uexküll H & Mutert E, 1995). Cabe destacar que mientras muchos de esos suelos son naturalmente ácidos (en América del Sur, por ejemplo, hay unos 700 millones de ha con suelos de tipo Ultisol y Oxisol que son inherentemente ácidos), otros se han ido acidificando como consecuencia del uso inapropiado de algunos sistemas de agricultura intensiva (von Uexküll & Mutert, 1995). En este sentido, el bajo pH del suelo es causado a menudo por ciclos deficientes de nutrientes, por la lixiviación del suelo y/o por el efecto acidificante de los fertilizantes nitrogenados (Martikainen P, 1993, Von Uexküll H & Mutert E, 1995). Esta acidificación de los suelos es responsables de pérdidas de rendimiento del 50% o más en cultivos de trigo y cebada, así como cultivos de leguminosas, como lentejas, porotos y arvejas (Mahler, 1987, Graham, 1992, Bordeleau, 1994, Vassileva & B, 1997). Esta apreciación realza la importancia evidente del manejo racional del recurso suelo, prestando particular atención además a la evolución del pH de los mismos.

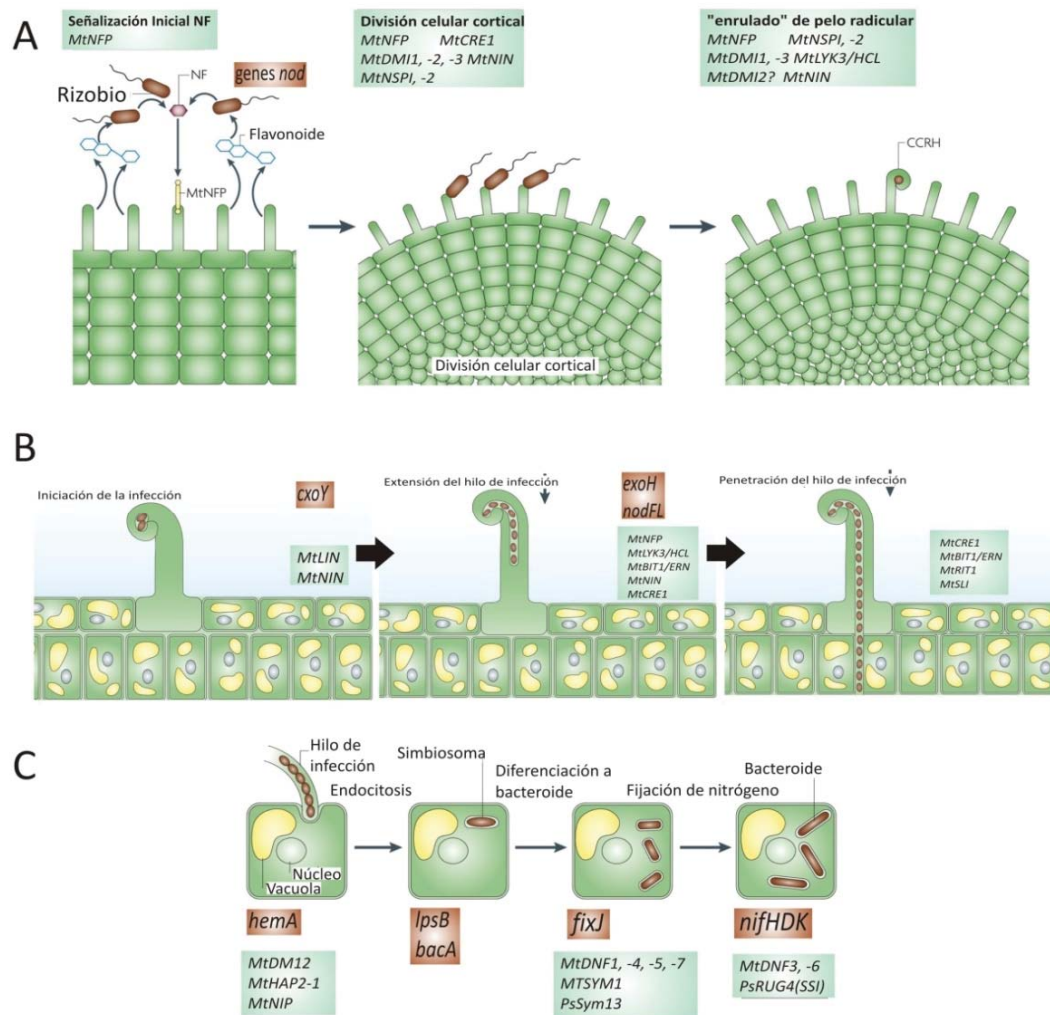


Figura 1.4. Etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa. A. Etapas tempranas de la interacción rizobio-leguminosa. Los flavonoides liberados por la planta son detectados por los rizobios y éstos sintetizan factores de nodulación (*nod factors*, NF). Luego, los NF son detectados por receptores de la planta y estimulan la formación del enrulado radicular y la división de las células corticales que darán origen al primordio nodular. B. Desarrollo y progresión del hilo de infección. Luego que los rizobios son atrapados por el enrulado radicular, comienza la infección de rizobios mediante el desarrollo de hilos de infección en respuesta a los factores Nod y EPS bacterianos. Los hilos de infección son direccionados hacia las células del córtex donde los rizobios son liberados en respuesta a citoquinas. C. Endocitosis de bacterias y diferenciación a bacteroide. Las bacterias, una vez que son liberadas forman un simbiosoma, donde se diferencian en bacteroides. Adaptado de Jones *et al.* 2007.

1.4.g. Estudio de la tolerancia a la acidez en los rizobios.

La supervivencia y persistencia de los rizobios se encuentran limitadas en condiciones de pH ácido. Así como también, se ve reducida la eficiencia en la nodulación (Graham, 1982, Brockwell, 1991, Ibekwe, 1997). Los rizobios se enfrentan comúnmente a valores de pHs bajos, como por ejemplo en el rizoplano de sus plantas leguminosas hospedadoras. El rizoplano presenta una disminución de pH por la presencia de protones y ácidos orgánicos excretados por las plantas (Marschner, 2006). Además, ha sido postulado que una vez establecida la simbiosis, el simbiosoma forma un compartimiento ácido y lítico (Mellor, 1989). Pierre *et al.* (2013) estudiaron la variación del pH a lo largo de la simbiosis *in vivo* del espacio que rodea al bacteroide

(peribacteroidal, PBS) y mostraron una acidificación progresiva del PBS desde la liberación de bacteroides hasta el inicio de la fijación de N₂.

Distintos grupos de investigación han intentado identificar cepas tolerantes a la acidez (Graham, 1982, Del Papa *et al.*, 1999, Priefer *et al.*, 2001) y revelar los mecanismos genéticos que permiten a una cepa superar a las otras cepas bajo pHs ácidos. Sin embargo, hasta la actualidad las bases de la tolerancia a la acidez en los rizobios no han sido totalmente dilucidadas. La tolerancia a la acidez ha sido considerada una característica fenotípica clave en los rizobios, por lo que se ha buscado activamente rizobios que puedan desarrollar la FBN cuando otras no lo pueden hacer por las condiciones ambientales desfavorables (Howieson *et al.*, 1988). La mayoría de los estudios que se han realizado para dilucidar genes involucrados en la respuesta a la acidez, se realizaron sobre *E. medicae* WSM 419 (anteriormente clasificada como *S. meliloti* WSM 419). Uno de los enfoques más utilizados a fin de identificar componentes de rizobios asociados a la respuesta al estrés ácido, ha sido la búsqueda de mutantes que resulten sensibles a la acidez a través del uso de bibliotecas de mutantes Tn5 (Goss *et al.*, 1990, Reeve *et al.*, 1999). De este modo, se identificó un grupo de genes funcionalmente diverso que responde al pH, relacionados con la tolerancia a la acidez en *E. medicae* (Tiwari *et al.*, 2004). Ejemplo de estos son *actP*, que codifica para una ATPasa transportadoras de metales pesados CPx (Reeve *et al.*, 2002), *actA*, que codifica para una acyl apoliporoteína transferasa (Tiwari *et al.*, 1996) y *actR*, el cual codifica para una proteína descrita por ser requerida en la tolerancia a la acidez (Tiwari *et al.*, 1996). En este sentido, se evidenció que ActR es un regulador de respuesta y es activado por su correspondiente sensor histidin kinasa ActS, cuya pérdida también conlleva una baja sensibilidad al pH (Tiwari *et al.*, 1996). Dentro de los posibles blancos de ActR, se encuentran el gen *cbbS*, involucrado en la fijación de CO₂ y el gen *narB*, involucrado en la asimilación de nitrato, así como también genes reguladores de la fijación de nitrógeno *fixK* y *nifA* (Fenner *et al.*, 2004). Junto con los genes requeridos para la tolerancia a la acidez, también se identificaron varios genes sobre-expresados en estas condiciones en *E. medicae* (Dilworth *et al.*, 2001, Tiwari *et al.*, 2004). Entre estos genes se encuentra *lpiA*, un gen involucrado en la tolerancia a la acidez adaptativa (ATR). Asimismo, en *Rhizobium tropici*, la bacteria simbiote de *Phaseolus vulgaris*, también se encontraron sobre-expresados estos genes en condiciones de estrés ácido y se evidenció, además, que eran necesarios para un incremento en competitividad en la nodulación (Vinuesa *et al.*, 2003). El conjunto de estos resultados puso en evidencia la complejidad de la respuesta al estrés ácido siendo al parecer una respuesta multigénica, y se aleja de la idea de que unos pocos genes puntuales serían los responsables de dicha y respuesta.

Hellweg *et al.* (2009) realizaron un estudio utilizando un enfoque transcriptómico de *E. meliloti* frente a un cambio de pH ácido en el transcurso del tiempo. Cabe destacar que *E. meliloti* es una de las especies con una mayor sensibilidad al estrés ácido (Burton, 1972, Graham, 1992, Graham *et al.*, 1994). El estudio demostró la complejidad de la respuesta celular de *E. meliloti* en la adaptación a nuevas condiciones medioambientales. Los mecanismos de la célula para afrontar las condiciones de acidez son una mezcla de

varias reacciones distintas, las cuales siguen un orden temporal particular. De manera adicional, este análisis reveló que dentro de los primeros 20 minutos de la exposición al pH ácido, las células parecen realizar los principales cambios necesarios a nivel transcripcional para adaptarse a las nuevas circunstancias ambientales. En este sentido, la respuesta inmediata de *E. meliloti* a bajo pH parece principalmente estar vinculada a la modificación de superficie celular. La compleja respuesta en *E. meliloti*, incluye genes que se encuentran asociados con varias funciones celulares como biosíntesis de exopolisacárido (EPS), ya que se encontraron sobre-expresados varios genes relacionados a este metabolismo. En paralelo se evidenció una menor expresión en genes de la movilidad y genes involucrados en quimiotaxis. Por otro parte, dicho autores resaltaron que los mecanismos identificados en *E. coli* y otras bacterias, como la descarboxilación de aminoácidos no fueron identificados en *E. meliloti* (Hellweg *et al.*, 2009).

Recientemente, Draghi *et al.* (2016) presentaron un análisis integrado de la respuesta proteómica, transcriptómica y metabólica de *E. meliloti* bajo condiciones de estrés ácido en un quimiostato. Este trabajo mostró principalmente alteraciones en proteínas y genes asociados con la superficie bacteriana, el metabolismo central de carbono, la respiración y la cantidad de EPS secretado. De manera concordante con estos resultados y los de Hellweg *et al.* (2009) se encontraron resultados similares en *Agrobacterium tumefaciens*, el cual presentó también, a través de un análisis transcriptómico, una inducción de los genes *exo* y una disminución en la expresión de los genes de movilidad (Yuan *et al.*, 2008).

Otro estudio realizado a partir de un mutante en *rpoH* (factor sigma relacionado al estrés térmico) en *E. meliloti*, reveló que dicho gen juega un rol importante en la respuesta a la respuesta al estrés a pH ácido. A través del análisis transcriptómico utilizando *microarrays* se clasificaron tres grupos de genes de respuesta a acidez: los regulados de manera dependiente de RpoH, los independientes de RpoH y los regulados de manera compleja. Entre los genes que mostraron una regulación dependiente de RpoH, hubo varios genes codificantes para proteína de estrés térmico y chaperonas (de Lucena *et al.*, 2010).

Contrario a los resultados descriptos anteriormente, *Mesorhizobium loti* no presenta la misma correlación entre la producción de EPS I y la tolerancia a la acidez como en los casos anteriores (Correa, 1997, Laranjo *et al.*, 2014). En este sentido, Laranjo *et al.* (2014) mediante un análisis transcriptómico, evidenciaron que *M. loti* no presentó cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de EPS I, en la movilidad y quimiotaxis en condiciones de acidez. En este mismo trabajo, se encontraron varios genes, codificantes de transportadores del tipo ABC de la membrana externa y otras proteínas de la envoltura celular, sobre-expresados en acidez. Donde los autores sugieren que dichos transportadores probablemente contribuyan a mantener el pH interno de la célula. También evidenciaron varios genes que codifican para reguladores transcripcionales de la familia MarR y TetR. Estos reguladores están descriptos por controlar la expresión de genes que codifican para bombas de eflujo (Grkovic *et al.*, 2002).

Por otro lado, en relación a la membrana citoplasmática como barrera, se ha demostrado que cepas de *R. leguminosarum* bv *trifolii* sensibles a pH bajos tienen una membrana más permeable a los protones, y en

algunos casos también una menor actividad de expulsión de protones, que las cepas tolerantes (Chen *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha observado que rizobios cultivados en condiciones ácidas tienen niveles citoplásmicos superiores de glutamato y K^+ , acompañados de alteraciones en los niveles de poliaminas, de manera similar a lo que ocurre en situaciones de estrés osmótico (Graham, 1992, Fujihara & Yoneyama, 1993).

Por último, cabe destacar que, como hemos mencionado para el caso de enterobacterias, ciertos rizobios también han demostrado poseer una ATR. Rizobios expuestos a condiciones de acidez moderada mostraron ser más resistentes luego a un estrés ácido severo frente a las células que sólo fueron previamente expuestas a pH neutro (O'Hara & Glenn, 1994, Dilworth *et al.*, 1999). Dentro de los rizobios que han demostrado ser capaces de expresar una ATR, se incluyen *E. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. tropici* y diferentes bradyrizobios. Se ha observado, además, que al menos en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, no todas las cepas analizadas son capaces de expresar una ATR detectable (Watkin, 2003, Draghi *et al.*, 2010).

En síntesis, ha quedado ampliamente demostrado que la tolerancia a la acidez es la resultante de la contribución de un número importante de productos génicos donde ninguno *per se* modifica de modo drástico el fenotipo de tolerancia a la acidez. Se ha puesto de manifiesto que la tolerancia de los rizobios a la acidez es variada y depende de la especie e incluso de la cepa analizada. En este sentido, la respuesta fisiológica de los rizobios a la acidez también puede ser muy variada. Es decir, un pH lo suficientemente bajo puede conducir a los rizobios a la muerte, detener su metabolismo, o generar cambios mucho más moderados dependiendo del nivel de acidez. Un ejemplo particular de esto es *R. leguminosarum*, en el cual se ha descrito que a pH 5,0 se produce una pérdida en la movilidad pero no se encuentra afectado el crecimiento (Glenn & Dilworth, 1994).

1.5. *Rhizobium favelukesii*.

Hace algunos años, muchos estudios se centraron en el aislamiento y caracterización de rizobios noduladores de alfalfa en condiciones de acidez. Donde dichos estudios se realizaron a través del análisis de las poblaciones de rizobios presentes en nódulos de alfalfa cultivada en suelos ácidos. Estos estudios revelaron principalmente la presencia de dos poblaciones con marcadas diferencias con respecto a sus propiedades simbióticas y de tolerancia a la acidez (Barber, 1980, Eardly *et al.*, 1985, Del Papa *et al.*, 1999). Una de estas poblaciones se encuentra representada por *E. meliloti* quien es conocido por ser el simbiote eficiente de alfalfa. Mientras que la otra población se encontró representada por las cepas *Rhizobium* sp. Or191 y *Rhizobium* sp. LPU83 (Eardly *et al.*, 1985, Del Papa *et al.*, 1999). Ambas cepas en ese momento se conocían como rizobios tipo Oregon, por el origen donde la primera cepa fue identificada. En este sentido, se encontró que este tipo de rizobios está distribuido en varios lugares del planeta, entre los que se encuentran EE.UU., Canadá, Uruguay, Argentina, Francia, entre otros (Eardly *et al.*, 1985, Del Papa *et al.*,

1999, Bromfield *et al.*, 2001, Laguerre *et al.*, 2006). Recientemente, ha sido demostrado en nuestro laboratorio, que estos rizobios pertenecen a una nueva especie denominada *Rhizobium favelukesii* (Torres Tejerizo *et al.*, 2016). Dichos rizobios se encuentran representados por la cepa LPU83 aislada de suelos del centro de Argentina (Del Papa *et al.*, 1999).

Del papa *et al.* (1999) demostraron que el aislamiento de *R. favelukesii* LPU83, aislado de un suelo con pH aproximado a 6 de Castelar (Buenos Aires, Argentina), tenía un crecimiento similar en una rango de pH entre 5,0 y 7,0. Mientras que la cepa *E. meliloti* 2011, no fue capaz de crecer a un pH de 5,5, decayendo su viabilidad en valores por debajo de este pH. También se ha descripto que estos rizobios poseen un amplio rango de hospedadores, ya que son capaces de nodular, *M. sativa*, *Phaseolus vulgaris* (poroto) (Eardly *et al.*, 1985) y *Leucaena leucocephala* (Del Papa *et al.*, 1999), entre otras (Wegener *et al.*, 2001). Sin embargo, las hojas de las plantas inoculadas con este rizobio, se tornan amarillas, mientras que los nódulos producidos son principalmente blancos (Wegener *et al.*, 2001). Además, ensayos donde se determina la tasa de fijación de nitrógeno han mostrado que *R. favelukesii* LPU83 es ineficiente en la FBN (Wegener *et al.*, 2001). Sin embargo, *R. favelukesii* resulta muy competitivo para la nodulación de alfalfa en suelos ácidos. Se ha evidenciado que estos rizobios presentan una alta competitividad para la nodulación en condiciones de acidez (pH 5,6) en comparación con la cepa eficiente, *E. meliloti*. Hecho que no sucede en condiciones de neutralidad donde se invierte y el simbiote eficiente presenta una mayor competitividad (Wegener *et al.*, 2001, Del Papa *et al.*, 2003). Todas estas características señalan a este grupo de rizobios como un potencial factor de riesgo en los suelos agrícolas en los que coexisten y compiten con *E. meliloti*. No obstante, *R. favelukesii* constituye una valiosa fuente de información en sus mecanismos de tolerancia a la acidez y elevada competitividad.

R. favelukesii LPU83, posee un genoma compuesto por un cromosoma de 4,19 Mpb y 4 plásmidos. El plásmido pLPU83a, es el más pequeño, y tiene un tamaño de 151 Kpb, luego le sigue el plásmido pLPU83b, plásmido simbiótico, que posee un tamaño cercano a 531 Kpb (no cerrado por completo). El siguiente es el plásmido pLPU83c, con un tamaño de 760 Kpb y por último, el plásmido pLPU83d que posee un tamaño de 1,9 Mpb (Wibberg *et al.*, 2014). Los genes contenidos en este último plásmido revelan que este puede considerarse como un crómido (Harrison *et al.*, 2010), el cual comparte características cromosomales y plasmídicas. A su vez, los plásmidos pLPU83a y pLPU83c representan plásmidos accesorios (Wibberg *et al.*, 2014). Por otra parte, al analizar el genoma de *R. favelukesii*, se observa una cercana relación entre los genes simbióticos de *E. meliloti* y la cepa *R. favelukesii* LPU83 (Laguerre *et al.*, 2001, Del Papa *et al.*, 2007) y una alta similitud genética del arreglo de los genes de nodulación (Torres Tejerizo *et al.*, 2011). Sin embargo, si se analizan secuencias de ADN cromosomal como ADN_r 16S y otros marcadores cromosomales como *dnaK*, *glnA*, *gltA*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *thrC*, se encuentran cerca de *R. etli* y *R. leguminosarum* (Laguerre *et al.*, 2001, Torres Tejerizo *et al.*, 2011). De este modo, *R. favelukesii* posiblemente represente un mosaico genético.

1.6. Técnicas ómicas.

Las técnicas ómicas involucran a un gran número técnicas que estudian determinados parámetros en escala masiva, de manera de caracterizar y/o cuantificar un gran número de moléculas biológicas que se traducen en la estructura, función y dinámica de un organismo. Ejemplo de estas técnicas incluyen a la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, por nombrar algunas. Esta sección se enfoca en describir las dos técnicas que se utilizaron en este trabajo de Tesis para dilucidar los mecanismos de tolerancia a la acidez en *R. favelukesii*.

1.6.a. Transcriptómica.

La identificación y cuantificación de la expresión génica han sido actividades centrales en la biología molecular desde el descubrimiento del rol del ARN como intermediario clave entre el genoma y el proteoma. En la actualidad, la totalidad de transcritos presentes en una célula pueden ser identificados y cuantificados simultáneamente y de manera masiva. El transcriptoma es el conjunto de transcritos completo de una célula para una determinada condición o estado fisiológico. De este modo, entender el mismo resulta esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar determinantes moleculares relevantes para la célula en una determinada condición.

Grandes esfuerzos han sido puestos en el desarrollo de tecnologías para deducir e identificar los transcriptomas. Hasta hace un tiempo, el enfoque más ampliamente utilizado se basaba en la hibridación por medio de *microarrays*, ya sea a través de sondas marcadas de ADNc u oligonucleótidos. Sin embargo, estos métodos presentan varias limitaciones. Una de ella es que se debe tener información confiable de la secuencia genómica. Por otro lado, estas técnicas tienen elevado error debido a la hibridación cruzada (Okoniewski & Miller, 2006, Royce *et al.*, 2007) y además, poseen un rango dinámico limitado de detección debido al fondo y la saturación de las señales. Sumado a esto, la comparación de los niveles de expresión a través de diferentes experimentos es dificultosa y, por lo tanto, puede requerir métodos de normalización complicados.

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento de ADN, se abrieron nuevas posibilidades para el desarrollo de técnicas transcriptómicas. En este sentido, un nuevo método ha sido desarrollado para mapear y cuantificar transcriptomas, denominado RNA-Seq (RNA sequencing). Esta tecnología presenta claras ventajas sobre las ya existentes. Por un lado, el RNA-Seq, a diferencia de los *microarrays*, no se limita a detectar sólo transcritos que corresponden a secuencias genómicas existentes. Asimismo, esta técnica puede revelar la localización precisa de los límites de transcripción, con resolución de una base. Por otro parte, presenta poca señal de ruido debido a que las secuencias son mapeadas sin ambigüedades a una región del genoma, y además no posee límites superiores en el nivel de cuantificación, a diferencia de los *microarrays* que carecen de sensibilidad para genes que se expresan en niveles bajos o muy altos. Una característica destacable además, es que los resultados obtenidos del RNA-Seq son altamente

reproducibles, tanto para replicas técnicas como biológicas (Cloonan *et al.*, 2008, Nagalakshmi *et al.*, 2008). Por último, el RNA-Seq tiene la capacidad de determinar la cantidad absoluta de cada molécula en una población celular, y comparar los resultados entre distintos experimentos. Dentro de los objetivos claves de la transcriptómica se encuentra el de catalogar todas las especies de transcritos, incluyendo ARNm, ARN no codificantes y ARN pequeños; así como también determinar la estructura transcripcional de los genes (sitios de inicio de la transcripción, extremos 3' y 5', etc.) y además cuantificar cambios en los niveles de expresión de cada transcripto durante el desarrollo o bajo ciertas condiciones celulares.

Un experimento usual de RNA-Seq comienza a partir de la población de ARN, la cual puede ser total o parcial (por ejemplo, sólo ARN mensajeros), la fragmentación del ARN y la posterior realización de una biblioteca con fragmentos de ADNc a los que se le añaden adaptadores en cada uno de sus extremos (Figura I.6). Cada molécula es luego secuenciada a través de una secuenciación de alto rendimiento, de manera de obtener lecturas cortas desde uno (*single-end sequencing*) o desde ambos extremos (*pair-end sequencing*), cualquier tecnología de secuenciación de alto rendimiento puede ser utilizada (Holt & Jones, 2008). El largo típico de las lecturas que se obtienen están entre 30 y 400 pb. Un punto relevante del protocolo que se debe considerar es el ARN de partida, ya que depende de qué tipo de pregunta se quiera responder es el tipo de ARN que se debe utilizar. Si se quieren estudiar los cambios en los niveles de expresión en determinadas condiciones, se debe obtener la fracción de ARNm totales presentes en la célula. Hecho que se dificulta por la proporción en la que estos están representados frente a la cantidad de ARNr que existe en la célula. Esta dificultad se ha sobrellevado, en el caso de células eucariotas por sustracción de los ARNm basados en la complementariedad con las secuencias poli(A) de los mismos (Mortazavi *et al.*, 2008), sin embargo en las células procariotas esto no es posible. En este caso, se realiza una sustracción del ARNr, a través de sondas que hibridan con ARN de esta naturaleza (RiboZero Illumina Inc, Figura I.6).

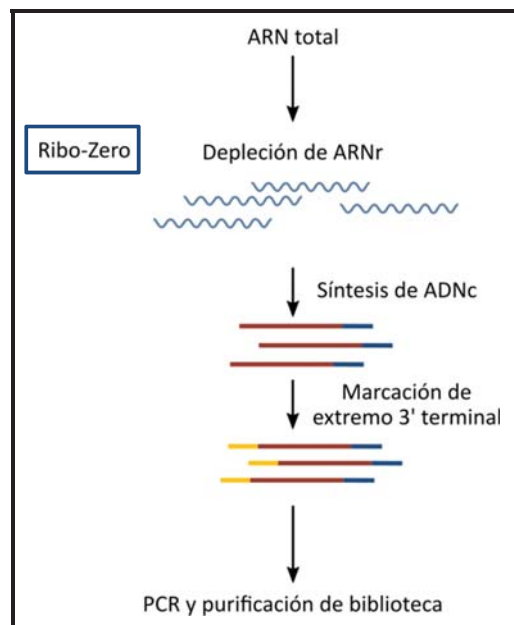


Figura.I.5. Flujo de trabajo en un experimento de RNA-Seq donde la muestra de partida proviene de células procariotas. Adaptado de Illumina Inc.

Existe una serie de factores importantes que se deben tener en cuenta para obtener resultados adecuados a través de RNA-Seq. Uno de ellos es la profundidad de la secuenciación o el tamaño de las bibliotecas, que indican el número de lecturas secuenciadas para una muestra dada. Cuanto mayor sea la profundidad de la secuenciación, se podrán detectar más transcritos (Mortazavi *et al.*, 2008). Sin embargo, la profundidad óptima de secuenciación depende de los objetivos del experimento y de la complejidad del transcriptoma a estudiar. Los experimentos sugieren que la profundidad en la secuenciación mejora la cuantificación e identificación pero también, un aumento excesivo puede resultar en la aparición de artefactos (Tarazona *et al.*, 2011). Otro factor que se debe tener en cuenta es el número de réplicas requeridas, el cual depende, en parte, de la variabilidad en las medidas. En este sentido, a pesar de la alta reproducibilidad del RNA-Seq, otras etapas como la obtención de la muestra, pueden introducir variabilidad en los resultados.

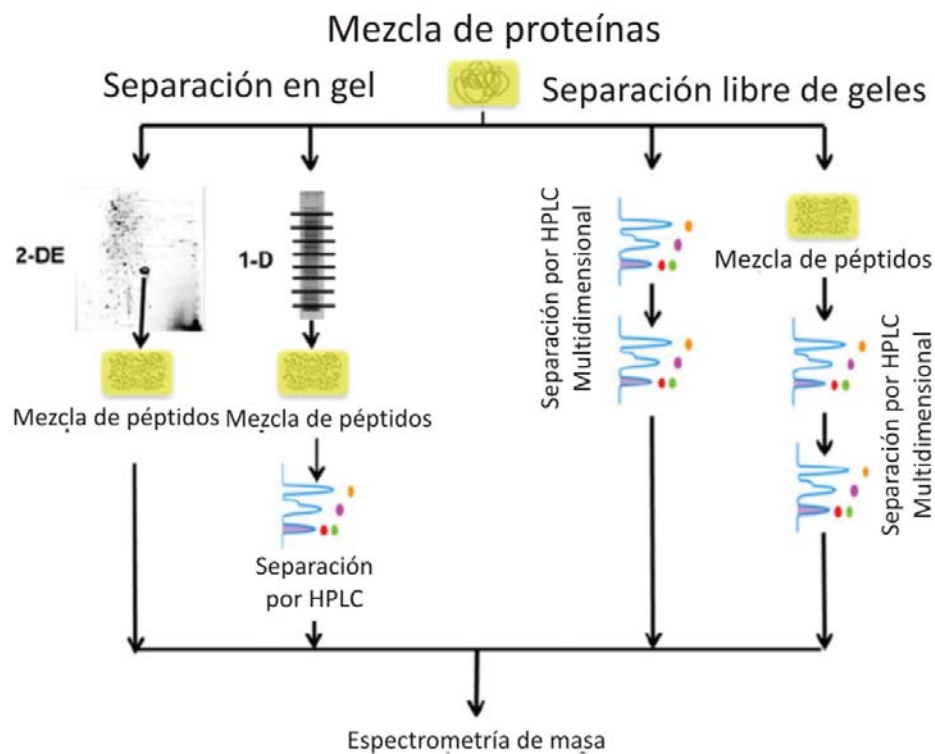


Figura.I. 6. Flujo de trabajo de un experimento proteómico típico. Primero, las proteínas se extraen de una muestra y luego se someten a un fraccionamiento antes de ser digeridas enzimáticamente en una mezcla de péptidos e identificadas por espectrometría de masas. Esta reducción en la complejidad puede ser mediante el uso de métodos de separación basados en gel, como la electroforesis en gel bidimensional (2-DE) o geLC, o utilizando cromatografías HPLC, antes de la identificación por espectrometría de masas.

1.6.b. Proteómica.

El término proteoma fue creado en 1998 por Marc Wilkins para indicar todas las proteínas que son simultáneamente producidas por una célula o tejido en un momento y condición específicos (Anderson & Anderson, 1998, Wilkins, 2009). Las proteínas presentan una inmensa diversidad con respecto a su tamaño, propiedades y modificaciones postraduccionales. Por ende, la complejidad de los proteomas es superior a la de los genomas o transcriptomas. Además, dada la habilidad que poseen las células de adaptarse rápidamente a cambios en el ambiente, su composición proteica resulta altamente dinámica. A través del

uso de técnicas proteómicas se pretenden revelar características particulares en el sistema celular, que incluyen, la identificación de proteínas (subcelulares), cambios en la abundancia de las proteínas, así como también su maduración, modificaciones postraduccionales y degradación de las mismas en respuesta a una determinada condición.

Los métodos clásicos de cuantificación proteómica, que involucran colorantes, fluoróforos o radioactividad, presentan una buena sensibilidad, linealidad y rango dinámico. Sin embargo, tienen varias desventajas. Entre las que se encuentra el poder de resolución de las técnicas utilizadas en la separación de las muestras de proteínas. En este sentido, la misma se realiza a través de geles bidimensionales de poliacrilamida (2D-PAGE), por lo que la separación queda limitada a la abundancia y solubilidad de la proteína, además de que el pI de la misma entre dentro del rango utilizado para el isoelectroenfoque. Además, esta técnica no permite la identificación de cada una de las proteínas separadas. Por lo que, una vez obtenida la separación de las proteínas se debe proceder a identificar de manera individual cada spot (posible proteína) utilizando la técnica de espectrometría de masas, MALDI-TOF MS.

Junto con el desarrollo en la secuenciación genómica, recientemente se han producido grandes avances en las técnicas proteómicas de alto rendimiento libre de geles, haciendo uso también de la espectrometría de masas. La mejora en los sistemas de secuenciación, trajo aparejado un aumento significativo en el número de genomas secuenciados disponibles públicamente. Esta información resulta crucial para la interpretación de los espectros MS y la subsiguiente identificación proteica. De manera reversible los resultados proteómicos ayudan a mejorar las anotaciones realizadas *in silico* (Armengaud, 2013). Sin embargo, el progreso más significativo en la proteómica ha sido conducido por el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas en la separación de los péptidos y/o proteínas, en el análisis de espectrometría de masas y en el marcaje con isótopos para la cuantificación, y por último en la bioinformática que permite realizar el análisis de datos. De este modo, la espectrometría de masas ha emergido como una herramienta central para el análisis de proteínas a gran escala. Estos análisis permiten identificar y cuantificar la mayoría de las proteínas presentes en una muestra compleja y representan una valiosa herramienta para avanzar en el entendimiento de la biología y fisiología celular.

Cuando un análisis de caracterización de proteínas se realiza a partir del análisis de los péptidos liberados por proteólisis de una proteína, se denomina "*bottom-up*". Si además este análisis se realiza a partir de una mezcla conteniendo varias proteínas se denomina *shotgun proteomics* (Link *et al.*, 1999, Wolters *et al.*, 2001). El nombre proviene de su semejanza con la técnica de secuenciación, *shotgun genomics* (Yates, 1998). La técnica *shotgun proteomics* brinda una medida indirecta de la cantidad de proteína presente en la muestra a partir de los péptidos obtenidos por digestión proteolítica de las proteínas intactas. Un experimento típico de este tipo de análisis proteómico consiste de varias etapas (Figura I.7). El primer paso corresponde a la preparación de la muestra, donde se debe realizar una purificación de las proteínas a partir del lisado celular. Luego, existen diversas opciones dependiendo del tipo y complejidad de la muestra. Una posibilidad es

realizar una separación de la mezcla compleja de proteínas intactas usando técnicas de cromatografía o electroforesis y, posteriormente, cada fracción obtenida puede ser directamente analizada a través de espectrometría de masas (enfoque *top-down*). Sin embargo, esta posibilidad, no es la más utilizada. La otra posibilidad, está definida por el enfoque *bottom-up*, donde las proteínas son primero digeridas y luego la mezcla de péptidos obtenida se somete a una separación cromatográfica de manera de disminuir la complejidad de la muestra, para luego sí realizar la espectrometría de masas (enfoque *shotgun*). Cabe destacar que una posibilidad alternativa a esta última, abarca a las técnicas proteómicas realizadas a través de geles bidimensionales, los cuales también se basan en el enfoque *bottom-up* para su identificación pero a través de una única proteína a la vez (Figura I.7).

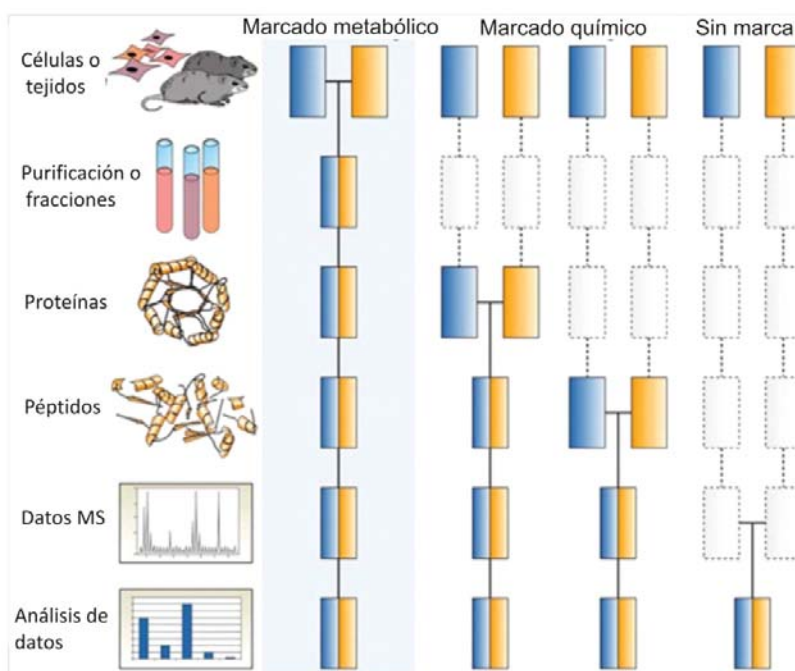


Figura.I.7. Flujos de trabajo más frecuentes de espectrometría de masas cuantitativos. Los recuadros en azul y amarillo representan dos condiciones experimentales. Las líneas horizontales indican cuándo se combinan las muestras. Las líneas discontinuas indican los puntos en los que pueden ocurrir variaciones experimentales y, por lo tanto, errores de cuantificación. Adaptado de Bantscheff *et al.*, 2007.

Considerando el enfoque *shotgun*, la cuantificación de las proteínas puede ser realizada de diversas maneras y dependiendo cual se elija, el protocolo se verá modificado en distintas formas. Uno de las opciones utiliza marcadores isotópicos ya que el espectrómetro de masas es capaz de reconocer la diferencia de masas entre los péptidos marcados de los no marcados. En este caso la cuantificación se obtiene por comparación de la intensidad de señal respectiva. Los marcadores isotópicos pueden introducirse como patrones internos en los aminoácidos. Existen 3 formas posibles de introducirlos: metabólicamente, químicamente o enzimáticamente (Figura I.7) o, como alternativa, utilizarlos como un estándar externo utilizando péptidos sintéticos enriquecidos (Ong & Mann, 2005).

Recientemente, ha surgido una estrategia alternativa que cada vez cobra más fuerza, denominada *label free quantification*. Esta técnica permite realizar la cuantificación sin agregado de ningún tipo de marcaje

(Figura I.7). En este sentido, han sido descritos varios métodos de cuantificación. Un método se basa en la comparación directa de la intensidad de señal del espectro obtenido para cualquier péptido dado o por el área bajo la curva de los picos obtenidos en la cromatografía (AUC, *area under the curve*), y otro método utiliza el número de espectros adquiridos para un péptido/proteína como indicador de su respectiva abundancia en una mezcla dada (Figura I.8) (Neilson *et al.*, 2011). Más allá de estos dos tipos de cuantificación, hoy en día existen otras aproximaciones donde se toman en cuenta distintos parámetros además de estas dos. En este sentido, estos métodos novedosos y recientes hacen uso de complejos algoritmos matemáticos pero gracias a la bioinformática resultan de fácil aplicación (Cox *et al.*, 2014).

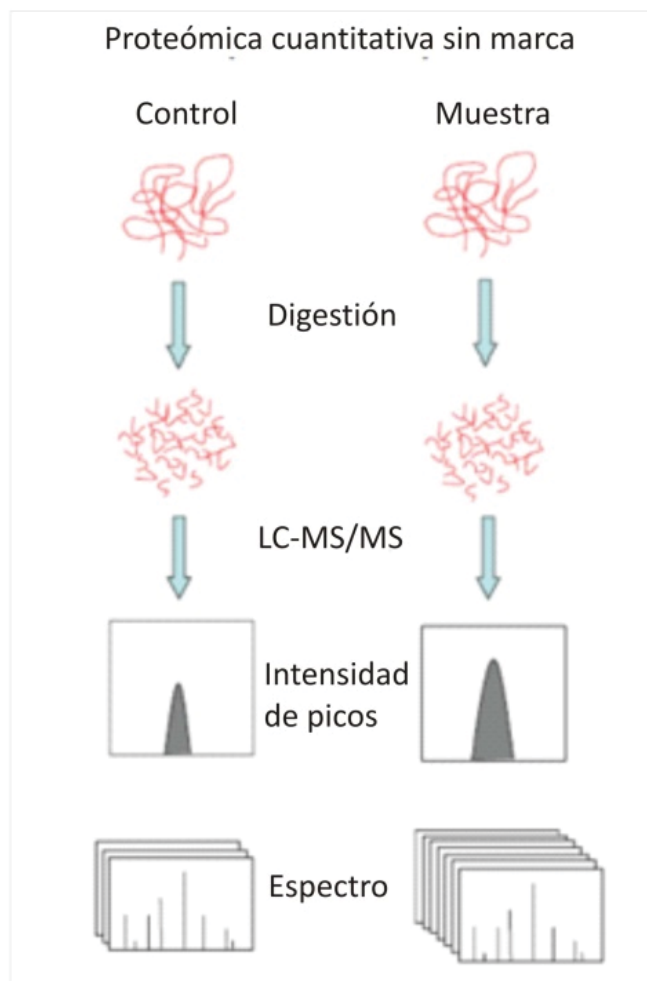


Figura.I.8. Esquema representativo del método de cuantificación label-free. Cuantificación de proteínas a partir de la intensidad de señal del espectro obtenido para cualquier péptido o a partir del conteo de espectros obtenidos para un péptido/proteína.

I.7. Objetivos

I.7.a. Consideraciones generales.

La alfalfa es una leguminosa forrajera de gran relevancia para la alimentación animal. Su asociación simbiótica con el rizobio eficiente, *Ensifer meliloti*, se ve afectada en suelos ácidos. Hace algunos años se aislaron de suelos del centro de Argentina, un grupo de rizobios recientemente denominados *Rhizobium favelukesii*, tolerantes a la acidez, muy competitivos para la nodulación de alfalfa, pero ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Estas características lo posicionan como un rizobio más parasítico que simbiótico, y lo convierte en un potencial factor de riesgo al competir con el rizobio eficiente, *E. meliloti*. Con el objetivo de maximizar la producción agrícola, es importante optimizar los inoculantes biológicos. En este contexto, la adaptación de los rizobios a los suelos ácidos y los mecanismos por los cuáles esta adaptación es posible, resultan relevantes tanto desde el punto de vista biotecnológico como agronómico.

I.7.b. Objetivo general.

Caracterizar los mecanismos moleculares de la tolerancia a la acidez de *Rhizobium favelukesii* LPU83.

I.7.c. Objetivos específicos.

1. *Caracterización fenotípica de la tolerancia a la acidez de R. favelukesii* LPU83, establecimiento de la condición de *stress ácido* para esta cepa.
2. *Determinación de los cambios moleculares ante el stress ácido mediante transcriptómica y proteómica: identificación de marcadores moleculares.*
3. *Evaluación del rol de los marcadores de la tolerancia a la acidez de R. favelukesii en vida libre.*

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Técnicas microbiológicas.

II.1.a. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características más relevantes se muestran en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Cepas Bacterianas utilizadas en el Presente Trabajo.

Cepas	Propiedades	Referencias
<i>Ensifer meliloti</i>		
2011	Sm ^r , Nod ⁺ Fix ⁺ en alfalfa	J. Dénarié, France
<i>Rhizobium favelukesii</i>		
LPU83	Sm ^r , Nod ⁺ Fix ^{+/−} en alfalfa	Del Papa <i>et al.</i> , 1999
LPU83-H	LPU83 <i>nodH</i> ::pGnod83. Str ^r Gm ^r	Del Papa <i>et al.</i> , 2007
LPU83-pLPU83a_0021 [−]	Mutante derivado de LPU83 con el vector pK18mob insertado en pLPU83a_0021. Sr ^r Km ^r	Este trabajo
LPU83- <i>livK</i> [−]	Mutante derivado de LPU83 con el vector pK18mob insertado en <i>livK</i> . Sr ^r Km ^r	Este trabajo
LPU83- <i>braD</i> [−]	Mutante derivado de LPU83 con el vector pK18mob insertado en <i>braD</i> . Sr ^r Km ^r	Este trabajo
LPU83-2016 [−]	Mutante derivado de LPU83 con el vector pK18mob insertado en LPU83_2016. Sr ^r Km ^r	Este trabajo
LPU83-pSym [−]	LPU83 curada de su plásmido simbiótico	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , F80 <i>dlac</i> ZDM15	Bathesda Res. Lab.
S17-1	RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	Simon <i>et al.</i> , 1983
HB101	<i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>endA</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> ,	Boyer & Roulland- Dussoix, 1969

II.1.b. Plásmidos utilizados en este trabajo

Los plásmidos utilizados en este trabajo y sus características más importantes se muestran en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Propiedades	Referencias
pK18mob	Vector de clonado de alto número de copias, <i>mob</i> , Km ^r .	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pUC19mob	Vector de clonado de alto número de copias, Ap ^R	Tesis Doctoral C. Martini
pCR®2.1-Topo®	Vector de clonado de alto número de copias, Km ^R	ThermoFisher Scientific

II.1.c. Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.

II.1.c.1. Medios de cultivo.

Los cultivos de las bacterias de los géneros *Ensifer* y *Rhizobium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY o YEM. Para evaluar la tolerancia a la acidez de *R. favelukesii* se utilizaron los medios GS y EVANS. Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio Luria-Bertani (LB).

Tabla II. 3. Medios de Cultivo

Medios de cultivo complejos		
TY - Beringer, 1974	CaCl ₂ .H ₂ O	0,7 g
	Triptona	5 g
	Extracto de levadura	3 g
YEM - Vincent, 1970	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	NaCl	0,1 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
	Manitol	10 g
	Extracto de levadura	0,4 g
LB - Sambrook <i>et al.</i> , 1989	Glucosa	1 g
	NaCl	5 g
	Triptona	10 g
	Extracto de levadura	5 g
Medios de cultivo mínimos		
GS - Del Papa <i>et al.</i> , 1999	Sacarosa	10 g
	Glutamato de sodio	0,5 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mM
	CaCl ₂ .H ₂ O	1 mM
	KH ₂ PO ₄	150 mM
	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	150 mM
	Na ₂ SO ₄	700 mM
	H ₃ BO ₃	48 mM
	MnSO ₄ . 7H ₂ O	10 mM
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1 mM
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,5 mM
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,5 mM
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,75 mM
	FeCl ₃ . 6H ₂ O	1 mM
	Tiamina	2,95 mM
	Ácido pantoténico	4,2 mM
	Biotina	0,082 mM

EVANS (Evans, 1970)	Glucosa	10 g
	NaH ₂ PO ₄ anhidro	0,6 g
	CINH ₄	0,7 g
	KCl	0,3725 g
	Na ₂ SO ₄	0,142 g
	Ac. Cítrico	0,21 g
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,127 g
	Sol. Micronutrientes	5 ml
	Sol. Vitaminas	1 ml
	Sol. Calcio	1 ml
Soluciones de micronutrientes (200X)	FeCl ₃ .6H ₂ O	5,4 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	2 g
	ZnO	0,412 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,219 g
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,452 g
	H ₃ BO ₃	0,64 g
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,004 g
	HCl	4 ml
Solución de vitaminas (1000X)	FeSO ₄ .7H ₂ O	274 mg
	Riboflavina	20 mg
	Ac. p-aminobenzoico	20 mg
	Piridoxina-HCl	20 mg
	Biotina	20 mg
	Tiamina-HCl	20 mg
Solución de calcio (1000X)	CaCl ₂ .2H ₂ O	20 mM

Alternativamente, se adicionó a los cultivos mínimos una combinación de dos *buffers* biológicos: HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-y etanosulfónico, 20mM) y MES (2-(N-morfolino) ácido etansulfónico, 20mM) para equilibrar el mismo a pHs entre 7,0 y 3,0, respectivamente.

Para la preparación de medios sólidos se utilizó en todos los casos 15 g/l de agar. Al utilizar medio YEM sólido se le adicionó rojo congo 0,25 %p/v.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para el crecimiento de las cepas de *E. coli* fue 37 °C; las bacterias de los géneros *Ensifer* y *Rhizobium* se incubaron a 28 °C.

II.1.c.2. Medios de conservación.

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía que fueron luego suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final 25 %v/v o 50 %v/v. Las suspensiones de bacterias fueron congeladas a -80 °C o a -20 °C, respectivamente, y preservadas a esa temperatura.

II.1.c.3. Antibióticos.

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada salvo en los casos de tetraciclina, que se utilizó etanol y para rifampicina y espectinomicina, en los que se utilizó metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración empleando membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron (µg.ml⁻¹): para *E. coli* kanamicina sulfato (Km) 25; y para rizobios, neomicina sulfato 120 (Nm), ampicilina 200 (Ap), estreptomicina 400 (Sm), rifampicina 200 (Rifa) espectomicina 200 (Sp), tetraciclina 10 (Tc), gentamicina (Gm) 50 para rizobios y 10 para *E. coli*.

II.2 Procedimientos microbiológicos.

II.2.a. Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento realizadas en la caracterización de tolerancia a la acidez, tanto en la cepa salvaje como en los mutantes, se realizaron en erlenmeyers o pocillos de placas *multiwell*. Para esta última técnica, se partió de diluciones 1:50 de cultivos previamente crecidos en medio GS pH 7,0. Para la medición se utilizó un lector de microplacas multifuncional (BMG Labtech). Las lecturas de DO₆₀₀ se realizaron cada una hora a 28 °C.

II.2.b. Recuento de bacterias en medios líquidos.

El recuento del número de unidades formadoras de colonias (ufc) en un medio líquido se determinó por el método de recuento de gotas en placa (Herigstad *et al.*, 2001). Para ello, se realizaron sucesivas diluciones del cultivo cuyo número de ufc se quiso determinar, en solución fisiológica estéril. Para cada dilución, se sembraron 10 gotas de 10 µl cada una en medio TY sólido (conteniendo o no antibiótico, según el caso). Luego se incubó durante 48 o 72 hs a 28 °C (dependiendo del microorganismo), pasado este tiempo se contaron las colonias en cada gota. En aquellas diluciones en las que se visualizaron entre 1 y 20 colonias, se realizó un promedio de las 10 gotas y se refirió al número de ufc/ml del cultivo original.

II.2.c. Curvas de muerte.

Para las curvas de muerte, a partir de cultivos con una $DO_{600}=0,5$ GS pH 7,0, se tomó 1 ml y se centrifugó una alícuota del cultivo a 2400 g por 10 min a temperatura ambiente. Se resuspendieron las bacterias en el mismo volumen de medio GS a pH 7,0, pH 4,0, pH 3,5 o pH 3,0, según corresponda y se las incubó a 28 °C. A partir del momento de la resuspensión en medio ácido (tiempo cero), se extrajeron muestras seriadas, a las que, previa dilución y en el momento cero, se les determinó el número de ufc/ml para seguir la cinética de muerte. Las muestras se extrajeron cada 2 horas en el caso de la cepa salvaje durante 6 horas. Cuando la determinación se realizó para evaluar el comportamiento de las cepas mutantes se extrajeron muestras cada 30 min durante 2 horas y para el caso de la cepa *R. favelukesii*-pSym⁻ este lapso se extendió hasta 4 horas. Se graficó la progresión del logaritmo decimal del número de bacterias viables en el curso del tiempo (comportamiento aproximadamente lineal). El valor del tiempo de reducción decimal de células viables (D), tiempo en el que el número de células viables se reduce en un factor 10, fue calculado como el módulo de la inversa de la pendiente de cada una de las rectas que resultan de graficar log ufc/ml vs. tiempo pos-*shock* ácido. La diferencia en la velocidad de muerte se evaluó comparando el valor absoluto de las pendientes de las rectas (1/D). En ciertos casos estos resultados se presentaron como porcentaje de sobrevivencia (valor de ufc/ml luego del tiempo de exposición sobre el valor de ufc/ml iniciales)

II.2.d. Conjugaciones biparentales.

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon *et al.* (1983) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5 ml se mezclaron 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora ($DO_{620nm} = 0,4 - 0,5$) con 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora. La mezcla fue luego centrifugada a 2.500 rpm durante 8 minutos y el sedimento fue resuspendido suavemente en aproximadamente 50 µl de medio líquido TY. La suspensión entonces fue colocada en una caja de Petri con medio TY sólido sin antibióticos e incubada a 28°C durante 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue finalmente resuspendida en medio líquido TY y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s) para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregaron la bacteria donadora o la receptora.

II.2.e. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de E.coli.

Se siguió la técnica de Tung & Chow (1995), con leves modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB con cloruro de sodio con 1 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue incubado a 37 °C y agitado vigorosamente hasta que la DO_{600nm} llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4000 g por 15 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con glicerol 10% a 4 °C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en glicerol 10 % a 4 °C y se fraccionaron en alícuotas de 100 µl.

Las transformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y en cubetas de 0,2 cm bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200µ, 2,5 kV). Luego de la transformación se

adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio LB, y la mezcla se incubó 1 hora a 37 °C para permitir que la información contenida en el ADN introducido se expresara. Luego de la incubación las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo e incubadas una noche a 37 °C.

II.2.g. Determinación de actividad β -Galactosidasa.

La actividad β -galactosidasa se midió por el método del o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) descrito por Miller *et al.* (1972). Para ello, 125 μ l de cultivo de DO mayor a 0,6 unidades se les adicionaron 375 μ l de *buffer* Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04 M; KCl 0,01 M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 M; β -mercaptoetanol 0,05M, pH=7). Las mezclas se termostataron a 37°C por 10 minutos y a continuación se agregaron 100 μ l de ONPG 4 mg/ml. Se cronometró el tiempo y se detuvo la reacción por agregado de 250 μ l de Na_2CO_3 1M. Se midió la absorbancia a 420 nm de las mezclas de reacción.

II.3. Técnicas de biología molecular.

II.3.a. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreps").

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook, *et al.* (1989). Alternativamente, luego de obtener el sobrenadante de lisis, se purificó con sílica (Sigma). Para esto se le agregó 10 μ l de suspensión de sílica al extracto de la lisis alcalina y se mezcló bien. Se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Luego de realizar 3 lavados con 500 μ l de solución de lavado (se resuspendió completamente, se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante), se dejó secar la sílica a 37° C. Para finalizar, se agregó 30 μ l de agua y se incubó 5 minutos a 60°C. Se centrifugó 3 minutos a máxima velocidad y se tomó el sobrenadante que contenía el ADN.

Suspensión de sílica: Se colocan 2 gr de sílica Sigma en 15 ml de agua destilada, se lava 3 veces centrifugando a 2000 g por 2 minutos y se resuspende la sílica en dos volúmenes de agua miliQ.

Solución de Lavado: 50 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 2.5 mM EDTA; 50 % etanol.

II.3.b. Extracción de ADN total.

A partir de cultivos en fase exponencial tardía, se centrifugó 1 ml de los mismos durante 3 min en un microtubo de polipropileno. Las células se lavaron luego con 100 μ l de N-lauril sarcosina 0,1 % (P/V) en TE y se centrifugó durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de NaCl 1M. A continuación, el sedimento se resuspendió en 250 μ l de sacarosa 20 % (P/V) en TE, se añadieron 250 μ l de lisozima 5 mg/ml en TE, se incubó 1 hora a 37 °C, y luego se agregaron 50 μ l de pronasa (2,5 mg/ml en TE) y 100 μ l de SDS al 5 % (P/V) en TE. La suspensión que fue mezclada por inversión se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Posteriormente, a la solución de ADN se le añadió 200 μ l de fenol equilibrado con Tris pH 8, 70 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5,4 y 100 μ l de cloroformo. Se mezcló suavemente. La mezcla se centrifugó durante 15

minutos a 13000 rpm pasando a continuación la fase superior acuosa a un nuevo tubo donde se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm. Recogida la fase acuosa, el ADN se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol frío y centrifugando durante 15 minutos a 13000 rpm. El precipitado obtenido se lavó con 0,5 ml de etanol al 70% y se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. El ADN se resuspendió en 25-50 µl de agua y se incubó a 60° durante una hora.

En ocasiones se utilizó el Kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del producto.

II.3.c. Electroforesis de ADN.

II.3.c.1. Geles de lisis *in situ*.

Los perfiles de plásmidos fueron obtenidos por el método de lisis *in situ* de Eckhardt (1978). Las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido. Alícuotas de 1 ml de cultivos crecidos hasta una DO_{600nm} de 0,2 fueron centrifugadas y las células lavadas con 1 ml de solución 0,3% (P/V) de sarcosilato de sodio. Las células de cada muestra fueron centrifugadas nuevamente, resuspendidas en 15 µl de solución de ficoll 20% (P/V), y mantenidas en agua hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis/separación (0,45-0,80 % de agarosa - según los plásmidos a resolver- en buffer TBE (Tris 0,09 M; ácido bórico 0,09 M; EDTA 0,002 M). Previo a la siembra de las muestras en cada fosa del gel se introdujeron 25 µl de una solución de SDS 10% (P/V) con xylene cyanol, y la electroforesis se corrió a polaridad invertida hasta que el frente retrocedió un centímetro. Se detuvo la corrida y se procedió a la siembra. Para ello se agregaron 15µl de solución de lisis (sacarosa 8% ficoll 2% Tris 50 mM EDTA 25 mM, RNAsa 0,4 mg/ml lisozima 1 mg/ml) a cada una de las muestras, se mezclaron en forma suave e inmediatamente se sembraron 15µl de la mezcla por calle. Las condiciones de corrida variaron dependiendo los plásmidos a resolver. Luego se lavó con agua 30 minutos y se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

II.3.c.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2 % p/v) fue realizada empleando TBE (Tris 89 mM, Na_2EDTA 2,5 mM, H_3BO_3 89 mM, pH 8,2) como *buffer* de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN en agua o TE /µl solución de carga.

II.3.c.3. Revelado de geles y fotografía.

El agregado de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta de $\lambda = 260$ nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación ultravioleta.

II.3.c.4. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

El tamaño de los fragmentos de restricción fue determinado por interpolación gráfica, realizada mediante el uso del programa LabWorks (UVP Inc., USA). Como patrones de peso molecular fueron utilizados ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564 pb) y marcadores de peso molecular comerciales.

II.3.c.5. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Luego de cortar la banda del gel de agarosa con el fragmento que se deseaba purificar, se lo colocó en un tubo de polipropileno y se le agregaron 5 volúmenes de NaI 6 M. Se colocó a 55 °C durante 5 minutos agitándolo ocasionalmente. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,4. A continuación se purificó con sílica (Sigma). Para esto se le agregó 10 µl de suspensión de sílica y se procedió como se describe en II.3.a para la purificación de plásmidos.

II.3.c.6. Precipitación del ADN con etanol.

Cuando fue necesario purificar el ADN de impurezas o luego de tratamientos enzimáticos se realizó la precipitación del ADN con etanol. Para esto, se agregaron 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5,4 a la mezcla, se llevó a 100 µl con agua bidestilada y se agregó 300 µl de etanol 96° frío. Se incubó a -20 °C durante 2 horas y se centrifugó 30 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante con pipeta y se dejó secar para eliminar el etanol remanente. Luego se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril.

II.3.d. Tratamientos enzimáticos del ADN.

Las reacciones enzimáticas del ADN se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por las casas comerciales (*Invitrogen*, *Fermentas* y *Promega Corp.*), y las recomendaciones descriptas en Sambrook *et al.* (1989). Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas. Cuando fue necesario luego de los tratamientos enzimáticos se procedió a la inactivación de las enzimas por desnaturalización térmica.

II.3.e. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico iCycler o MyCycle (Ambos BioRad). Se utilizaron las ADN polimerasas PFX Platinum (temperatura óptima de elongación 68 °C), ADN Taq polimerasa (temperatura óptima de elongación 72 °C) de *Invitrogen* o LongAmp Taq DNA polimerasa (temperatura óptima de elongación 65 °C) de *New England Biolabs* para fragmentos mayores a 2,5 Kpb, siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes. Los cebadores fueron utilizados 10 µM para PCR específicas, con volumen final de 25 µl en cada mezcla de reacción. Los cebadores empleados para la realización y evaluación de mutantes están listados en la Tabla II.2. Los cebadores fueron sintetizados por *Operon*, *molecules for life* o *GenBiotech*.

Finalizada la reacción de PCR, 10 µl del producto fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5% (P/V) conteniendo 0,5-1,0 µg/ml de bromuro de etidio.

Los ADN moldes para las amplificaciones por PCR fueron obtenidos utilizando alguna de las siguientes metodologías:

a) para amplificaciones específicas sobre ADN genómico: Las células provenientes de cultivos líquidos o sólidos (10^8 - 10^9 ufc) fueron resuspendidas en 100 µl agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 14.000 g por 4 minutos y 5 µl de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde. El remanente fue conservado a -20 °C.

Tabla II.4. Lista de cebadores utilizados en este Trabajo.

Nombre	Secuencia	Referencias
Obtencion de mutantes		
M13 Rv (-40)	5'– CAGGAAACAGCTATGAC –3'	Cebador universal
M13 Fw (-40)	5'– GTTTTCCCAGTCACGAC –3'	Cebador universal
LPU83_2016 left	5'–TACACCCAGATCATGC–3'	Este Trabajo
LPU83_2016 right	5'–GAGACGATCGAGAACTC–3'	Este Trabajo
LPU83_2016 out	5'–TCGAAACCACCGTGTGTTTC–3'	Este Trabajo
LPU83_3200 left	5'–CAAGATCGCCGTCATCCAC–3'	Este Trabajo
LPU83_3200 right	5'–GGCTTCCTTCATCTTGCG–3'	Este Trabajo
LPU83_3200 out	5'–TTCCTGAAACCGCACCAAAG–3'	Este Trabajo
LPU83_3205 left	5'–CTGGTCAGCACTGTCTAC–3'	Este Trabajo
LPU83_3205 right	5'–AGAACAACGTCAGCAG–3'	Este Trabajo
LPU83a_0021 left	5'–AACAAGGTCAGGGATC–3'	Este Trabajo
LPU83a_0021 right	5'–CGTCATCATCTCCATG–3'	Este Trabajo
LPU83a_0021 out	5'–GCAACCTCTCAACAGCCAA–3'	Este Trabajo
Cura del plásmido simbiótico		
Rep83-f	5'–CGCCCGAGTATCTCGTCAAT–3'	Este Trabajo
Rep83-2r	5'–GTCGAACCGGCTCTCTATGG–3'	Este Trabajo
s12t-fw	5'–TCAACGGCGAGTCAATCA–3'	Tesis Doctoral G. Torres Tejerizo
s12t-rv	5'–GCGTCCTTCCAATGTC–3'	Tesis Doctoral G. Torres Tejerizo
s32t-fw	5'–ACGGTTGAGAACGGGACA–3'	Tesis Doctoral G. Torres Tejerizo
s32t-rv	5'–GGTGATGGGCGTGATGA–3'	Tesis Doctoral G. Torres Tejerizo
s43t-fw	5'–GCGAGAGACGCCATCG–3'	Tesis Doctoral G. Torres Tejerizo
s43t-rv	5'–AGGAGCGGAGCAAGACG–3'	Tesis Doctoral G. Torres Tejerizo
nodCF	5'–AYGTHGTYGAYGACGGTTC–3'	(Laguerre <i>et al.</i> , 2001)
nodCI	5'–CGYGACAGCCANTCKCTATTG–3'	(Laguerre <i>et al.</i> , 2001)

Tabla II.5, continuación.

Nombre	Secuencia	Referencias
RT-PCR		
<i>hmuS</i> LPU83_3146 fw	5'-ACCCTCGTCGATAAAC-3'	Este Trabajo
<i>hmuS</i> LPU83_3146 rv	5'-GCATCCCAAAGAACTC-3'	Este Trabajo
LPU83_3191 fw	5'-GTACACCATCACCTTCC-3'	Este Trabajo
LPU83_3191 rv	5'-GATGAGGTAGCGTTTG-3'	Este Trabajo
LPU83_3186 fw	5'-GATCACCTTCGAGCACAGC-3'	Este Trabajo
LPU83_3186 rv	5'-CAAAGACCCTCCCAATGCG-3'	Este Trabajo
LPU83_3200 fw	5'-CAAGATCGCCGTCATCCAC-3'	Este Trabajo
LPU83_3200 rv	5'-GGCTTCCTTCATCTTGCG-3'	Este Trabajo
LPU83_1662 fw	5'-AGCAGAATCGGAACTC-3'	Este Trabajo
LPU83_1662 rv	5'-GAACAGGATGGTCGTC-3'	Este Trabajo
LPU83_recA fw	5'-CGGTATCTGCGCCTTTGTC-3'	Este Trabajo
LPU83_recA rv	5'-TAATCTCGAGGGCCTGCTC-3'	Este Trabajo

*Y= C o T; H= A, C o T; K= G o T; N= A, C, G o T

Alternativamente se realizaron preparaciones de ADN total de acuerdo a la metodología que se describió en II.3.b.

b) para la amplificación de secuencias específicas de ADN contenidas en plásmidos: Se preparó ADN plasmídico según se detalla en II.3.a y se realizó una dilución final 1/200.

II.3.f. Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple.

Se diseñaron los cebadores para amplificar una región interna al gen a mutar (ver Tabla II.4). Luego se amplificó dicho fragmento con la polimerasa Pfx, que deja extremos romos y fueron clonados en el plásmido pK18mob, previamente digerido con *SmaI* (extremos romos). Uno de los clones obtenidos fue secuenciado para corroborar el correcto clonado. Cada plásmido fue transferido desde *E. coli* S17-1 a *R. favelukesii* LPU83 por conjugación y los transconjugantes fueron seleccionados con Str y Nm. La correcta integración de los plásmidos fue confirmada por PCR utilizando los cebadores M13 y los cebadores con la denominación *out* correspondiente.

II.3.g. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Obtención de ARN: El crecimiento de *R. favelukesii* LPU83 se realizó en cultivos *batch* en medio GS a pH 4,6 y pH 7, posteriormente se agregó el reactivo RNA Protect (Qiagen) y se cosecharon las células, el pellet obtenido se congeló en nitrógeno líquido. La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial (RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit, Qiagen). Luego, el ADN se removió con ADNasa, libre de ARN (ThermoFisher).

Síntesis de ADN complementario: Para la síntesis de ADN complementario se utilizó la retrotranscriptasa comercial M-MLV (ThermoFisher Scientific). Se partió de 1 µg de ARN total y se utilizaron cebadores (ThermoFisher Scientific) y se siguió el protocolo del uso del fabricante.

RT-PCR: La abundancia de transcritos de los genes seleccionados se cuantificó utilizando cebadores específicos de dichos genes (ver Tabla II.4). Como control endógeno se utilizó el gen *recA*. Los ensayos de RT-PCR se realizaron utilizando el *kit* comercial iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD), con tres replicas biológicas. El termociclador utilizado fue el q-TOWER 2.2 Real-Time Thermocycler (Analytik Jena). Por último se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para comparar los niveles de expresión de cada transcripto (Pfaffl, 2001).

II.3.h. Secuenciación de ADN.

Para la secuenciación de la cepa curada de su plásmido simbiótico (*R. favelukesii* LPU83-pSym⁻) se construyó y secuenció una biblioteca *shotgun* Illumina estándar con insertos de 300 pb utilizando la plataforma the Illumina HiSeq 2000-1 TB del Departamento de Ciencias Ambientales de la Universidad de Aarhus, Dinamarca. Las lecturas resultantes fueron filtradas según su calidad (Bolger *et al.*, 2014) y el borrador del genoma fue ensamblado usando gsAssembler (versión 2.8).

II.3.i. Obtención de la cepa *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻.

Para la obtención de la cepa curada de su plásmido simbiótico, *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻, se utilizó una técnica por incompatibilidad plasmídica. Dos plásmidos son incapaces de coexistir en la misma célula si sus funciones de replicación y partición interfieren, por ende, son incompatibles. Para ello, se introdujo en *R. favelukesii* una copia de la región de replicación y partición *repABC* de su pSym en el plásmido pCR 2.1-Topo. La Figura II.1 muestra un esquema de la estrategia de construcción del plásmido incompatible con el pSym de *R. favelukesii*, el cual se denominó TOPO-*repABC-mob*. Una vez obtenido dicho plásmido se introdujo por conjugación en *R. favelukesii*, los detalles de este proceso se muestran en la Figura II.2. La cepa receptora de la conjugación fue *R. favelukesii* LPU83-H, una cepa de *R. favelukesii* que contiene el gen de resistencia a gentamicina (Gm) interrumpiendo el gen *nodH* (ubicado en el plásmido simbiótico). La pérdida del plásmido simbiótico se monitoreó por pérdida de la resistencia a Gm.

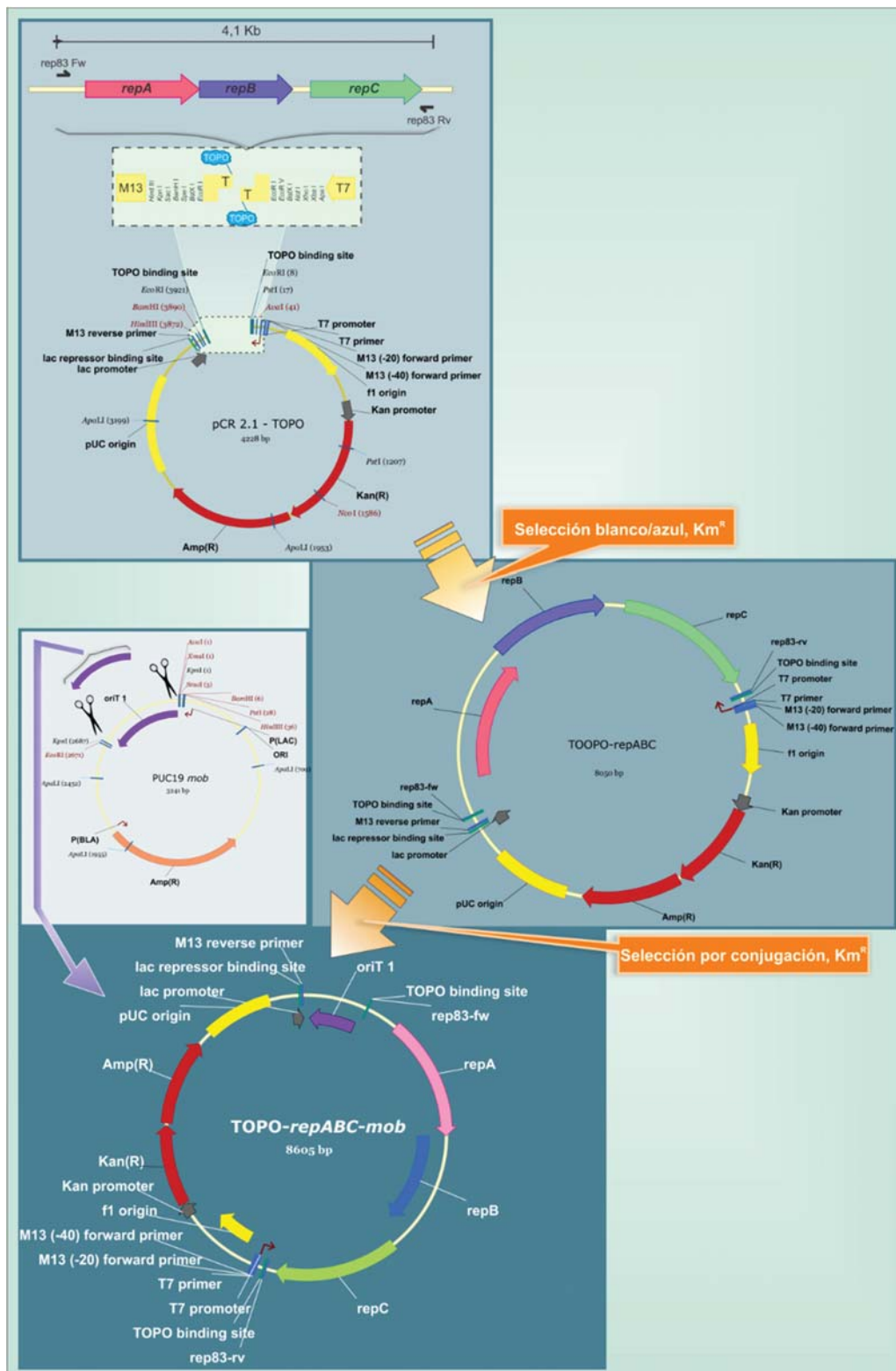


Figura II. 1. Esquema de la construcción del plásmido que contiene la región de replicación del pSym de *R. favelukesii* LPU83. Se amplificó por PCR la región *repABC* completa y se clonó en el vector comercial pCR 2.1-TOPO. Como este vector no es movilizable resultó necesario clonar la región *oriT* (*mob*) para poder ser transferido por conjugación a *R. favelukesii*. Para ello, se introdujo la región *oriT* en el vector TOPO-*repABC* a través de la digestión del plásmido pUC19-*mob* con *KpnI* y ligando el fragmento liberado con el vector TOPO-*repABC* digerido con la misma enzima. El vector obtenido se denominó TOPO-*repABC-mob*.

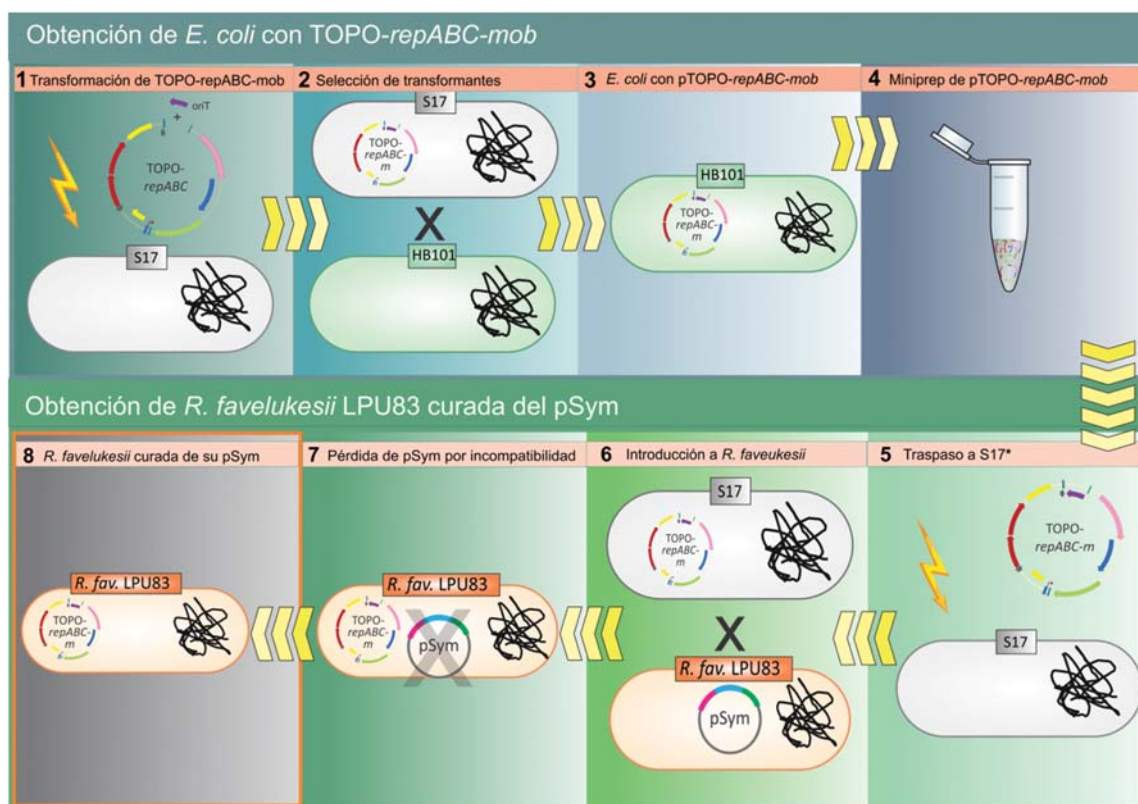


Figura II. 2. Esquema de la obtención de la cepa de *R. favelukesii* LPU83 curada de su pSym. 1) La ligación del plásmido TOPO-repABC con la región *oriT* se introdujo por electroporación en la cepa *E. coli* S17-1. 2) Para seleccionar el vector conteniendo la región *oriT* (TOPO-repABC-mob) se realizó directamente una conjugación de las células electroporadas con la cepa *E. coli* HB101 (Rif^R, Sm^R). Se utilizó este método de detección ya que no se contaba con la posibilidad de seleccionar blanco azul y al adquirir dicha región el vector resulta en un vector movilizable. 3) Las bacterias transjugantes de dicha conjugación se seleccionaron en presencia de rifampicina, kanamicina y chequeados por digestión con *KpnI* y *EcoRI*. 4) Con los clones de HB101 conteniendo el plásmido pTOPO-repABC-mob se realizó una miniprep obteniendo el vector TOPO-repABC-mob purificado. 5) Una vez obtenido el vector deseado pTOPO-repABC-mob se realizó una transformación a S17-1, cepa que permite conjugar dicho vector a *R. favelukesii*. 6) Introducción de pTOPO-repABC-mob por conjugación de *E. coli* S17-1 con una cepa de *R. favelukesii* resistente a gentamicina por inserción en el gen *nodH* ubicado en el pSym. 7-8) Las bacterias transjugantes de *R. favelukesii* que hayan perdido el plásmido simbiótico por presencia del pTOPO-repABC-mob, se detectaron por la resistencia a kanamicina y estreptomycin sumado la pérdida de resistencia a gentamicina.

II.4. Análisis transcriptómico, RNA-Seq.

El crecimiento de *R. favelukesii* LPU83 se realizó en cultivos *batch* en medio GS a pH 4,6 y pH 7,0, posteriormente se agregó el reactivo RNA Protect (Qiagen) y se cosecharon las células, el pellet obtenido se congeló en nitrógeno líquido. La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial (RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit, Qiagen). Luego, el ADN se removió con ADNasa, libre de ARN (ThermoFisher). Luego sustrajo el ARN ribosomal por medio de un kit comercial (Ribo-Zero rRNA removal kit, Illumina Inc.). Las bibliotecas de ADNc se prepararon con el kit comercial TruSeq® mRNA Sample Preparation (stranded) (Illumina Inc., San Diego, U.S.A.). Las muestras fueron secuenciadas por medio de la plataforma Illumina Miseq disponible en el Centro de Biotecnología (CeBiTec, Bielefeld Universität, Germany). Con la información del secuenciamiento obtenida, se evaluó la calidad de las secuencias generadas con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se alinearon con Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) al genoma de referencia de *R. favelukesii* LPU83. Luego, se utilizaron como herramientas bioinformáticas para la visualización, el software ReadXplorer (Hilker *et al.*, 2014), que a su vez proveyó los

test estadísticos para la búsqueda de genes de expresión diferencial como Deseq2 (Love *et al.*, 2014). Para estas tareas contamos con el apoyo del BRF (Bioinformatic Research Facility) del CeBiTec. En la Figura II.3 se muestra un esquema representativo de los pasos descriptos.

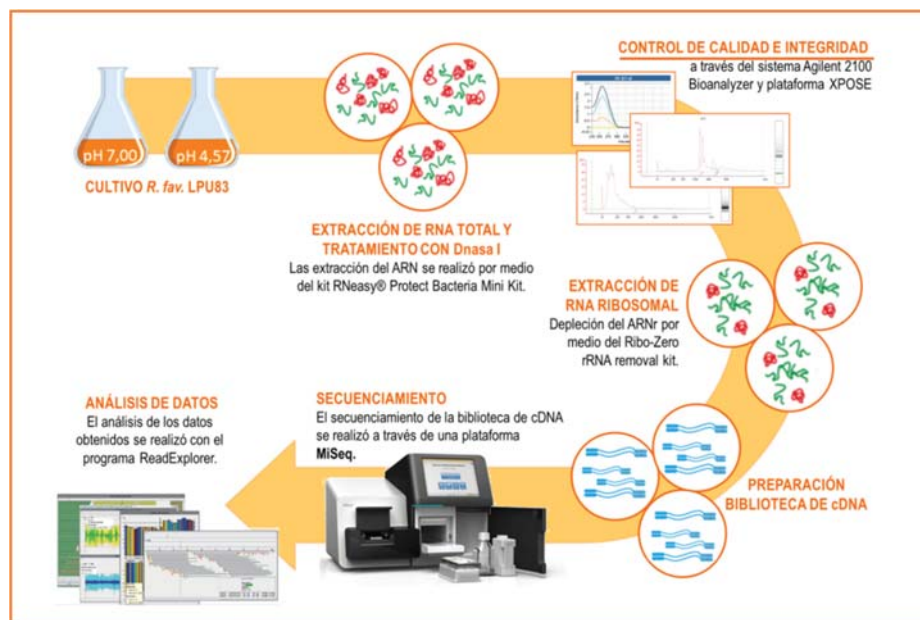


Figura II. 3. Esquema de los pasos realizados en el análisis transcriptómico, RNA-Seq, en *R. favelukesii* LPU83.

II.5. Técnicas utilizadas para los análisis proteómicos.

II.5.a. Extracción de proteínas totales.

Para comenzar, se centrifugaron 250 ml de cultivos que poseían un $DO_{600} = 0,5$ a 10.000 g por 30 min a 4°C, y se realizaron dos ciclos de resuspensión y centrifugación en 30 ml de solución buffer LS (*Low Salt*: KCl, 3 mM; NaH_2PO_4 , 9 mM; KH_2PO_4 , 1,5 mM; NaCl, 68 mM). Los *pellets* secos así obtenidos se resuspendieron en 6,5 ml de *buffer* TRIS pH=7,6 y se les agregó 6,5 µl del inhibidor de proteasas PMSF (0,25M). Se procedió a la ruptura de las células colocando las muestras en viales conteniendo 500 mg de esferas de vidrio (1 mm) y aplicando 4 pulsos por 20 seg a velocidad 5500 en un homogenizador de alta potencia (Precellys, Bertin). Posteriormente, se separaron las esferas y los restos celulares centrifugando los tubos a 10.000 xg por 20 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Se procedió a la degradación de ácidos nucleicos adicionando 1 µl de DNasa y 4 µl de RNasa (10 mg/ml) por cada 5 ml de muestra e incubándolas 1 hs a 37 °C. Las muestras se conservaron a 4 °C.

II.5.b. Fraccionamiento subcelular para separar proteínas citosólicas y de membrana.

Para separar las proteínas solubles de aquellas asociadas a membranas, se realizó una ultracentrifugación a 100.000 xg por 2 hs a 4 °C (ultracentrífuga Beckman Coulter, rotor 70Ti). Las proteínas citosólicas (sobrenadante) se precipitaron a 10.000 g 30 min a 4°C previa incubación por 24 hs con 4 volúmenes de

acetona fría. Estas proteínas y las proteínas de membrana (precipitados de la ultracentrifugación) se resuspendieron en un *buffer* de rehidratación (urea, 7M; tiourea, 2M; isopropanol, 10%; Tritón X100, 2%). Los preparados se conservaron a -80 °C.

II.5.c. Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Para evaluar la calidad de las proteínas, se realizaron ensayos electroforesis de geles de poliacrilamida 13% en condiciones desnaturalizantes (13% SDS-PAGE). Los geles de apilamiento se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH= 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH= 8,8. En las calles del gel se sembraron 20 µl de muestra previamente preparadas en *buffer* Laemmli 4X (278 mM Tris-HCl pH=6,8; glicerol 40 % v/v; SDS 4,4 %; azul bromofenol 0,02 %). Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 min en equipos Miniprotean II (BioRad) a 100 - 120 volts. Las proteínas en el gel fueron visualizadas por tinción con Azul Coomassie (metanol 50 %v/v, ácido acético 5 %v/v, Coomassie Brilliant Blue R2500, 1 % p/v). Los geles se incubaron con la solución colorante a temperatura ambiente durante 12 hs aproximadamente. Luego se destiñeron mediante una serie de lavados sucesivos con solución decolorante (metanol 50 % v/v, ácido acético 5 % v/v). El registro digital se realizó sobre un transiluminador con luz blanca.

II.5.d. Cuantificación, reducción, alquilación y precipitación de las proteínas.

Para la identificación de proteínas por LC/MS-MS es necesario reducir las proteínas y alquilarlas. En una primera etapa se cuantificaron las proteínas por la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Para esta técnica, se empleó un reactivo comercial (*Bio-Rad Protein Assay*), siguiendo el protocolo del fabricante para la técnica medida en microplaca y utilizando como estándar seroalbúmina bovina (BSA), de concentración 10 mg/ml, para confeccionar la curva de calibración. Las medidas de absorbancia a 595 nm se realizaron en un lector de microplaca. Posteriormente, las muestras se diluyeron en *buffer* TRIS para continuar el protocolo utilizando aproximadamente 50 µg de proteínas totales. La reducción se realizó incubando las muestras con DTT (ditiotreitrol) 45 min a 56 °C en una concentración final del mismo de 10 mM. La alquilación se realizó con iodoacetamida en una concentración final de 20 mM, e incubando la muestra 45 min a temperatura ambiente. Por último, las proteínas se precipitaron con el agregado de 0,2 volúmenes de TCA (ácido tricloroacético), posterior incubación a -20°C por dos horas, y centrifugación a máxima velocidad por 10 min. El *pellet* se lavó tres veces con acetona fría para remover el TCA realizando pasos de resuspensión y centrifugación cada vez. La acetona remanente se retiró por evaporación a temperatura ambiente. Las proteínas así obtenidas se pueden guardar a -80 °C.

II.5.e. Identificación de proteínas por LC/MS-MS.

Las proteínas se resuspendieron en bicarbonato de amonio 50 mM pH=8 y se realizó una digestión de las mismas con tripsina (Promega V5111). Luego de purificarlos y desalarlos con columnas ZipTip C18 (Milipore),

los péptidos se analizaron en un espectrómetro QExactive (Thermo Scientific) acoplado a un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). En cada corrida se inyectaron 2 µl de muestra (aproximadamente 1 µg de péptidos) y se utilizó una columna en fase reversa para la elusión de los mismos (C18, 2 µm, 100A, 50 µm x 150 mm) Easy-Spray Column PepMap RSLC (P/N ES 801). Se utilizó un flujo de 3×10^{-4} ml x min⁻¹ y la polaridad del solvente varió de 7 % (5 min) a 35% del solvente B (120min). El solvente A consistió en ácido fórmico 0,1% en agua y el B en ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo.

El espectrómetro Q-Exactive contiene una fuente de ionización por *electrospray* una celda de colisión HCD, y un analizador orbitrap. Se utilizaron 3,5 kilovolts para ionizar los péptidos y se realizó un escaneo en el rango 400-1800 masa/carga a una resolución de 70.000 a 400 masa/carga. En cada ciclo, se identificaron en el analizador 10 iones más intensos, previa fragmentación en la celda de colisión. Este análisis fue realizado en el “Centro de Estudios Químico y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF, CEQUIBIEM, UBA”.

II.5.f. Análisis de los datos.

Con la información obtenida del espectrómetro Q-Exactive se procedió a la identificación y cuantificación de las proteínas utilizando el programa MaxQuant (Tyanova *et al.*, 2016), los *hits* con la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>). A su vez, el análisis y la visualización de los datos se realizó con el software (Tyanova *et al.*, 2016).

En la Figura II.4 se presenta un esquema resumiendo los pasos realizados para la obtención de los proteomas.

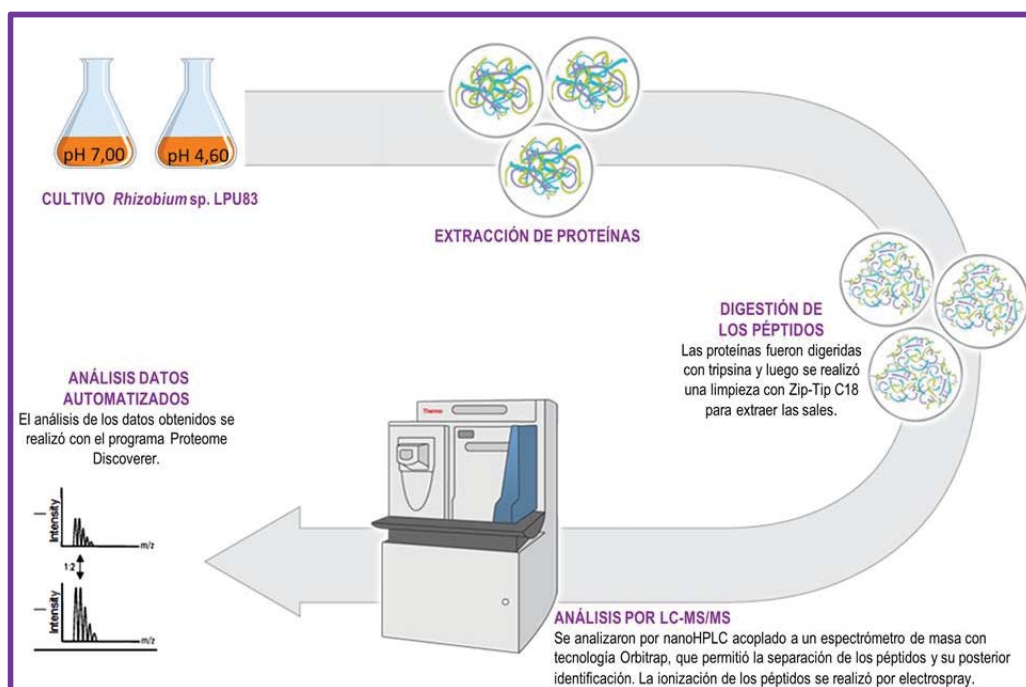


Figura II. 4. Esquema de los pasos realizados en el análisis proteómico, shotgun proteomics, en *R. favelukesii* LPU83.

II.6. Ensayos con plantas.

II.6.a. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa), ecotipo supermonarca como planta hospedadora. Las semillas fueron esterilizadas en superficie por inmersión en etanol durante 30 segundos y luego en lavandina comercial al 25 % durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente (10 veces) con H₂O estéril y se dejaron húmedas en reposo durante 2 hs. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas de Petri con agar-agua, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28 °C hasta su germinación (24-48 hs). Se pudo comprobar el grado de esterilidad extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28 °C.

II.6.b. Condiciones de cultivo.

Todos los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 22/16°C de temperatura (día/noche).

II.6.b.1 Cultivo axénico de plantas de alfalfa.

Cuando las plántulas alcanzaron una longitud de 1-2 cm, se introdujeron en condiciones asépticas en placas de Petri con agar-Fåhræus (ver siguiente sección) como soporte. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, las placas se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas.

II.6.b.2. Solución nutritiva.

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos de alfalfa se utilizó la solución Fåhræus modificada por Lodeiro, *et al.* (2000).

Tabla II.6. Composición de la solución Fåhræus

Composición Fåhræus	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,11 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g
NaCl	0,06 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,17 g
Citrato Férrico	0,005 g
Micronutrientes	1 ml (solución 1000X)
H ₂ O (desionizada)	1000 ml

Composición de los Micronutrientes:	
KCl	3,73 mg
H ₃ BO ₃	1,55 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,85 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,13 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,58 mg
Na ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,018 mg
H ₂ O (desionizada)	1000 ml

El medio fue esterilizado en autoclave 15 minutos a 120 °C. El CaCl₂·2H₂O y el MgSO₄·7H₂O fueron adicionados luego desde soluciones 1000 veces concentradas.

II.6.c. Inoculación de los cultivos.

La inoculación de las plantas de alfalfa con los cultivos bacterianos se hizo tras 5 días de permanencia en la cámara de cultivo. Cada placa de Petri se inoculó con 100 µl de suspensión bacteriana en medio Fåhræus por planta (las cuales contenían entre 10⁶ a 10⁷ ufc/ml). Se hicieron recuentos en placa de los inóculos preparando diluciones seriadas de los mismos.

II.6.d. Ensayos de nodulación de plantas de alfalfa

Para evaluar la capacidad de la cepa *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻ de nodular alfalfa, se cultivaron las cepas en TY, se centrifugaron y resuspendieron en solución Fåhræus sin nitrógeno. Se diluyeron los inóculos en solución Fåhræus hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 1x10⁷ ufc/ml. Se inocularon las plantas con 5 ml de este preparado.

II.7. Programas estadísticos y análisis bioinformático.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de las curvas de crecimiento y de muerte, se utilizó el programa GraphPad. Para la visualización y estadística de los resultados del análisis proteómico se utilizó el programa Perseus (Capítulo IV). En el caso del análisis transcriptómico se utilizó el *software* ReadXplorer (Hilker *et al.*, 2014) para el análisis estadístico y su visualización. La asignación de las categorías funcionales de cada gen se realizó a través de la plataforma online WebMGA (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/webMGA/>). Por último los análisis de enriquecimiento y de interacción proteína-proteína se realizaron con la plataforma online STRING (Franceschini *et al.*, 2013). En dicha base de datos no se encuentra incluida *R. favelukesii* LPU83, pero STRING, a través de la secuencia de cada proteína las re-asigna a un microorganismo presente en la dicha base de Datos. En nuestro caso el microorganismo utilizado fue *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA TOLERANCIA A LA ACIDEZ DE *RHIZOBIUM FAVELUKESII* LPU83

III.1. Introducción.

La respuesta de los rizobios al estrés ácido ha sido ampliamente estudiada utilizando diversos enfoques (Goss *et al.*, 1990, Hellweg *et al.*, 2009, Orr, 2009, Draghi *et al.*, 2016). Los más frecuentes involucran la búsqueda de especies tolerantes a la acidez, así como también, la búsqueda de genes involucrados en dicha tolerancia a través de mutagénesis, proteómica o *microarrays*, entre otros. A partir de la búsqueda de especies tolerantes a la acidez se puso en evidencia que los rizobios son capaces de modificar fácilmente el pH de los medios sintéticos donde son cultivados. Debido a que los mismos pueden metabolizar durante su crecimiento ciertos compuestos del medio como azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos o aminoácidos (Howieson, 1985). Date *et al.* (1979) evaluaron la capacidad de crecimiento de 50 cepas de rizobios (provenientes de suelos con un rango de pH entre 4,5 a 9,0) aisladas de nódulos obtenidos de *Stylosanthes capitata*, *Stylosanthes guianensis* y *Stylosanthes hamata*. Dichos microorganismos presentaron marcadas diferencias en su capacidad de crecimiento en dos medios con diferentes pHs de levadura-manitol (*yeast-mannitol*, YEM). Los medios que inicialmente eran ácidos, alcanzaron un pH entre 7,0 y 8,0 debido al crecimiento de dichos microorganismos. Los autores evidenciaron que el crecimiento de *Rhizobium* elevó el pH de 4,5 a aproximadamente 7,5 en medios conteniendo manitol como fuente de carbono. Sin embargo, en medios ácidos en los cuales la arabinosa, o alternativamente la galactosa, eran la fuente de carbono, el pH disminuyó ligeramente (a 3,8), siendo el crecimiento esencialmente el mismo que en los medios que contenían manitol. En este sentido, la selección de los componentes del medio de cultivo debe brindar un medio ácido estable que permita estudiar específicamente la tolerancia a la acidez en los rizobios. Más tarde, Howieson *et al.* (1985) realizaron un estudio utilizando una amplia variedad de medios de cultivo, con distintas fuentes de carbono y nitrógeno, para evaluar cómo el crecimiento de *E. meliloti* modifica el pH del medio. Ninguno de los medios evaluados sin la adición de un *buffer* resultó adecuado para la selección de *E. meliloti* tolerantes a la acidez debido a las fluctuaciones en el pH del medio de cultivo.

En la presente Tesis se propone dilucidar y caracterizar los mecanismos que utiliza *R. favelukesii* para afrontar incrementos en la concentración de protones en el medio extracelular. En este sentido, la condición a utilizar como condición de estrés ácido en el estudio de la tolerancia a la acidez resulta crucial para abordarlo. Se debe recordar, entonces, qué se entiende por estrés en una célula. Booth *et al.* (2002) expresaron que el *estrés es cualquier cambio producido en el genoma, proteoma o en el ambiente que le impone a la célula una condición de menor crecimiento o menor potencial de supervivencia*. A su vez, las condiciones por las cuales la célula entra a una zona de estrés son dependientes del grado de estrés impuesto por el ambiente, y de la capacidad de respuesta celular. Por lo tanto, en este capítulo se propone determinar la condición de estrés ácido que permita, posteriormente, evidenciar cambios sustanciales en la expresión del genoma de *R. favelukesii* sin que denote un estrés drástico como la muerte celular. De manera que definir tanto el pH como el medio de cultivo al cual estudiar la respuesta al estrés, es el primer paso para avanzar en la dilucidación de la respuesta de *R. favelukesii* al estrés ácido.

III.2. Determinación de las condiciones de cultivo a utilizar en la caracterización de la tolerancia a la acidez de *R. favelukesii*.

III.2.a. Elección del medio de cultivo y valores de pH a estudiar.

R. favelukesii es un rizobio tolerante a la acidez, aislado de suelos locales ácidos. Como se mencionó anteriormente, el medio de cultivo utilizado para cultivar los rizobios podría modificar el comportamiento de los mismos y, por ende, su respuesta al estrés ácido. El crecimiento de rizobios a distintos pHs ha sido usualmente estudiado en dos medios de cultivo definidos: Evans (Evans, 1970) y GS (Del Papa *et al.*, 1999). Durante el crecimiento de los rizobios, el pH en estos medios de cultivo, en ausencia de soluciones amortiguadoras de pH, se ve alterado. En consecuencia, para poder realizar un estudio adecuado de la tolerancia a la acidez, ambos medios deben tener *buffers* para mantener constante el pH durante el crecimiento de los rizobios. La selección del tampón adecuado está supeditada a los valores de pH a evaluar. Dicho tampón, además de poseer capacidad *buffer* en dicho rango, no debe ser metabolizable por los rizobios. En este sentido, Del Papa *et al.* (1999) describieron que *R. favelukesii* muestra un crecimiento similar en un rango de pH entre 5,0 y 7,0 en medio GS. De esta forma, en este trabajo de tesis se decidió evaluar el comportamiento de *R. favelukesii* frente a un mayor rango de pHs, incluyendo pHs inferiores a 5,0. Años atrás, diferentes trabajos propusieron identificar y caracterizar cepas tolerantes a la acidez utilizando el *buffer* orgánico MES (Howieson, 1985, Graham *et al.*, 1994, Draghi *et al.*, 2010). Sin embargo, dicho *buffer* es solo efectivo entre pHs de 5,2 a 6,0. Por otro lado, Graham *et al.* (1994) observaron que la combinación de dos *buffers* biológicos, HEPES-MES, reducía las fluctuaciones de pH del medio cuando se desea evaluar valores de pH por debajo de 5,2. Teniendo en cuenta esto, se seleccionó esta combinación de *buffers* (ver Capítulo 2, sección II.1.c.1) que permitiría utilizar la misma composición de medio para todo el rango de pHs a evaluar.

III.2.b. Estudio del crecimiento de *R. favelukesii* en diferentes medios de cultivo en un rango amplio de pHs.

Una vez decidida la composición de *buffers* y medios de cultivo a evaluar, se prosiguió con los ensayos de crecimiento de *R. favelukesii* en los mismos. En principio se realizaron curvas de crecimiento a pH 4,6; 5,0; 5,5; 6,0 y 7,0 en medio GS y en medio EVANS, siempre en cultivos tipo *batch*. En este tipo de cultivo, las bacterias crecen en un entorno donde la velocidad de crecimiento está condicionada al consumo y disponibilidad de nutrientes. Esta condición refleja, a grandes rasgos, el modo en que los microorganismos hacen uso de los recursos naturales, cuando los nutrientes son escasos. El seguimiento del cultivo se realizó a través de la medida de Densidad Óptica (DO) a 600_{nm} en función del tiempo, así como también, el pH de cada cultivo. Cuando *R. favelukesii* creció en medio EVANS, el pH del medio, pese a contener la combinación de *buffers*, presentó incrementos, alcanzando rápidamente valores cercanos a la neutralidad. Hecho que no permitió definir una situación de estrés para *R. favelukesii*. A diferencia del comportamiento observado en

medio EVANS, en el medio GS los valores de pH se mantuvieron estables y el crecimiento de dicho rizobio fue similar en los distintos pHs evaluados (entre 5,0 y 7,0); corroborando así, lo ya descrito por Del Papa *et al.* (1999). Resulta interesante, además, que al estudiar un pH de 4,6, *R. favelukesii* presentó una alteración en la velocidad de crecimiento en comparación con los pHs superiores (Figura III.1 y resultados no mostrados). Con respecto a la variación de pH durante el transcurso del tiempo, el pH presentó fluctuaciones mínimas en el medio GS. En consecuencia, la capacidad *buffer* de la combinación elegida, HEPES-MES, en el medio GS resultó adecuada. Con estos resultados, se decidió avanzar en la respuesta al estrés ácido de *R. favelukesii* utilizando como medio de cultivo GS.

III.2.c. Selección del pH a utilizar como condición de estrés ácido en *R. favelukesii*. Análisis del pH límite en el cual se evidencia crecimiento.

Una vez determinado el medio a utilizar, se procedió a evaluar el valor de pH mínimo que permita el crecimiento de *R. favelukesii*. Para abordarlo, se amplió el rango de pH a evaluar hasta un valor de 4,0. En la sección anterior, el crecimiento de *R. favelukesii* se siguió a través de la medida de DO. Esta medida es válida y muy útil para evidenciar el crecimiento de bacterias, pero no siempre refleja el comportamiento real que ocurre en el cultivo. En este sentido, ha sido descrito previamente que los rizobios pueden aumentar la cantidad de exopolisacárido liberado al medio en condiciones de acidez (Dilworth & Glenn, 1999). Dicho incremento puede generar un aumento en las lecturas de DO, pudiéndose interpretar erróneamente como un incremento en la población bacteriana. Para sortear dichas interferencias, se realizaron curvas de crecimiento de *R. favelukesii* donde, además de la medida de DO, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) en el tiempo, obteniendo así el número de bacterias viables en el cultivo. En la Figura III.1 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas en medio GS a distintos pH. Se observa en esta Figura nuevamente que a pH entre 5,0 y 7,0 este rizobio presenta un crecimiento similar al que se observa a pH 7; de hecho, se extiende este comportamiento hasta un pH de 4,8 inclusive (Figura III.1 paneles A, B, C y D). Se evidencia, además, que *R. favelukesii* a pH 4,0 no presenta crecimiento (panel E). Por otra parte, la Figura III.1 demuestra que, incrementos en la medida de DO son proporcionales al aumento en el número de ufc a todos los pH evaluados. Este último resultado determinó que el seguimiento del crecimiento de *R. favelukesii* mediante DO resulta adecuado para ser utilizado a lo largo de este trabajo.

Para acercarnos con mayor detalle al pH límite de crecimiento de *R. favelukesii*, se evaluó el crecimiento del rizobio en un rango de pHs entre 4,00 y 4,80. En el panel F de la Figura III.1, se puede observar que a pHs inferiores de 4,40 *R. favelukesii* es incapaz de crecer y que por encima de 4,65 crece como si no hubiera estrés ácido. A un valor de pH igual a 4,60, pH intermedio entre 4,40 y 4,65, *R. favelukesii* presenta un crecimiento diferente respecto a los pHs superiores (Figura III.1 panel F, curva marcada en rojo). Cabe destacar también, que con este pH inicial, al realizar el seguimiento del pH durante el crecimiento, se observó un incremento del pH, que coincide temporalmente con el inicio de la fase exponencial.

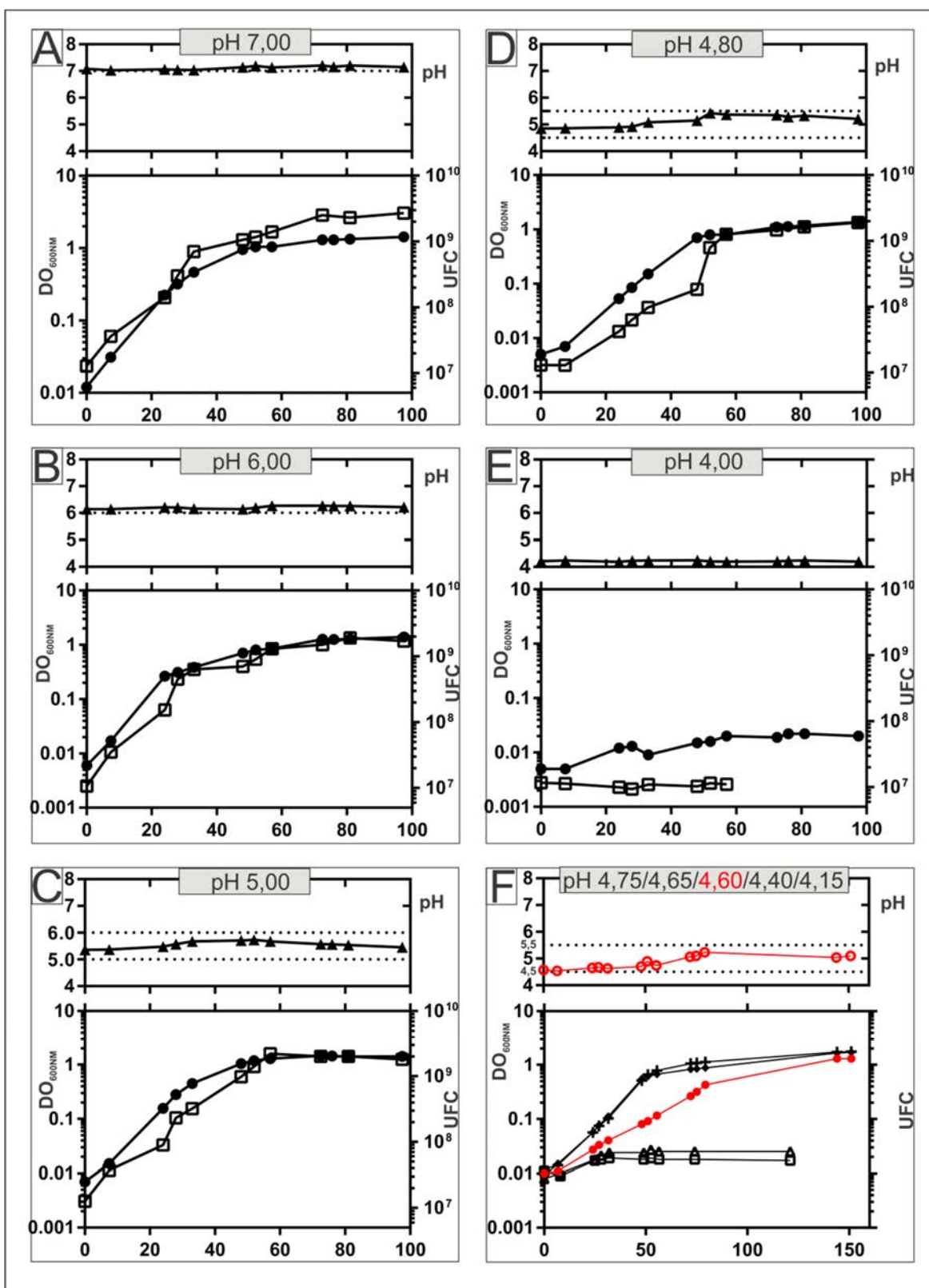


Figura III.1. Curvas de crecimiento de *R. favelukesii* en medio GS a distintos pHs en un rango entre 4,0 y 7,0. Se observa el progreso del número de UFC (Figuras vacías), DO a 600 nm (Figuras llenas) en función del tiempo (cuadrantes inferiores) y la variación de pH en función del tiempo (cuadrantes superiores) a pH 7,0 (panel A); 6,0 (panel B); 5,0 (panel C); 4,8 (panel D); 4,0 (panel E). En el panel F se muestra el progreso de la DO 600nm en función del tiempo a pH 4,15 (cuadrados); 4,40 (triángulos); 4,57 (círculos rojo); 4,65 (rombos); 4,75 (cruces). La variación de pH con el tiempo para el cultivo a pH 4,60 se representa en el cuadrante superior en color rojo.

III.2.d. Determinación de los parámetros cinéticos de la condición de estrés (pH: 4,60).

Puesto en evidencia el pH al cual el crecimiento de *R. favelukesii* se ve alterado, se propuso caracterizar esta condición, determinando el tiempo de duplicación a pH 4,6 y a pH 7,0. Como se mencionó anteriormente, se utiliza como condición de estrés una condición que refleje el límite de acidez bajo el cual los rizobios aún son capaces de sostener su actividad y crecimiento. Esta condición podría ser el valor de pH de 4,6. Para confirmarlo se propuso realizar una caracterización de la cinética de crecimiento a este pH. Considerando los tiempos de crecimiento de los cultivos de *R. favelukesii* en estas condiciones y la necesidad de obtener un mayor número de muestras en el tiempo, se propuso caracterizar dicha cinética realizando las curvas de crecimiento en un lector de microplacas multifuncional que posibilita medidas de manera continua durante un amplio período de tiempo. Esto permitió determinar la tasa de crecimiento con mayor exactitud. En la Figura III.2 se observan las curvas realizadas a ambos pHs donde se evidencia una menor velocidad de crecimiento a pH 4,6, confirmando los resultados anteriormente descritos. Al calcular los tiempos de duplicación para cada una de las condiciones, *R. favelukesii* mostró tener un tiempo de duplicación significativamente mayor a pH 4,6 que a pH 7,0 (Figura III.2, Tabla).

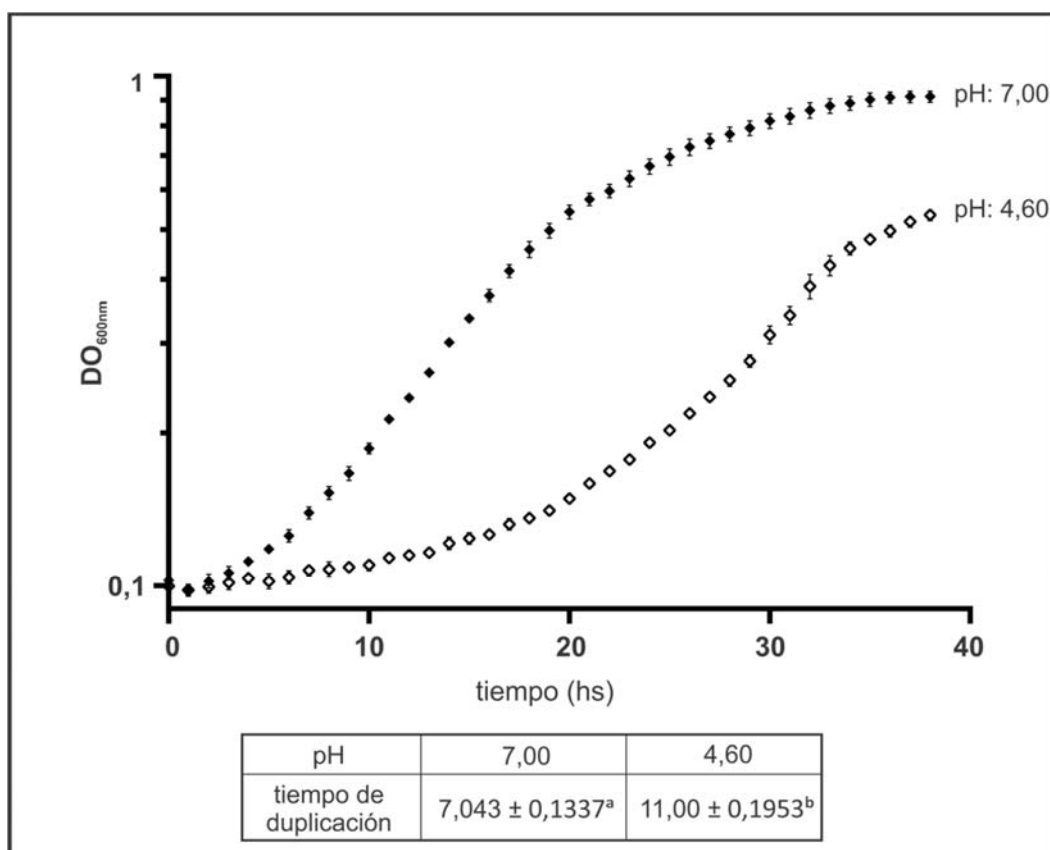


Figura III.2. Determinación del tiempo de duplicación de *R. favelukesii* a diferentes pHs. Se presenta la variación de DO a 600 nm en función del tiempo a pH: 7,0 (rombos rellenos) y a pH 4,6 (rombos vacíos). En la Tabla inferior se muestran los valores de los tiempos de duplicación para cada pH siendo los mismos significativamente diferenciales ($p\text{-value} < 0,0001$).

III.2.e. Avance en la caracterización de la tolerancia a acidez. Estudios en bioreactores a pH constante.

Como hemos mencionado anteriormente, *R. favelukesii* produce una alcalinización del medio extracelular cuando se lo cultiva a pHs bajos. Esto llevó a pensar si *R. favelukesii* debe necesariamente modificar el pH del medio, de manera de aumentar el pH para luego crecer, o bien si directamente es capaz de crecer en pHs cercanos a 4,6 y la alcalinización se debe a subproductos secretados al medio de cultivo. Dilucidar cuál de estas dos opciones es la correcta abre una puerta hacia el conocimiento del mecanismo utilizado para su tolerancia a la acidez.

En consecuencia, se prosiguió a avanzar en el estudio sobre este comportamiento a través de cultivos de *R. favelukesii* en *batch* pero con pH controlado en un bioreactor. De este modo, se realizaron dos curvas de crecimiento en medio GS a pH 4,6 y manteniendo el valor constante. El crecimiento de *R. favelukesii* en el bioreactor, sin mantener el pH constante fue previamente constatado. En los resultados que se muestran en la Figura III.3 se evidencia que *R. favelukesii* es capaz de crecer a pH 4,6 incluso si no modifica la concentración de protones en el medio de cultivo. En consecuencia, la alcalinización del medio debe producirse por compuestos que sean secretados durante el crecimiento, consecuencia del metabolismo en acidez.

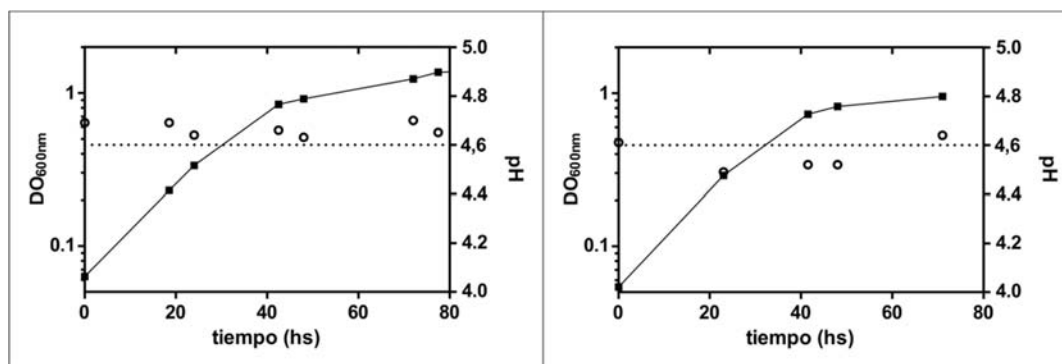


Figura III.3. Curvas de crecimiento de *R. favelukesii* manteniendo la concentración de protones constante en bioreactor. Se muestra el progreso de la DO 600nm (línea continua) y el pH (círculos vacíos) en función del tiempo. La línea punteada indica el pH programado en el equipo.

III.2.f. Análisis de la cinética de muerte de *R. favelukesii* a pH inferiores de 4,6.

Si bien existen rizobios caracterizados como tolerantes a la acidez, ante determinados valores de pH se puede producir la muerte del rizobio. Un parámetro interesante a caracterizar es la cinética de muerte frente al estrés ácido. Así, con el objetivo de avanzar en el estudio del comportamiento de *R. favelukesii* en condiciones ácidas, se decidió evaluar su cinética de muerte a pHs inferiores a 4,6 (menor pH de crecimiento). Por consiguiente, se analizó el progreso de las ufc en el tiempo a distintos pHs: 3,0; 3,5 y 4,0. Como control se realizó la sobrevida a pH 7,0.

La diferencia en la velocidad de muerte se puede evaluar comparando el valor absoluto de las pendientes de las rectas del log (ufc/ml) en función del tiempo post-estrés ácido. En la Figura III.4.A se puede observar que cuando el choque ácido se realiza a pH 3,5 o 4,0, *R. favelukesii* presenta una disminución considerable

en el número de ufc a través del tiempo, siendo mayor esta disminución cuanto menor es el pH. Las pendientes encontradas fueron más negativas cuanto menor es el pH. En el caso de pH 3,0 el número de ufc decae abruptamente (a tiempo cero ya se evidencia un decaimiento en el número de viables, comparar posición de doble flecha roja con flecha verde), alcanzando un número menor a 10^5 ufc/ml en menos de 2 hs, resultados que se reflejan claramente en la Figura III.4.B.

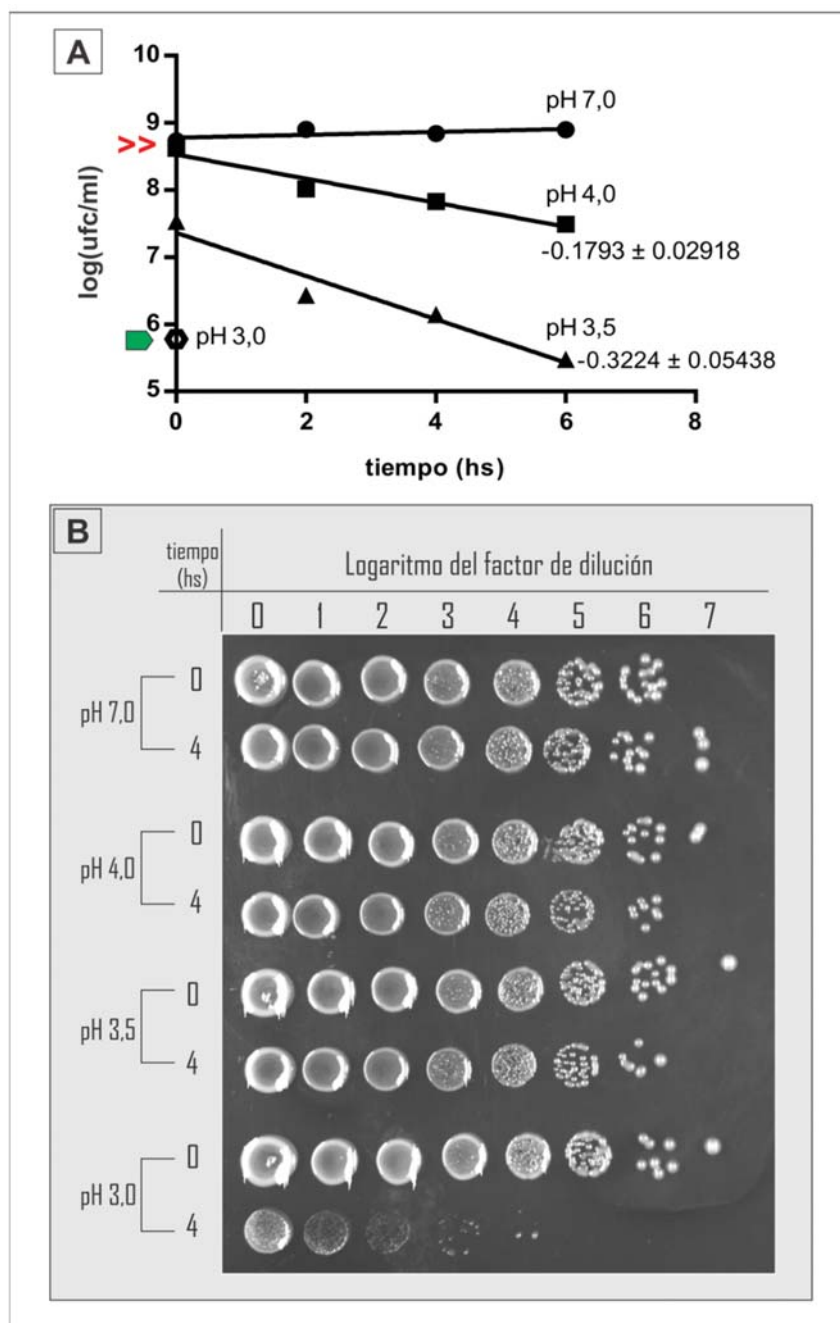


Figura III.4. Cinética de muerte para *R. favelukesii* a pHs inferiores a 4,0. A. Se muestra la variación del log (ufc/ml) en el tiempo después del estrés ácido. Las células se expusieron a pH 3,0 (círculo vacío); 3,5 (triángulo); o 4,0 (cuadrado). Se muestra como control el comportamiento cuando se exponen las células a pH neutro (círculos rellenos). La doble flecha roja indica el número de viables iniciales antes de la exposición al pH ácido. La flecha verde indica el número de viables a "tiempo cero" a pH 3,0. B. Se muestra una alícuota del cultivo de células en el momento previo (tiempo 0) y posterior a la exposición durante 4 hs (tiempo 4) al estrés ácido para cada pH. En cada fila, se muestra una gota de cada dilución 1/10 seriada plaqueadas en medio TY.

En este capítulo se avanzó en la caracterización del comportamiento de *R. favelukesii* cuando se lo somete a condiciones ácidas. Este hecho permitió establecer la condición de estrés, elemento base a la hora de abordar el estudio funcional de su tolerancia a la acidez. Se evaluó así, la capacidad de crecimiento en dos medios definidos a distintos pHs, quedando determinado el medio GS como medio a utilizar en los subsiguientes estudios. Asimismo, se puso de manifiesto que *R. favelukesii* es capaz de crecer de manera similar en un rango de pH entre 4,8 y 7,0. A valores de pH por debajo de 4,4, *R. favelukesii* no presenta crecimiento. Si se analiza el comportamiento a pHs inferiores de 4,0, el número de células viables comienza a disminuir con el tiempo de exposición al estrés. A partir de estos resultados, se pudo identificar una condición de estrés ácido donde la cinética de crecimiento es significativamente menor con respecto a la del pH neutro. De esta manera se obtuvo una condición donde las células de *R. favelukesii* se encuentran estresadas frente al medio extracelular, pero continúan aun duplicándose. De este modo, quedó definida la condición de estrés ácido a utilizar a lo largo de este trabajo, siendo la misma un valor de pH igual a 4,6. Conjuntamente, a raíz de estos experimentos, se encontró que *R. favelukesii* es capaz de modificar el pH del medio extracelular, aumentando el pH del medio durante su crecimiento a pHs entre 4,5 y 5,0. Este incremento, sin embargo, no es condición necesaria para que *R. favelukesii* crezca en dichos pHs. Esto induce a pensar que *R. favelukesii* podría involucrar, entre los posibles mecanismos de tolerancia a la acidez, la liberación al medio de compuestos que consuman protones del medio extracelular.

En el próximo capítulo, a fin de avanzar en la caracterización de la respuesta a la acidez de *R. favelukesii*, realizaremos un análisis de la respuesta global del proteoma, de manera de dilucidar los mecanismos involucrados en la tolerancia a la acidez en dicho rizobio.

CAPÍTULO IV

BÚSQUEDA DE DETERMINANTES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA A LA ACIDEZ EN *RHIZOBIUM FAVELUKESII* A TRAVÉS DE ANÁLISIS PROTEÓMICOS

IV.1. Introducción.

Los métodos de secuenciación masiva han avanzado hacia técnicas de segunda generación, lo que también trajo aparejado avances en *software* de anotación automática. Estos avances han tenido un gran impacto en el número de genomas microbianos disponibles. Gracias a esto, se abre la posibilidad de ampliar los estudios fenotípicos a nivel molecular de manera global. En este sentido, la mayoría de los estreses generan una respuesta pleiotrópica en las células expuestas a los mismos. Este tipo de respuestas de acción multigénica apoyan el uso de aproximaciones experimentales hacia técnicas que permitan observar cambios globales en la expresión de las diferentes macromoléculas responsables del fenotipo celular. Con respecto a la tolerancia al estrés ácido, en las últimas décadas, un enfoque muy utilizado para identificar componentes asociados a dicha respuesta involucró el uso de bibliotecas de mutantes Tn5, de manera de encontrar mutantes que resulten sensibles a la acidez (Goss *et al.*, 1990). Como resultado, se hallaron varios mutantes sensibles a la acidez, poniendo de manifiesto que son varios los genes implicados, entre ellos los genes *actA*, *actR/S*, *actP*, *exoH*, *phrR* y *lpiA* (Chen *et al.*, 1993, Glenn & Dilworth, 1994, Tiwari *et al.*, 1996, Reeve *et al.*, 1998, Reeve *et al.*, 1999, Reeve *et al.*, 2002, Fenner, 2004, Reeve, 2006). La respuesta al estrés ácido en bacterias esta mediada generalmente por la síntesis de proteínas *de novo*, las cuales serán las encargadas de conferir nuevas características a la célula (Foster & Hall, 1991). En vista de esta característica funcional, la utilización de técnicas que permitan obtener un perfil de expresión proteico de las células creciendo en condiciones diferenciales de pH, brinda la posibilidad de obtener un mapa que refleje las funciones celulares implicadas en la respuesta al factor de estrés. En esta dirección, la obtención de los proteomas de células procariotas sometidas a diferentes factores de estrés, es una de las aproximaciones que ha permitido la resolución de los mecanismos bioquímicos/fisiológicos comprometidos en determinadas respuestas (Gunawardena *et al.*, 2013, Heunis *et al.*, 2014, Otto *et al.*, 2014). Los análisis proteómicos han evolucionado sustancialmente en los últimos 20 años, primero mediante los análisis de geles bidimensionales para luego utilizar técnicas proteómicas de alto rendimiento, libre de geles, como la técnica de *shotgun proteomics*. Estas últimas otorgan una herramienta poderosa para identificar y caracterizar las variaciones del proteoma como consecuencia de la interacción de los microorganismos con el ambiente. En la actualidad, el enfoque principal de la proteómica de bacterias consiste en el uso de herramientas cuantitativas para analizar cambios en la abundancia de proteínas medidas frente a cambios en las condiciones de cultivo (Van Oudenhove & Devreese, 2013). En este capítulo, a través de herramientas proteómicas se estudiará la respuesta de las proteínas en su conjunto a las condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*.

IV.2. Análisis comparativo de los perfiles proteicos de *R. favelukesii* ante un estrés ácido por medio de geles 2D.

Como se ha desarrollado en el capítulo anterior, el crecimiento de *R. favelukesii* se ve afectado a un pH de 4,6, evidenciando que dicho pH representa una condición de estrés para las células. En consecuencia, se seleccionó esta misma condición para realizar la caracterización proteómica a fin de identificar nuevos determinantes.

Como primera aproximación, se realizó una comparación del contenido proteico de las células de *R. favelukesii* crecidas en cultivos *batch* a pH 4,6 y 7,0, en geles de proteínas uni- y bi-dimensionales. De cada condición se obtuvieron dos fracciones proteicas, por un lado, la fracción enriquecida en proteínas citosólicas y por otro la fracción enriquecida en proteínas de membrana. El perfil proteico de ambas fracciones para cada condición se evidenció, en primera instancia, en geles unidimensionales. La Figura IV.1 muestra el patrón de bandas obtenido para todas las fracciones. Al comparar a simple vista dichos patrones se pueden evidenciar diferencias en la expresión proteica en las condiciones elegidas (flechas en la Figura IV.1). Estas evidencias ponen de manifiesto que la condición elegida como condición estrés presenta diferencias en el fenotipo al compararla con la condición control.

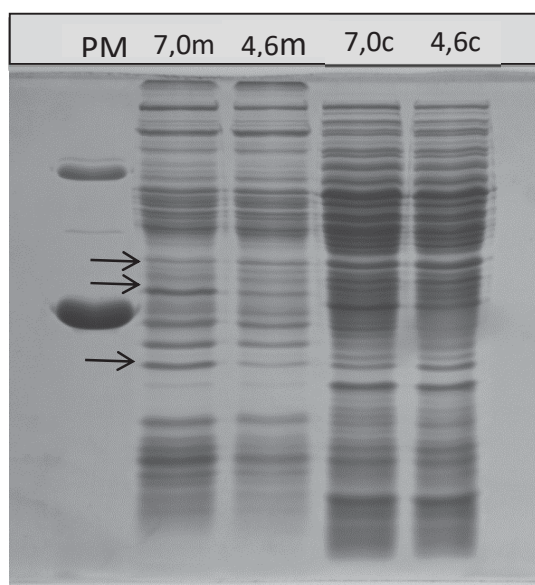


Figura IV.1. SDS-PAGE unidimensional de las fracciones proteicas de *R. favelukesii* en condiciones neutras y de acidez. La Figura corresponde a un gel de poliacrilamida 13% con SDS. Se sembraron para cada condición, pH 7,0 (calles 2 y 4) y pH 4,6 (calles 3 y 5), las fracciones proteicas enriquecidas en proteínas de membrana (m) y en proteínas citosólicas (c). La primera calle contiene un marcador de PM: 33 KDa y 65 KDa. Este gel es representativo de 3 geles obtenidos de 3 réplicas biológicas independientes.

A raíz de estos resultados, se decidió profundizar en la respuesta de la expresión proteica al estrés ácido de *R. favelukesii*, centrando el análisis con una mirada más detallada en las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana, ya que presentaron diferencias evidentes en los perfiles proteicos en los geles unidimensionales. En este análisis se utilizó como técnica de separación una electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D SDS-PAGE) de alta resolución. En la Figura IV.2 se muestran los geles de poliacrilamida correspondientes a las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana de *R. favelukesii*

bajo estrés ácido o en condiciones de neutralidad. Mediante un análisis visual de los *spots* presentes en cada gel se encontraron 35 *spots* sobre-expresados en acidez y 29 sobre-expresados en neutralidad (Figura IV.2). Esta técnica permitió evidenciar el cambio global de la expresión en las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana de las células de *R. favelukesii* cuando son cultivadas en condiciones de acidez. Sin embargo, pese a varios intentos de identificar los *spot* diferenciales, a través del espectrómetro de masas MALDI-TOF, no se obtuvieron buenos resultados. Este hecho, sumado a la disponibilidad de realizar un análisis utilizando la técnica *shotgun proteomics*, impulsó a continuar la caracterización de las proteínas expresadas diferencialmente a través de espectrometría de masas de alta resolución (Orbitrap).

IV.3. Análisis proteómico en condiciones de estrés ácido de R. favelukesii LPU83 a través de espectrometría de masas de alta resolución, Orbitrap.

A través de un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap es posible identificar y cuantificar en simultáneo un gran número de proteínas de manera representativa y significativa contenidas en una muestra compleja. En este trabajo, se utilizó esta tecnología para poder analizar en mayor profundidad las proteínas expresadas diferencialmente bajo el estrés ácido. De manera de identificar así, los factores relevantes en la tolerancia a la acidez de *R. favelukesii*. En este análisis se utilizaron las mismas fracciones proteicas que se sembraron en los geles realizados previamente. Para su análisis se utilizó un nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap mediante el método *label free quantification* (Shalit *et al.*, 2015). El esquema de trabajo realizado con dichas muestras se ilustra en la Figura II.4 en la sección de materiales y métodos.

IV.3.a. Respuesta global del proteoma de R. favelukesii al estrés ácido.

A través de la tecnología descrita anteriormente, se obtuvo la respuesta global del proteoma de *R. favelukesii* al estrés ácido. Como resultado de este análisis se obtuvieron un total de 2391 proteínas identificadas en la fracción citosólica y 3107 proteínas identificadas en la fracción enriquecida en proteínas de membrana. Considerando ambas fracciones, un total de 3606 proteínas fueron identificadas (1928 de las proteínas identificadas fueron detectadas en ambas fracciones). Estas proteínas representan el 45,65 % del total de CDS anotados en el genoma de *R. favelukesii* LPU83. Como se esperaba, y en concordancia con lo descrito en los geles bidimensionales, un gran número de proteínas presentaron una expresión diferencial en las condiciones evaluadas.

Dentro de las proteínas que se detectaron con una expresión alterada en condiciones de acidez, se seleccionó un subgrupo de ellas que cumplieran con un criterio impuesto sobre el límite del valor estadístico, un *p-value* $\leq 0,05$ y además presentarían un cambio mínimo en la tasa de expresión de 2 (Figura IV.3). De esta manera las proteínas que cumplieron ambas condiciones se consideraron como expresadas diferencialmente

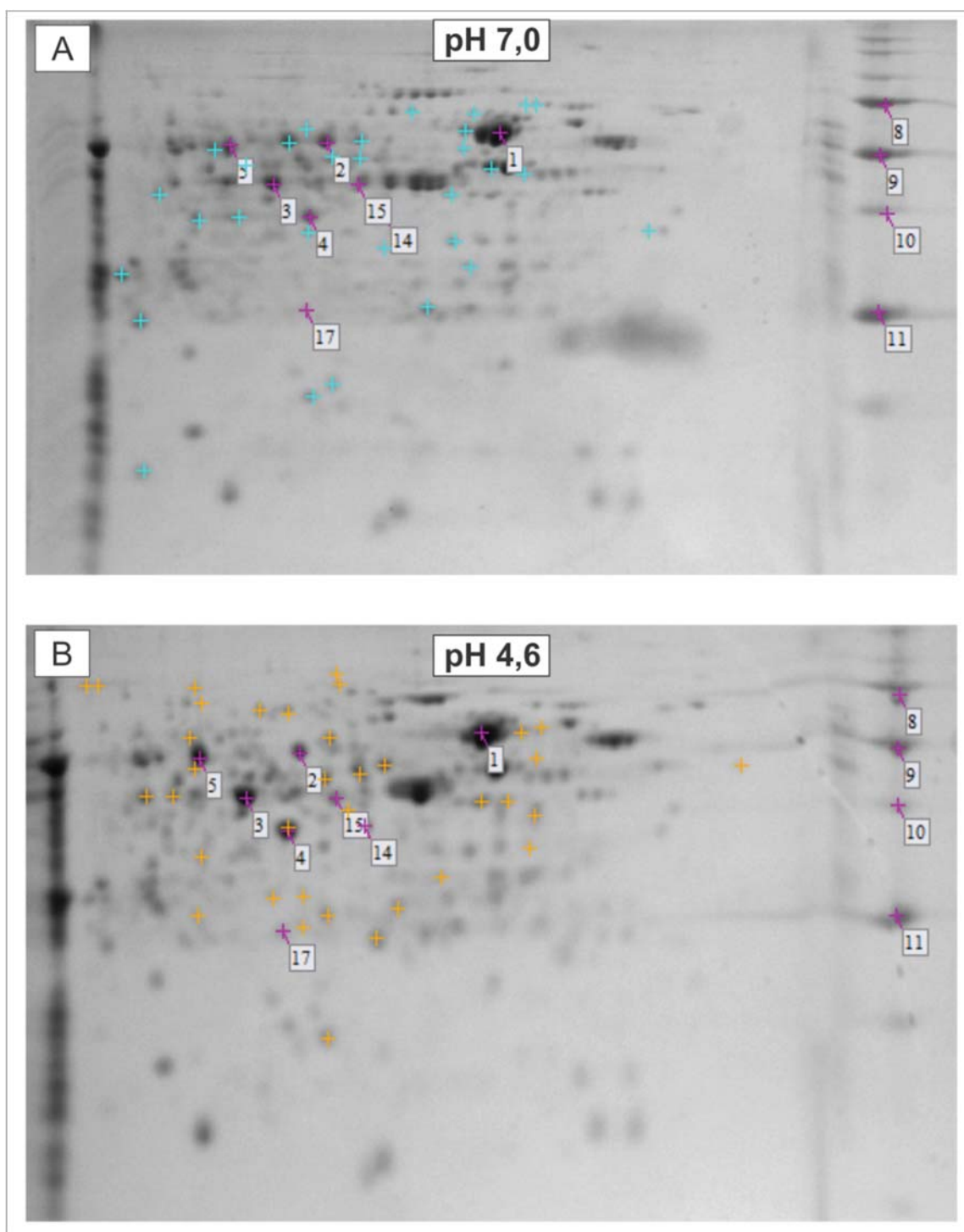


Figura IV. 2. Geles bidimensionales de proteínas de membrana de *R. favelukesii* en condiciones control y bajo estrés ácido. Se muestra el perfil proteómico de la fracción enriquecida en proteínas de membrana a pH 7,0 (A) y a pH 4,6 (B). En ambas imágenes se marcan en púrpura y numerados referentes utilizados como patrones coincidentes, de manera de que resulte más fácil la observación. Los spots identificados de manera diferencial con mayor expresión en neutralidad se señalan con cruces celestes y en acidez con cruces naranjas. Ambos geles son representativos de tres geles realizados con replicas biológicas independientes para cada condición.

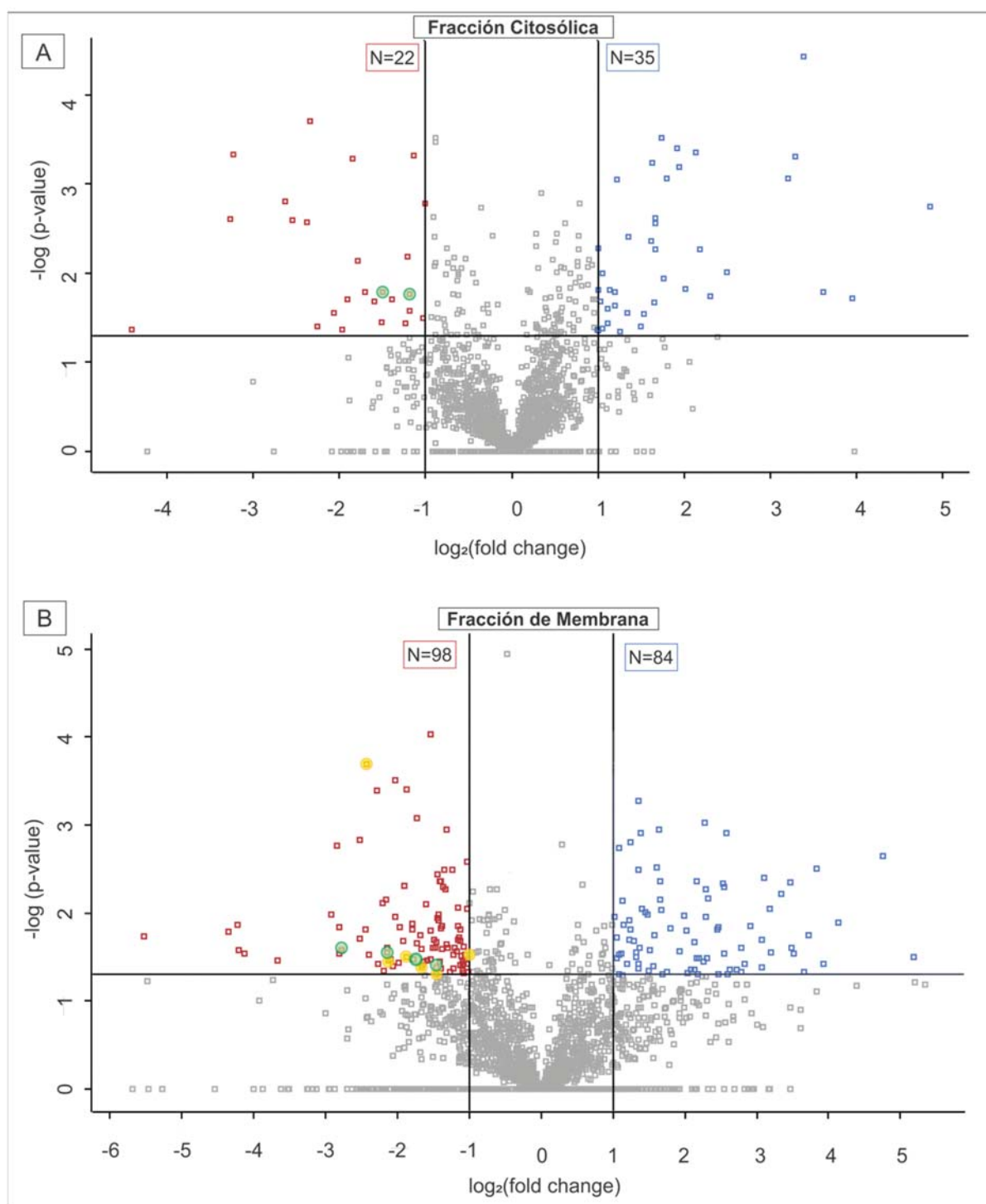


Figura IV. 3. Representación de la razón de cambio en función del valor de p -value de las proteínas expresadas diferencialmente en *R. favelukesii* en condiciones de acidez. Se muestra la distribución del logaritmo de la razón de cambio ($\log_2\text{foldchange}$) en la expresión de las proteínas en función del logaritmo del p -value (t-test) para cada una fracción enriquecida en proteínas citosólicas (A) y enriquecida en proteínas de membrana (B). Los cuadrados contenidos dentro del cuadrante izquierdo superior representan proteínas con una mayor abundancia en condiciones de acidez de manera significativa (rojos) y los contenidos dentro del cuadrante derecho superior representan proteínas con una menor abundancia en las mismas condiciones (azul). Los círculos representan proteínas implicadas en el metabolismo del azufre (amarillo) y del complejo I de la fosforilación oxidativa (verde).

y presumiblemente asociadas a la respuesta celular en condiciones de acidez. De este modo, teniendo en cuenta ambas fracciones, se detectaron con este criterio un total de 336 proteínas con una expresión diferencial significativa (proteínas expresadas diferencialmente, PED). Entre estas 336 PED, 120 se detectaron como sobre-expresadas y 119 inhibidas en acidez (Tabla A.1). Además, se incluyeron en el análisis aquellas proteínas que fueron detectadas únicamente en una condición (presente en todas las réplicas biológicas) y no en la otra (ausente en todas las réplicas de la otra condición). Estas proteínas se denominaron proteínas ON/OFF. De estas proteínas ON/OFF, se encontraron 81 PED únicamente a pH 7,0 y 16 únicamente a pH 4,6 (Tabla A.1). Al analizar la localización genómica de los genes que codifican a estas 336 proteínas, se encontró que la mayoría se hallan localizadas en el cromosoma (Figura IV.4.A). Si el número de proteínas diferenciales ubicadas en cada replicón se normaliza por el total de CDS que contiene cada replicón, se encuentra un resultado similar. Se puede observar, además, que esta relación es pareja en los plásmidos, exceptuando el pLPU83b. (Figura IV.4B).

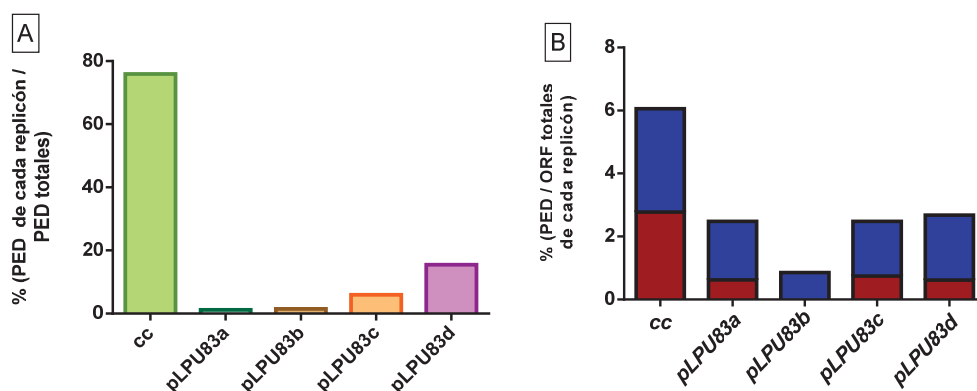


Figura IV.4. Distribución genómica de las proteínas expresadas diferencialmente en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*.

A) Se representa el porcentaje de PED de cada replicón sobre el número total de PED totales **B)** Porcentaje de PED de cada replicón sobre el número total de ORF de cada replicón. Se muestra en azul la proporción de PED inhibidas y en rojo las sobre-expresadas.

IV.3.b. Análisis in silico de las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente.

A fin de explorar las posibles relaciones funcionales que permitan explicar la presencia de las diferentes proteínas observadas en el contexto de respuesta a la nueva condición de estrés, se analizó la función bioquímica de cada una de las PED. Con este fin, las PED se agruparon de acuerdo a su pertenencia a los grupos de genes ortólogos (COGs, *Cluster of Orthologous Groups of proteins*) (Tatusov *et al.*, 2000, Tatusov *et al.*, 2003) (Tabla V.1). Dichos grupos incluyen a las proteínas en categorías funcionales teniendo en cuenta las relaciones ortólogas entre las mismas, asumiendo que dichas proteínas evolucionaron a partir de un ancestro común a través de eventos de duplicación y especiación.

Como puede observarse en la Figura IV.5, la categoría funcional relacionada con el transporte y metabolismo de los aminoácidos (COG E) es la que contiene una mayor cantidad de PED sobre-expresadas en condiciones de acidez. Asimismo, también se observa un mayor porcentaje de PED sobre-expresadas en acidez relacionadas con la producción y conversión de energía (COG C). Otra categoría funcional que agrupó varias PED, con una mayor abundancia en acidez, se encuentra relacionada con el recambio (*turnover*) de

proteínas, chaperonas y modificaciones postraduccionales (COG O). Por otro lado, entre las categorías que contuvieron un mayor número de PED inhibidas en acidez, se encuentran las relacionadas con transcripción (COG K), traducción (COG J), metabolismo de coenzimas (COG H), transporte de iones inorgánicos (COG P) y el grupo de funciones generales (COG R). Resulta interesante destacar, además, que al realizar este análisis se encontró que un número relevante de PED que corresponden a proteínas hipotéticas (59 de las 336 PED), cuya función es desconocida.

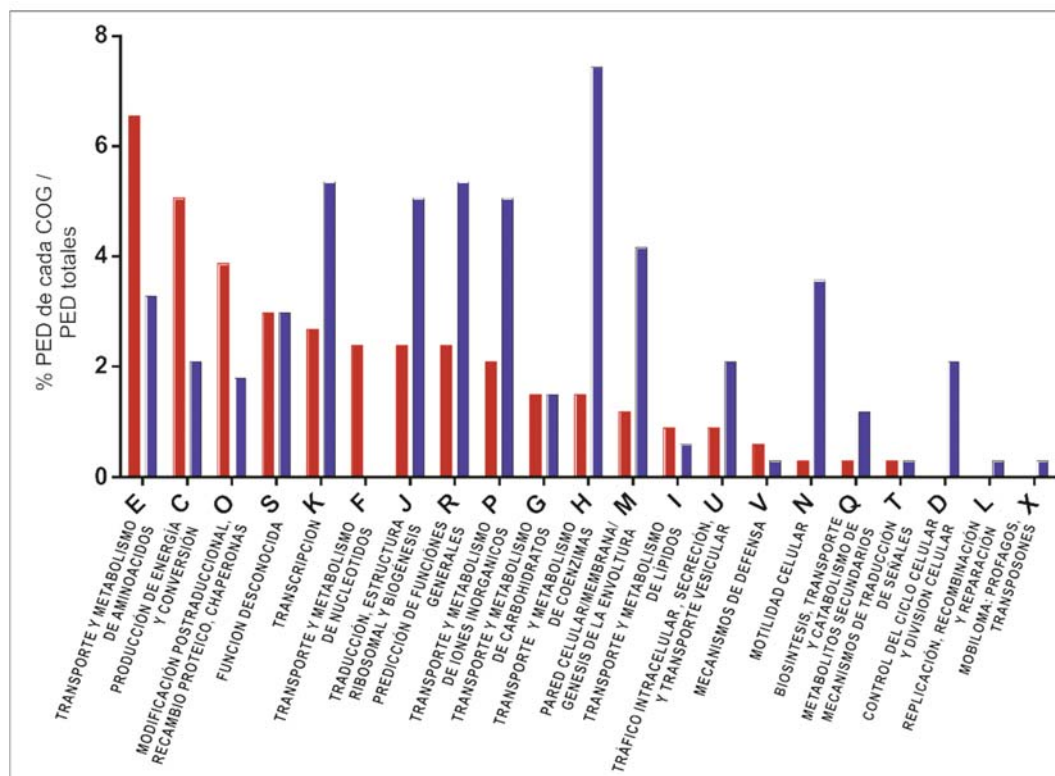


Figura IV. 5. Representación de las diferentes categorías de productos ortólogos (COGs) en que se agrupan las proteínas expresadas diferencialmente en los cultivos de *R. favelukesii*. Las barras azules corresponden a las PED sobre-expresadas en la condición neutra (inhibidas en acidez). Las barras rojas corresponden a las PED sobre-expresadas en la condición ácida.

Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento sobre las categorías funcionales e interacciones proteína-proteína de las PED utilizando la herramienta bioinformática STRING (Goss, 1851). STRING es una base de datos de interacciones, conocidas y predichas, proteína-proteína. A través de esta base de datos es posible predecir las interacciones proteína-proteína presentes un grupo de proteínas, como, por ejemplo, participación en la misma vía metabólica o proceso celular, contexto genómico, co-expresión y/o datos de la literatura (<https://string-db.org>). De esta manera, se realizó un análisis para cada grupo de proteínas, sobre-expresadas o inhibidas, de manera de predecir las interacciones proteína-proteína presentes en cada grupo. En la Figura IV.6 y IV.7 se muestran las redes de asociaciones predichas para las PED en acidez en *R. favelukesii*. El análisis evidenció un enriquecimiento significativo de varias vías metabólicas (*KEGG pathway*). Ejemplos de dichas vías son: el metabolismo del azufre, la biosíntesis de histidina, la fosforilación oxidativa, entre otros (Figura IV.6 y IV.7).

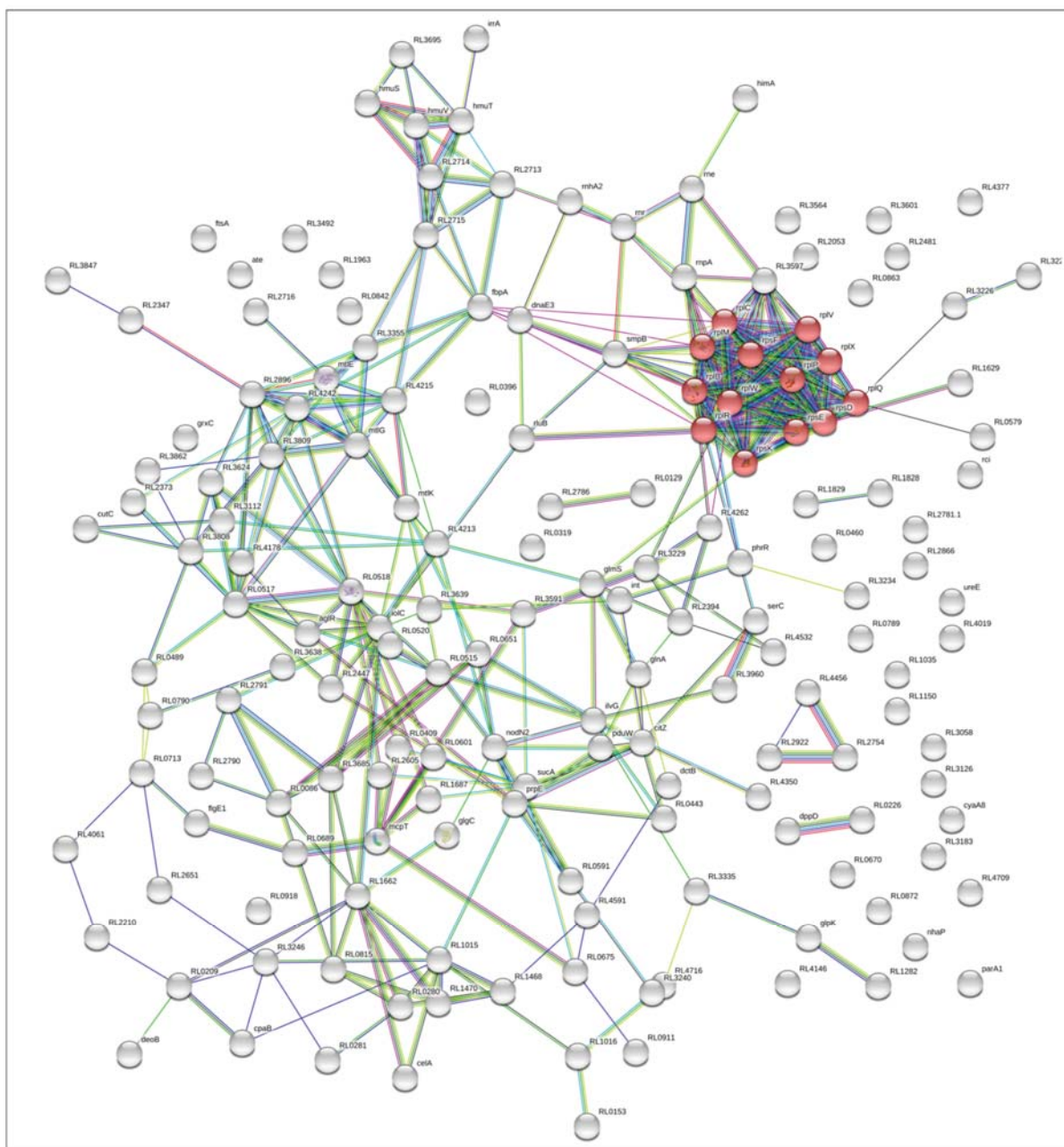


Figura IV.6. Red de interacciones de las proteínas con menor expresión en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*. Cada nodo corresponde a una PED. En particular, los nodos coloreados muestran el conjunto de proteínas de una determinada vía metabólica enriquecida en interacciones de manera significativa. Rojo: proteínas ribosomales. B) Red correspondiente a las PED sobre-expresadas en acidez. Violeta: fosforilación oxidativa, rojo: metabolismo de histidina, amarillo: metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, azul: metabolismo de azufre, celeste: transportadores ABC. FDR (*false discovery rate*): $2,36 \times 10^{-06}$, 0,00214; 0,00447; 0,0486 y 0,0496 respectivamente.

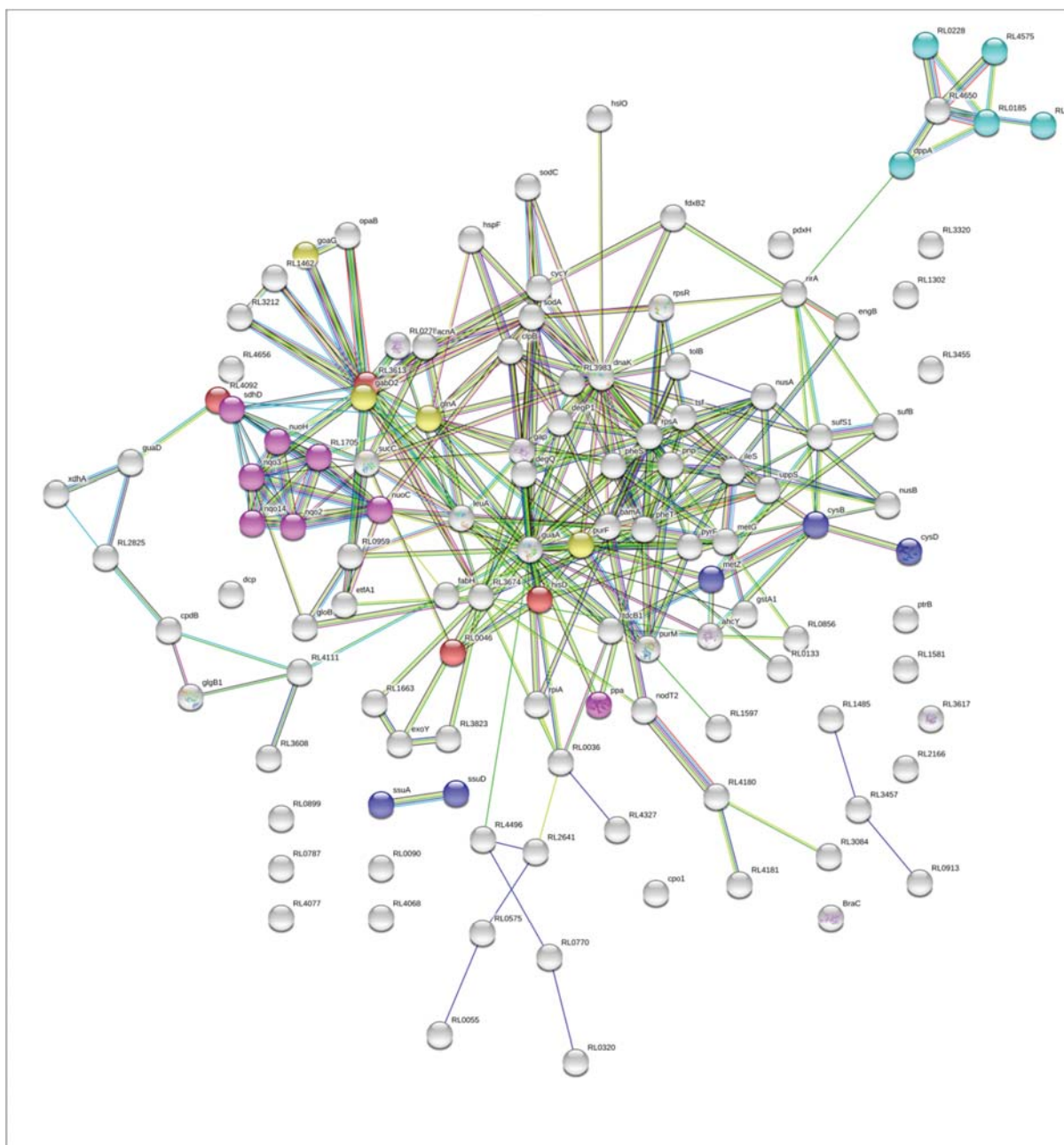


Figura IV.7. Red de interacciones de las proteínas sobre-expresadas diferencialmente en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*. Cada uno de los nodos corresponde a una PED. En particular, los nodos coloreados muestran el conjunto de proteínas de una determinada vía metabólica enriquecida en interacciones de manera significativa. A) Red correspondiente a las PED inhibidas en acidez. Rojo: proteínas ribosomales. Violeta: fosforilación oxidativa, rojo: metabolismo de histidina, amarillo: metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, azul: metabolismo de azufre, celeste: transportadores ABC. FDR (*false discovery rate*): $2,36 \times 10^{-6}$, 0,00214; 0,00447; 0,0486 y 0,0496 respectivamente.

Luego de realizar estos estudios globales sobre las PED y con el propósito de caracterizar en detalle el conjunto de funciones bioquímicas cuya actividad es regulada por el pH del medio extracelular, se procedió a describir el comportamiento de determinadas PED correspondientes a las funciones de mayor relevancia.

Proteínas involucradas en la respiración celular.

Existen reportes de alteraciones en la respiración celular en condiciones de estrés ácido. Draghi *et. al.* (2016) describieron un aumento de la respiración aeróbica en rizobios durante el crecimiento en cultivo continuo bajo condiciones de estrés ácido. Dichas células presentaron un incremento en el consumo de

oxígeno 5 veces mayor a pH 6,1 que a pH neutro. Al contrario, Yuan *et al.* (2008) mostraron que, en *A. tumefaciens*, cultivada en *batch*, varios genes involucrados en la respiración, en el metabolismo energético y en la transferencia de electrones, fueron reprimidos bajo condiciones de acidez, infiriendo que dicha disminución podría contribuir a reducir el estrés oxidativo asociado al estrés ácido.

En *R. favelukesii*, 23 de las PED se agruparon en la categoría funcional de conversión y producción de energía (COG C, Figura IV.5). Entre estas proteínas, 6 pertenecen a subunidades del complejo I, asociado a membrana, de la NADH deshidrogenasa: NuoC, NuoE, NuoF, NuoG, NuoH, NuoL. Estas 6 proteínas presentaron una mayor expresión en condiciones de acidez. Asimismo, dos proteínas pertenecientes al complejo II, la succinato deshidrogenasa (*sdhD*) y la subunidad alfa de una flavoproteína que realiza transferencia de electrones (*eftA*), se encontraron en mayor abundancia bajo condiciones de estrés ácido. Estos resultados sugieren que ambos pasos del transporte/captación de electrones están estimulados en respuesta a la presencia de una alta concentración de protones en el medio extracelular en *R. favelukesii*. Sumado a estas proteínas, la proteína que otorga el fosforo inorgánico para la producción de ATP tuvo una mayor expresión en condiciones de acidez. Esta proteína es una pirofosfatasa inorgánica (LPU83_3943) y está relacionada con el complejo ATP sintasa (complejo V). Comparando estos resultados con lo obtenidos en *E. meliloti* y *A. tumefaciens*, descritos previamente, parecería que en *R. favelukesii* satisfacer la demanda energética en condiciones de estrés ácido resulta determinante para soportar las altas concentraciones de protones, equiparándose a lo que sucede en *E. meliloti*.

Otros factores involucrados en la fosforilación oxidativa también han sido descritos por modificar su expresión bajo condiciones de estrés ácido. En este sentido, estudios previos han sugerido que minimizar la extrusión de protones de la cadena transportadora de electrones puede ser un mecanismo alternativo para reducir la acidificación externa (Slonczewski & Foster, 1996). En *E. coli* dos ubiquinol oxidasas catalizan la misma reacción redox, pero se diferencian en un factor de dos en su eficiencia de acoplamiento de energía. De esta manera, controlando la expresión relativa de estas dos enzimas, la bacteria puede cambiar entre estados de alta y baja eficiencia de la conservación de energía (Puustinen, 1991). El complejo citocromo *bd* posee una subunidad con una oxidasa alternativa con alta afinidad por el oxígeno. En *E. coli*, ha sido descrito que esta enzima se expresa en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, así como también en condiciones de estrés ácido (Cotter *et al.*, 1990). En *E. meliloti*, esta oxidasa no se encontró estimulada bajo condiciones de estrés ácido, sin embargo, una citocromo oxidasa de alta afinidad por el O₂, FixN, fue propuesta como oxidasa alternativa al encontrarse sobre-expresada en condiciones de acidez (Tiwari *et al.*, 2004). En *R. favelukesii*, la expresión de la subunidad I del complejo citocromo *bd* (*cydA*) fue menor a pH ácido. Por otro lado, FixN no presentó una expresión diferencial. Sin embargo, entre las PED con mayor abundancia en acidez, hay varias proteínas con dominio oxidasa, por lo que no descartamos la posibilidad de que exista alguna otra oxidasa alternativa como respuesta al estrés ácido actuando en *R. favelukesii*.

Proteínas involucradas en el metabolismo del carbono.

Diferentes proteínas involucradas en el metabolismo de carbono de *R. favelukesii* presentaron una expresión diferencial en condiciones de acidez. La ribosa-5-fosfata isomerasa A, proteína involucrada en la ruta de las pentosas fosfato, que transforma la ribulosa-5-fosfato a ribosa-5-fosfato, presentó mayor abundancia ante el estrés ácido. Otra proteína que se detectó en mayor proporción fue la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (LPU83_3468). En este sentido, no se encontraron otras proteínas que presenten una expresión diferencial, más allá de esta última, involucradas en la glicólisis. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente, en *E. meliloti*, por Draghi *et al.* (2016), donde se evidenció que la vía de las pentosas fosfato se encuentra estimulada en acidez.

Por otro lado, enzimas asociadas al metabolismo del piruvato, también se vieron afectadas en su nivel de expresión durante el crecimiento de *R. favelukesii* en condiciones de estrés ácido. Entre estas enzimas se encontró una acetato kinasa (*ackA*, LPU83_2069) que presentó una menor expresión en acidez. Dicha enzima, cataliza la reacción de acetil-fosfato a acetato. Asimismo, una enzima que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato a fosfona piruvato (LPU83_0515) también presentó una menor expresión en estas condiciones. Por otro lado, una proteína que produce lactato mostró un incremento en su expresión en condiciones de acidez. Dicha enzima es una hidroxil-acil-glutation hidrolasa (*gloB*, LPU83_3838) que produce la hidrólisis de S-lactoil-glutation dando como producto lactato y glutatión. En este sentido, en *Lactobacillus plantarum* 423, ha sido descrito previamente que la enzima acetato kinasa 1 fue menos abundante bajo condiciones de acidez y fue propuesto que la cantidad de acetil-fosfato acumulado podría aumentar en condiciones de acidez, funcionando como una reserva de fosfato donador en estas condiciones (Heunis *et al.*, 2014). Sumado a esto, una disminución en la producción de acetato podría contribuir a disminuir los compuestos ácidos presentes en el medio. Por otro lado, la enzima que produce lactato, que se encuentra sobre-expresada, podría estar más relacionada al rol del glutatión en la respuesta al estrés oxidativo, o podría estar utilizándose el lactato como destino del carbono en exceso, más que por la síntesis de lactato en sí, como fue descrito por Draghi *et al.* (2016).

Por otro lado, enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) también mostraron tener una expresión diferencial como respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. En este sentido, tres proteínas, codificadas por los genes *acnA* (LPU83_3973), *sucC* (LPU83_3919) y *sdhD* (LPU83_3925), fueron sobre-expresadas en condiciones de acidez. Dichas proteínas catalizan las reacciones de citrato a isocitrato (reacción reversible), succinil-coA a succinato; y succinato a fumarato; respectivamente. En contraste, otras dos proteínas involucradas en el TCA fueron menos abundantes en acidez; una citrato sintasa, codificada por *citA* (LPU83_2417), y una 2-oxoglutarato deshidrogenasa, codificada por *sucA* (LPU83_3917). Como el TCA es una ruta anfibólica, el aumento de la expresión de estas enzimas puede ser pensado para generar intermediarios para reacciones anabólicas. En concordancia con estos resultados, ha sido descrito previamente para *A.*

tumefaciens, que varios genes involucrados en el transporte y metabolismo de algunos de las enzimas del TCA fueron más abundantes en condiciones de estrés ácido (Yuan *et al.*, 2008).

De manera notoria, varios transportadores de oligosacáridos, polioles y monosacáridos presentaron una menor abundancia al exponerse al estrés ácido de *R. favelukesii*. En particular, los transportadores de maltosa, galactosa, sorbitol/manitol, trehalosa/maltosa, lactosa/L-arabinosa, D-xilosa, ramnosa y ribosa fueron inhibidos en condiciones ácidas (Tabla A.1). En contraste, una única proteína periplásmica de unión a múltiples azúcares (*sbpA*) presentó una sobre-expresión en estas condiciones, pudiendo ser la responsable del transporte de oligosacáridos en las células cultivadas en acidez. El análisis proteómico también puso en evidencia que dos transportadores de H⁺, *simporter*, (LPU83_4103, LPU83_0131) fueron inhibidos en condiciones de acidez, ambos relacionados con el transporte de azúcares. Estos resultados sugieren que dentro de la respuesta al estrés ácido puede encontrarse la represión de transportadores que involucran el ingreso de protones para evitar el incremento de los mismos en la célula.

Metabolismo de aminoácidos

Como respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*, varias proteínas involucradas en los sistemas de transporte y metabolismo de aminoácidos presentaron modificaciones en los niveles de expresión. De hecho, es el grupo que contiene el mayor número de proteínas con expresión diferencial (Figura IV. 5, COG E). Entre los metabolismos alterados se encuentra la síntesis de histidina. Dos enzimas claves de esta ruta fueron sobre-expresadas en acidez; HisH, una glutamina amidotransferasa (LPU83_0044) y una histidinol deshidrogenasa (*hisD*). Además, los precursores para esta ruta surgen a partir de la ruta de las pentosas-fosfato, la cual fue descrita anteriormente en este capítulo por presentar, en una de sus enzimas, una mayor abundancia en acidez. En este sentido, ha sido descrito previamente que la histidina puede operar como un *buffer* intracelular (pKa cercano a 6,0) en respuesta al estrés ácido (Broadbent *et al.*, 2010). Por ende, un incremento en la concentración de histidina intracelular podría contribuir a mantener el pH intracelular en *R. favelukesii*.

Por otro lado, se encontraron proteínas involucradas en el metabolismo de cisteína y metionina (LPU83_0652, LPU83_1835 y LPU83_0031) sobre-expresadas bajo estrés ácido. Dentro de éstas se incluye la enzima clave cisteína sintasa A. También fue alterado el metabolismo de glicina-serina en estas condiciones. Dos enzimas, SerA y SerC, que catalizan la conversión desde 3-fosfoglicerato hasta 3-fosfoserina, fueron reprimidas en acidez. Estos resultados contrastan con los reportados por Heunis *et al.* (2014), donde, en *L. plantarum* 423, observaron una mayor abundancia en condiciones de acidez de estas enzimas. Por otro lado, la enzima codificada por el gen *ilvA3*, que cataliza la conversión de serina a piruvato con producción de amonio, fue sobre-expresada en *R. favelukesii*.

Otro metabolismo alterado en *R. favelukesii* fue el metabolismo del glutamato. Dos glutamina sintetetasas mostraron una abundancia diferencial bajo condiciones de acidez. Una de estas, es una glutamina sintetasa tipo I (*glnA5*, LPU83_2462), cuya expresión fue reprimida en estas condiciones. Sin embargo, la expresión de

una glutamina sintetasa tipo III (*glnT*, LPU83_pLPU83c0694) tuvo una mayor expresión en las mismas condiciones. A su vez, de manera llamativa, varias proteínas asociadas al metabolismo de γ -aminobutirato (GABA) fueron diferencialmente expresadas en condiciones de acidez (Ver sección siguiente).

Estos resultados en conjunto indican que una parte relevante de la respuesta de *R. favelukesii* a la acidez involucra a varias proteínas relacionadas con la síntesis de aminoácidos.

Proteínas involucradas en el metabolismo de GABA.

El metabolismo de GABA es un componente clave en la defensa al estrés ácido de varias especies bacterianas, como por ejemplo, *E. coli* (Capitani *et al.*, 2003). El glutamato es convertido a GABA a partir de su descarboxilación, catalizada por la glutamato decarboxilasa (GAD), reacción en la cual se consumen protones intracelulares. El catabolismo del GABA derivado del sistema GAD ocurre a través de una vía (*shunt pathway*) que incluye una GABA aminotransferasa (GABA-AT) y una succínico semialdehído deshidrogenasa, SSDH (Feehily & Karatzas, 2013) (Figura.IV.8). En *R. favelukesii* LPU83 pudimos observar, a través de un enfoque bioinformático, que el gen codificante de GAD no se encuentra presente en su genoma. A pesar de la ausencia de esta enzima que produce GABA, se evidenció a partir de este estudio proteómico, que ambas enzimas de la vía catabólica de GABA mostraron una mayor abundancia en condiciones de acidez (*gabT*, LPU83_0163 y *gabDch*, LPU83_0164). GABA-AT cataliza la conversión reversible de GABA a succínico semialdehído (SSA), transfiriendo el grupo amino al α -cetoglutarato y obteniendo glutamato. Luego, el SSA es convertido por SSDH a succinato, consumiendo una molécula de NAD^+ y produciendo dos protones (en una reacción también reversible). Al no tener el sistema GAD, *R. favelukesii*, podría estar utilizando la vía inversa para obtener GABA y consumir así dos protones intracelulares. De manera adicional, SucD y SdhD, ambas enzimas del TCA y descritas anteriormente en este capítulo, mostraron ser sobre-expresadas en condiciones de acidez (Figura.IV.8). El transportador ABC (*livK*), que en *Agrobacterium* está involucrado en la absorción de GABA, también presentó una expresión incrementada en condiciones de acidez (KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

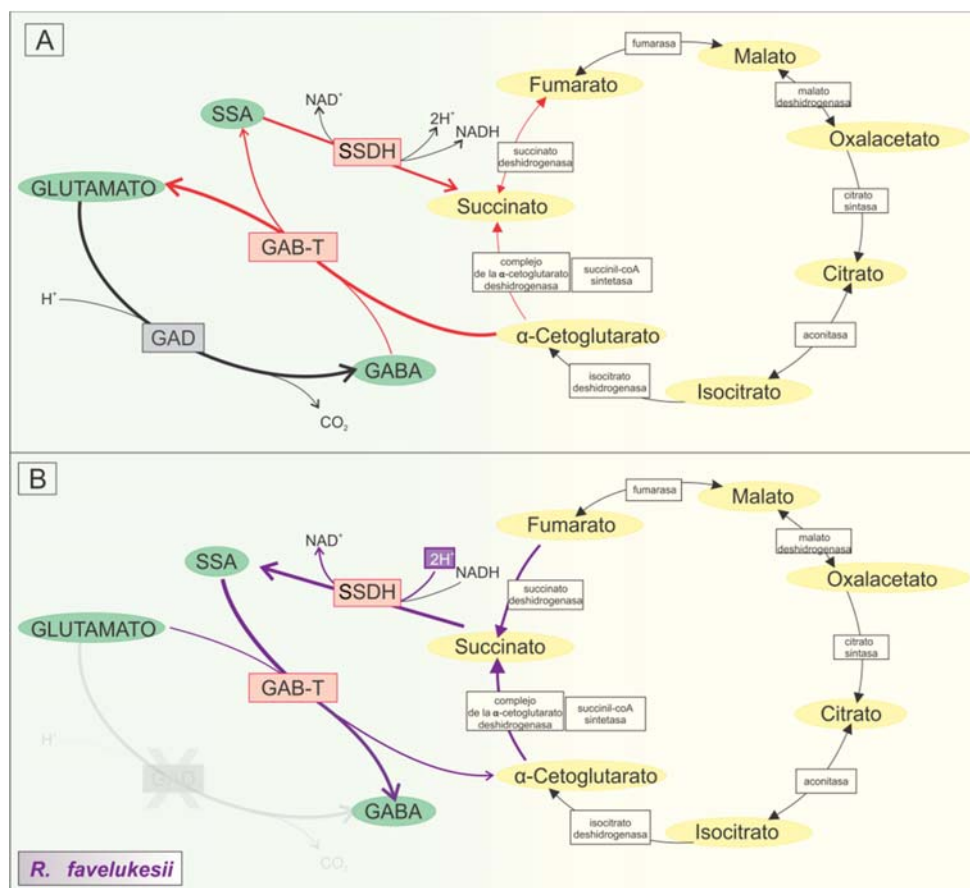


Figura IV.8. Rutas involucradas en el metabolismo de GABA. El sector derecho muestra el TCA y el sector izquierdo el metabolismo de GABA. **A.** Metabolismo de GABA modelo descrito en *E. coli*. Las flechas y recuadros rojos indican las proteínas sobre-expresadas en el análisis proteómico en *R. favelukesii*. **B.** Posible ruta de producción de GABA en *R. favelukesii* que podría estar consumiendo protones intracelulares (flechas violetas). GABA-AT: GABA aminotransferasa, SSDH: succínico semialdehído deshidrogenasa, GAD: glutamato decarboxilasa.

Proteínas involucradas en la envoltura celular.

Numerosas proteínas asociadas con la envoltura celular presentaron una expresión diferencial en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii* (Tabla A.1). Tanto para *E. meliloti* como para *A. tumefaciens*, ha sido descrito previamente que la expresión de la mayoría de los genes *exo* aumentan ante un estrés ácido, al igual que el sistema regulatorio de dos componentes ExoS-ChvI (Hellweg *et al.*, 2009). En *R. favelukesii*, ExoF y ExoY, junto con el regulador ChvI, se encontraron sobre-expresadas en condiciones de acidez. Sin embargo, las proteínas codificadas por las dos copias del gen *exoH* presentes en *R. favelukesii*, se encontraron inhibidas en acidez. En este sentido, en *E. meliloti* ha sido descrito un mutante en *exoH* que presentó un fenotipo sensible a la acidez. Dada la discordancia de estos resultados se hace difícil inferir si existe un aumento en la cantidad de EPS o no. Para esto se espera que los resultados de transcriptómica del capítulo siguiente contribuyan en dilucidar el rol del exopolisacárido en la tolerancia a la acidez en *R. favelukesii*.

Llamativamente, se encontró un grupo de PED involucradas en la síntesis, modificación y degradación del peptidoglicano. Una D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa de *R. favelukesii* (DD-CPase, *dacF1*, LPU83_1045) mostró una menor expresión en condiciones de acidez. Esta proteína remueve los residuos terminales D-alanina de los pentapéptidos y ha sido propuesta como regulador de la síntesis del peptidoglicano por

remover los pentapéptidos donadores en exceso en el peptidoglicano recientemente sintetizado (Typas *et al.*, 2011). En contraposición a lo que sucede en *R. favelukesii*, en *A. tumefaciens*, una DD-CPasa presentó un incremento en la expresión en condiciones de acidez (Yuan *et al.*, 2008). Además, en *R. favelukesii*, una proteína de anclaje a penicilina 1A (PBP1A, LPU83_pLPU83c_0495) se encuentra también reprimida en condiciones de acidez. PBP1A es una peptidoglicano sintasa bifuncional, con actividad tanto glicosiltransferasa (GTasa) como transpeptidasa (TPasa) y se encuentra involucrada principalmente en la elongación celular (Typas *et al.*, 2011). Sumado a esto, una probable LD-transpeptidasa (LD-TPasa, LPU83_0053) se encontró sobre-expresada en acidez. Las LD-TPasas catalizan la formación del entrecruzamiento 3-3 del peptidoglicano y/o de la unión de D-aminoácidos inusuales al peptidoglicano. También es descripta por llevar a cabo el anclaje del peptidoglicano a la lipoproteína mayor (Lpp) anclada a la membrana externa (Typas *et al.*, 2011). Otra proteína que también fue estimulada, fue TolB (LPU83_3429), que es parte del complejo multiproteico Tol-Pal (lipoproteína asociada al peptidoglicano). Esta proteína también interactúa con Lpp y OmpA (*Outer membrane protein A*). De manera adicional, la undecaprenil pirofosfato sintetasa (*uppS*, LPU83_2577), la cual cataliza la reacción para generar el undecaprenil difosfato que sirve como lípido transportador en la síntesis del peptidoglicano (Guo *et al.*, 2005), se halló sobre-expresada en condiciones de acidez.

Chaperonas y proteínas involucradas al estrés oxidativo

Las chaperonas ayudan a otras proteínas a adquirir su conformación funcionalmente activa y están involucradas en procesos de control de calidad de las proteínas. Múltiples proteínas encontradas con una expresión diferencial en *R. favelukesii*, mostraron ser chaperonas o estar involucradas en el recambio de las proteínas. Una chaperona molecular (DnaK), una chaperona dependiente de ATP (ClpB), y una chaperona molecular de la familia HSP20 (LPU83_pLPU83d_0434) presentaron una mayor abundancia en condiciones de acidez. En contraste, una chaperona perteneciente a la familia de DnaJ, mostró tener una menor abundancia en condiciones de acidez. Por otro lado, dos serin proteasas (LPU83_1609 y LPU83_1265) fueron también sobre-expresadas en estas condiciones. Ambas proteínas mostraron homología con DegP, una serin endoproteasa. En *Mesorhizobium loti* se evidenció que una proteína homóloga a DegP podría degradar las proteínas plegadas de manera incorrecta que no pueden ser recuperadas por las chaperonas en condiciones de acidez (Laranjo *et al.*, 2014). Brigido *et al* (2013) evidenciaron y sugirieron que la inducción de los genes *dnaK* y *groESL* está involucrada en la tolerancia a la acidez en rizobios noduladores de garbanzos. Adicionalmente, en *E. meliloti*, el gen *degP* fue el gen inducido en mayor medida bajo condiciones de acidez y *groEL5* tuvo un lento incremento a lo largo del experimento (Hellweg *et al.*, 2009). Resultados que concuerdan con los encontrados en *R. favelukesii*.

Por otro lado, bajo ciertas condiciones de estrés, la respuesta a éste puede “disparar” la respuesta a otro estrés, lo que se conoce como protección cruzada (Shen *et al.*, 2015, He *et al.*, 2016). Por ejemplo, en *Staphylococcus aureus*, cepas mutantes en el gen *sod* (relacionado con estrés oxidativo) mostraron una

mayor sensibilidad al estrés ácido (Clements & Foster, 1999). Otros ejemplos de protección cruzada se evidenciaron en *Campylobacter jejuni* y *Lactobacillus plantarum* ZDY2013, donde se observó que células expuestas previamente a estrés ácido presentaban un aumento en la resistencia al estrés oxidativo (Askoura *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2016). En este sentido, en *R. favelukesii* se observaron que varias proteínas involucradas en el estrés oxidativo tuvieron una expresión diferencial en condiciones de acidez (Tabla A.1). Entre estas se encuentran dos superoxidodismutasas, SodB y SodC (LPU83_1189 y LPU83_1350), las cuales mostraron tener una mayor abundancia en estas condiciones. Esto concuerda con lo descrito en otros rizobios, como *E. meliloti*, donde se observa un aumento en la expresión del gen *sodB* cuando se somete a un estrés ácido (Draghi *et al.*, 2016).

Proteínas del metabolismo de azufre.

Varios componentes enzimáticos implicados en el metabolismo del azufre presentaron una mayor abundancia bajo condiciones ácidas en *R. favelukesii* (Tabla A.1, Figura IV.3). Las proteínas que se inducen por inanición de sulfato juegan un papel en la absorción de sulfonatos. Además juegan un rol en la adquisición de azufre a partir de compuestos orgánicos y en la protección contra especies reactivas de oxígeno. Entre las proteínas que se inducen por inanición de sulfato, se encuentran las proteínas codificadas por el operón *ssuABCDE*, necesarias para la utilización de azufre a partir de fuentes de azufre alternativas como sulfonatos alifáticos. En *E. coli*, el operón *ssu* se expresa durante la limitación de azufre, permitiendo el uso de sulfonatos alifáticos como fuente de azufre (van Der Ploeg *et al.*, 1999). Las proteínas codificadas por *ssuA*, *ssuB* y *ssuC* constituyen un sistema de transporte de tipo ABC, mientras que *ssuD* y *ssuE* codifican para una monooxigenasa dependiente de FMNH₂ y para una FMN reductasa dependiente de NAD(P)H respectivamente (Eichhorn *et al.*, 1999). En *R. favelukesii* se observó un aumento en la expresión de ambas proteínas, SsuD y SsuE (LPU83_2206 y LPU83_2524), en condiciones ácidas. En la misma condición, una dimetilsulfona monooxigenasa (LPU83_pLPU83c_0226) también presentó un incremento. En consecuencia, como estas monooxigenasas reducen el oxígeno molecular durante la catálisis de sus reacciones, alguna/s podría/n ser posibles oxidorreductasas alternativas regenerando NAD⁺ bajo condiciones ácidas en *R. favelukesii*.

Proteínas involucradas en el transporte y metabolismo de iones inorgánicos.

Varias proteínas involucradas en el transporte y metabolismo de iones inorgánicos fueron expresadas diferencialmente como respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El sistema transportador de hierro, codificado por los genes LPU83_2209, LPU83_2210, LPU83_2211 y LPU83_2212, fue íntegramente reprimido bajo condiciones de acidez. Además, la expresión de varios genes (*hmuS*, *hmuT*, *hmuV*, *tonB*) que codifican para proteínas que son parte del sistema de transporte Hmu (por “*hemin utilization*”) y un regulador transcripcional de la familia fur (*irr*, LPU83_0147), también fueron menos abundantes en condiciones de acidez. Así mismo, la expresión de otro regulador transcripcional, *rirA* (LPU83_0873), fue incrementada en las mismas condiciones. Estos resultados van de la mano con lo descrito por Chao *et al.* (2005). Estos autores

evidenciaron un aumento en la expresión de *hmuP*, *hmuS*, *hmuT*, *hmuU* y *hmuV* en una cepa de *E. meliloti* deficiente *rirA*, concluyendo que la expresión de dichos genes se encuentra mediada por *rirA*. En consecuencia, el incremento en la expresión de *rirA* y la disminución en la expresión del sistema Hmu observada en *R. favelukesii* es concordante con lo descrito para *E. meliloti*. Por otro lado, en el análisis proteómico realizado en *R. favelukesii*, se observó que proteínas involucradas en la captación de potasio y cobre presentaron una menor abundancia en condiciones de acidez. Dichas proteínas incluyen una ATPasa transportadora de potasio (*kdpB*, LPU83_4160), una proteína involucrada en la homeostasis de cobre (*cutC*, LPU83_0564) y una hipotética ATPasa translocadora de metales pesados (LPU83_pPLU83a_0034).

Estos resultados indican la relevancia de la presencia y regulación de la captación de iones metálicos en las células bajo condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*. En este sentido, es conocido que el cobre libre, el hierro (II) y el hierro (III) son más solubles a pHs más bajo (Olson, 1948), por lo tanto, la disminución en la absorción de estos iones podría evitar daños en condiciones de acidez en *R. favelukesii*.

En este capítulo, se ha puesto de manifiesto que *R. favelukesii* presenta una respuesta general a nivel proteómico frente a las condiciones de estrés ácido. Este hecho se evidenció, en primer lugar, a través de geles bidimensionales que presentaron diferentes perfiles proteicos en las condiciones evaluadas. Esta respuesta general se evidenció en detalle mediante un análisis completo del proteoma haciendo uso de un nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap. Esta técnica permitió identificar y cuantificar la mayoría de las proteínas que se expresan en *R. favelukesii* cuando es expuesto, o no, a un estrés ácido. A partir de dicho análisis, se pudieron discriminar aquellas proteínas que presentaron una expresión diferencialmente significativa en las células expuestas al estrés ácido.

El proteoma de *R. favelukesii* a pHs bajos demostró contener un gran número de proteínas expresadas diferencialmente como se observa de la lista de PED descrita en el anexo (Tabla A.1). La respuesta de *R. favelukesii* al estrés ácido refleja la participación de un conjunto diverso de proteínas celulares como ya ha sido observado para otros tipos de estreses (Teixeira-Gomes *et al.*, 2000). Los resultados manifiestan la naturaleza multigénica de la respuesta a la acidez, y otorgan sustento a la utilización de técnicas ómicas como herramienta de estudio. Dicha respuesta comprende múltiples proteínas asociadas a diversos procesos: recambio de proteínas; componentes del sistema de la fosforilación oxidativa; proteínas asociadas a otros estreses (como el estrés oxidativo). Alteraciones en este tipo de funciones en respuesta al estrés ácido, son compartidas por diversas especies rizobianas.

Resulta interesante que parte de la respuesta del proteoma de *R. favelukesii* al estrés ácido también incluyó enzimas relacionadas al metabolismo de GABA. Las reacciones inversas de la vía catabólica del mismo, donde se consumen protones, podrían ser parte de los mecanismos partícipes en la tolerancia a la acidez de *R. favelukesii*. Por otro lado, el aumento en las enzimas de la biosíntesis de la histidina, sugiere un posible aumento en la concentración de la misma en el medio intracelular. Así, la histidina podría ser utilizada como

buffer interno. Asimismo, los resultados muestran que los componentes de la envoltura celular se encuentran alterados en condiciones de acidez, en particular el peptidoglicano.

En el capítulo siguiente, con el propósito de extender el análisis de la respuesta a la acidez e incrementar la caracterización de los posibles mecanismos involucrados en la misma, se analizará el transcriptoma de *R. favelukesii* en condiciones de neutralidad y de acidez. Este análisis brindará información sobre la expresión diferencial de los transcritos, que puede no haber sido evidenciada a nivel proteómico. Obtenidos los resultados, se evaluará cómo estos se ajustan a las evidencias descriptas en este capítulo a partir del análisis proteómico.

CAPÍTULO V

BÚSQUEDA DE DETERMINANTES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA A LA ACIDEZ EN *RHIZOBIUM FAVELUKESII* MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA

V.1.Introducción.

El uso de herramientas ómicas, tales como el análisis masivo de transcriptos en una determinada condición, ha permitido avanzar en el conocimiento de la expresión y regulación de genes en respuesta a un determinado estrés. Los transcriptomas pueden ser obtenidos por medio de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, las cuales son capaces de otorgar varios Gigabases de secuencias a un costo relativamente bajo (Simon *et al.*, 2009, Croucher & Thomson, 2010, van Vliet, 2010, Pinto *et al.*, 2011, Mutz *et al.*, 2013). A través de esta técnica se puede cuantificar la expresión de los genes, además de identificar nuevas regiones transcripcionalmente activas (por ejemplo, pequeños ARN). Como se mencionó previamente, la respuesta a un pH bajo es en general una respuesta pleiotrópica, por lo que el estudio de las respuestas a nivel global es esencial para obtener un panorama completo de lo que sucede frente al estrés ácido. Recientemente, en *E. meliloti* 1021, se realizó un estudio de la respuesta transcripcional que se obtiene luego de un cambio de pH de 7,0 a 5,7 (Mnasri *et al.*, 2007). El estudio reveló que la exposición a un pH ácido por un tiempo corto fue suficiente para inducir cambios significativos a nivel transcripcional en diversos genes. Entre dichos genes, se encuentra un grupo asociado con varias funciones celulares como la biosíntesis de exopolisacárido (EPS), el sistema flagelar y la quimiotaxis bacteriana (Mnasri *et al.*, 2007). Atendiendo a esto, en este capítulo se presenta la caracterización de las diferencias de expresión de los transcriptos en respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii* LPU83, a través de la secuenciación masiva de los ARN mensajeros (RNA-Seq).

V.2. Optimización de la secuenciación de alto rendimiento de ARNs mensajeros de *R. favelukesii* LPU83.

Con el objeto de continuar la caracterización de la respuesta a la acidez en *R. favelukesii*, se propuso un análisis transcriptómico comparativo de células cultivadas en la condición de estrés y a pH neutro. Con este análisis se espera avanzar en la caracterización de la expresión y regulación diferencial del transcriptoma de *R. favelukesii*. Como primer paso, tras infructuosos intentos de obtener ARN de buena calidad con protocolos convencionales, surgió como tarea prioritaria realizar una optimización de la extracción de ARN en *R. favelukesii* LPU83. Luego, se evaluó también cómo realizar la secuenciación con respecto al número de bibliotecas y lecturas utilizado.

V.2.a. Optimización del protocolo de purificación de ARN.

En primer lugar, se realizó una optimización de las condiciones de extracción y purificación del ARN en las condiciones de cultivo seleccionadas (pH 7,0 y pH 4,6). Para tal efecto, se evaluaron diferentes métodos de extracción y purificación controlando en cada caso la calidad e integridad del ARN a través de una

electroforesis automatizada de alta resolución mediante el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer. Se evaluaron 6 protocolos alternativos que se encuentran resumidos a continuación en la siguiente Tabla (Tabla V.1).

Tabla V.1. Protocolos utilizados en la optimización de la purificación de ARN mensajeros. Las columnas indican los pasos sucesivos en la purificación y las filas corresponden a cada uno de los protocolos evaluados.

Protocolo	Volumen de cultivo (ml)	Centrifugación	N ₂ Líquido	Tratamiento	Centrifugación	N ₂ Líquido	Método de ruptura
A	12	✓	✓	X	X	X	Trizol + Ribolyser
B	12	✓	✓	X	X	X	buffer LRT + Ribolyser
C	6	X	X	12 ml RNA later	✓	✓	lisis enzimática + buffer LRT
D	6	✓	X	500 µl de medio + 1 ml RNA protect	X	✓	lisis enzimática + buffer LRT
E	6	✓	X	500 µl de medio + 1 ml RNA protect	✓	✓	lisis enzimática + buffer LRT
F	12	✓	X	X	X	✓	lisis enzimática + buffer LRT

En la Figura V.1.1 se muestran los perfiles del análisis de calidad de los ARN (Agilent 2100 Bioanalyzer) correspondientes a cada protocolo evaluado. Los perfiles, en el caso del protocolo A y D, presentan un pico con incremento brusco (perfectamente recto) que disminuye de manera curva, este tipo de picos es típico de artefactos del equipo y no se atribuye a presencia de ARN. A su vez, los perfiles B y F presentan picos pequeños a la altura correspondiente a los ARNr, denotando una baja eficiencia de dichos protocolos. Los perfiles C y E presentaron dos picos bien definidos y de concentración abundante, correspondientes a los ARNr (16S y 23S). De acuerdo a estos resultados, el protocolo seleccionado para continuar con el estudio fue el protocolo E, tanto por la cantidad y calidad de la preparación, como también por la utilización de menores volúmenes de RNA *protect*. De manera llamativa, el pico correspondiente al 23S se observa desplazado hacia un menor tamaño, suceso no descrito en los perfiles de ARN en otras cepas rizobianas. Este pico se encuentra también presente en la mayoría de los perfiles de ARN de los otros protocolos, así como también en varias réplicas biológicas e incluso en otras condiciones llevadas a cabo en el laboratorio (datos no mostrados). En virtud de dilucidar si este perfil era compartido con *E. meliloti*, se analizaron los perfiles de esta cepa donde se evidenció que estos no contaban con la presencia del doblete a la altura del pico de 16S (Figura V.1.2). Estos resultados sugieren que la cepa *R. favelukesii* LPU83 posee un patrón característico en sus perfiles de ARN ribosomal, en los cuales el 23S parece tener algún tipo de procesamiento.

Una vez seleccionado el método de preparación de ARN, a las muestras de ARN total obtenidas se las enriqueció en ARNm a través de la sustracción de los ARNr mediante el *kit* comercial RiboZero®. La Figura V.1.3 muestra los perfiles de las muestras de ARN a secuenciar antes y después del tratamiento de sustracción del ARN ribosomal.

V.2.b. Estrategia de secuenciación de ARNs mensajeros presentes en *R. favelukesii* en condiciones de acidez y neutras.

Una vez obtenidas las muestras de ARN de alta calidad correspondientes, se procedió a realizar las bibliotecas de cDNA para su posterior secuenciación (sección II.4). Las secuenciaciones se realizaron a través de la plataforma Illumina MiSeq y los datos obtenidos se analizaron con el programa ReadExplorer (Hilker *et al.*, 2014). En efecto, se contaba con dos condiciones a evaluar (pH 4,6 y 7,0), cada una representada por 3 réplicas biológicas. Como primera aproximación, se realizó la secuenciación de dos bibliotecas únicas. Estas bibliotecas estaban compuestas de manera equitativa por las 3 réplicas biológicas (muestras compuestas, secuenciación A). Como resultado de este primer análisis se obtuvieron 272 genes con una posible expresión diferencial. En este sentido, estos genes poseen un incremento mínimo de 2 en la razón de cambio de la expresión ($M = \log_2 \text{FoldChange} > 1 \text{ y } < -1$) con un *p-value*, calculado a partir del *software* DE-Seq, menor a 0,05. Si bien esta aproximación sirvió para detectar genes cuya tasa de cambio era grande (Resultados no mostrados), el peso estadístico de estos valores no resulta significativo debido a no poseer réplicas del método (una única secuenciación con las 3 réplicas biológicas juntas). De este modo, para franquear dichas debilidades estadísticas y avanzar en la caracterización de la respuesta global del transcriptoma de *R. favelukesii* de manera estadísticamente significativa, se procedió a secuenciar cada réplica biológica de manera individual, es decir, 6 secuenciaciones independientes. En paralelo, otro factor a evaluar en esta etapa fue el número de lecturas en cada secuenciación. Se realizaron dos rondas de secuenciación, incrementando la profundidad en la segunda ronda. En la primera ronda se secuenciaron aproximadamente 2 millones de lecturas para cada biblioteca (secuenciación B). En este caso, el número de genes con expresión diferencial obtenidos aumentó. Estos genes, a diferencia de los obtenidos en la secuenciación anterior, sí contaban con un análisis estadístico profundo. Se consideraron como genes expresados diferencialmente de manera significativa (GED) a aquellos genes que presentaban un *p-value* ajustado menor a 0,05 y presentaran el mismo nivel de expresión diferencial que en el caso A ($M = \log_2 \text{FoldChange} > 1 \text{ y } < -1$). El *p-value* ajustado se define como el nivel de significación familiar más pequeño en el que una comparación particular se declarará estadísticamente significativa como parte de la prueba de comparación múltiple. En este sentido, el *p-value* no resulta adecuado en este tipo de pruebas.

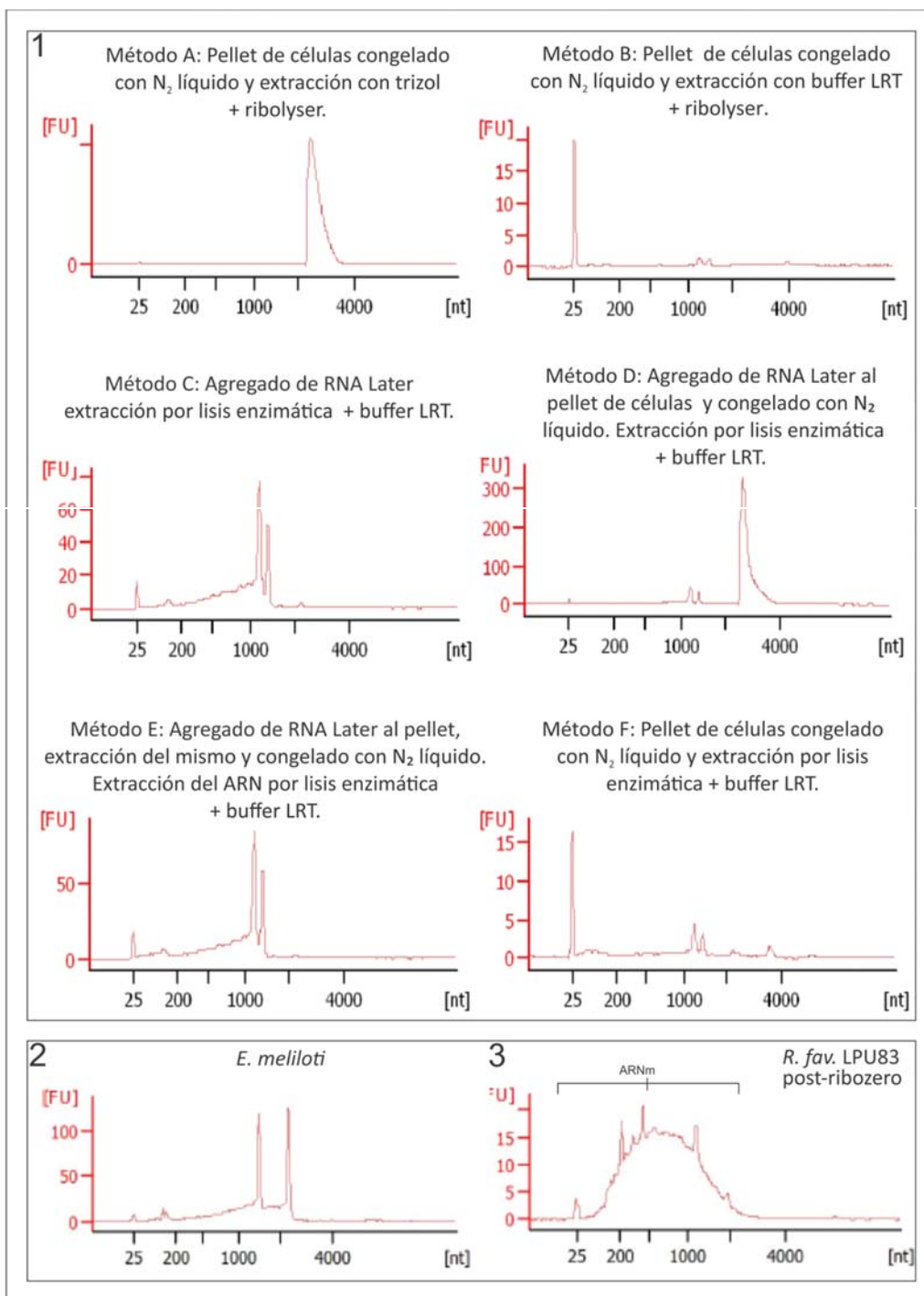


Figura V. 1. Perfiles de muestras de ARN purificado analizados a través del sistema Agilent 2100 Bioanalyzer. En el eje x se muestra el número de nucleótidos, alrededor de los 1000 nt se deben observar los picos característicos del ARN ribosomal 16S y después de los 2500 nt del ARN ribosomal 23S. **1.** Perfiles de ARN purificados de *R. favelukesii* con distintos protocolos. En la parte superior de cada gráfico se detalla el protocolo utilizado en cada uno de las muestras. **2.** Perfil ARN purificado de células de *E. meliloti*. **3.** Perfil de una muestra de ARN representativa de *R. favelukesii* posterior al tratamiento de sustracción del ARN ribosomal (RiboZero®). Todos los perfiles son representativos de 3 réplicas biológicas

Por último, se secuenciaron nuevamente las réplicas biológicas independientes con un aumento en el número de lecturas por biblioteca, incrementando las mismas de 2 a 6 millones aproximadamente por réplica (secuenciación C). Los detalles de estos resultados se muestran en la Tabla V.2.

Tabla V.2. Comparación de las distintas secuenciaciones del transcriptoma de *R. favelukesii* bajo estrés ácido o a pH neutro. Para cada biblioteca se indica el número de lecturas realizadas y el número de genes con el valor correspondiente del $\log_2\text{FoldChange}$ (M).

	A. 3 réplicas biológicas en pool (2) ^a	B. 3 réplicas biológicas, bibliotecas independientes (6) ^a	C. 3 réplicas biológicas, bibliotecas independientes (6) ^a	Genes que repiten siempre su estado
Lecturas pH = 4,6	3.211.726	2.114.786 (Promedio)	6.622.132 (Promedio)	
Lecturas pH = 7,0	4.350.368	2.029.499 (Promedio)	7.451.158 (Promedio)	
M < -1 / > 1	389/699 (1088) ^b	842/1179 (2021) ^b	853/1170 (2023) ^b	351 (90%)/ 625 (90%)
M con p-value <0,05	98/175 (273) ^c	776/1082 (1858) ^c	827/1126 (1953) ^c	
M con p-adjusted value < 0,05	0	736/1001 (1737) ^d	801/1098 (1924) ^d	

^a: cantidad de bibliotecas secuenciadas en cada ensayo. ^b: número total de genes detectados con un M ($\log_2\text{FoldChange}$) mayor a 1 o menor a -1. ^c: número total de genes detectados con M mayor a 1 o menor a -1 con un p-value menor a 0,05. ^d: número total de genes detectados con M mayor a 1 o menor a -1 con un p-value ajustado menor a 0,05.

De estos resultados, se puede observar la vasta diferencia entre la secuenciación A con respecto a la B y C, en relación a los genes que podrían expresarse de manera diferencial. Si se considera el peso estadístico de dichos genes obtenidos en A, estrictamente no pueden tomarse como genes expresados diferencialmente de manera significativa, ya que los mismos no poseen un *p-value* ajustado asociado debido a la falta de réplicas biológicas. Sin embargo, resulta relevante destacar que al examinar los “genes con expresión diferencial” obtenidos en la secuenciación A, el 90 % de estos genes mantienen el patrón de expresión independientemente de cómo se haya realizado la secuenciación. Es decir, que los 273 genes encontrados como expresados diferencialmente en la secuenciación A se encuentran dentro de los genes expresados diferencialmente de manera significativa en las posteriores secuenciaciones B y C.

Con los datos obtenidos en la última secuenciación (C), se continuó con el análisis de la respuesta a la acidez a nivel transcriptómico en *R. favelukesii*. Dicho análisis se describe en la siguiente sección.

V.3. Análisis transcriptómico de *R. favelukesii* LPU83 en condiciones de estrés ácido a través de RNA-Seq.

Con el objetivo de continuar profundizando en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la tolerancia a la acidez, se prosiguió a realizar el análisis de los transcriptos cuyos niveles son regulados en respuesta a cambios de pH en el ambiente.

Como se describió en la sección anterior, se secuenciaron los transcriptomas de células de *R. favelukesii* cultivadas a pH 4,6 (condición de estrés) y a pH 7,0. Como resultado de la secuenciación, se identificaron un total de 7693 genes de 7700 genes que contiene el genoma de *R. favelukesii* LPU83. Dentro de estos genes,

1924 mostraron tener una expresión diferencial de manera significativa (p -value ajustado <0.05 y un $\log_2\text{fold change}$ menor a -1 o mayor a 1), 844 presentaron una mayor expresión en condiciones de acidez y 1098 presentaron una disminución en las mismas condiciones (Figura V.2, Tabla A.2). Si se analiza la distribución genómica de los GED, se observa que la mayoría se encuentran en el cromosoma (50 % aproximadamente) y luego en el plásmido simbiótico, pLPU83b (Figura V.3.A). Sin embargo, al normalizar estos valores por el total de CDS contenidos en cada replicón, el replicón que contiene un mayor número de GED es el plásmido simbiótico (Figura V.3.B).

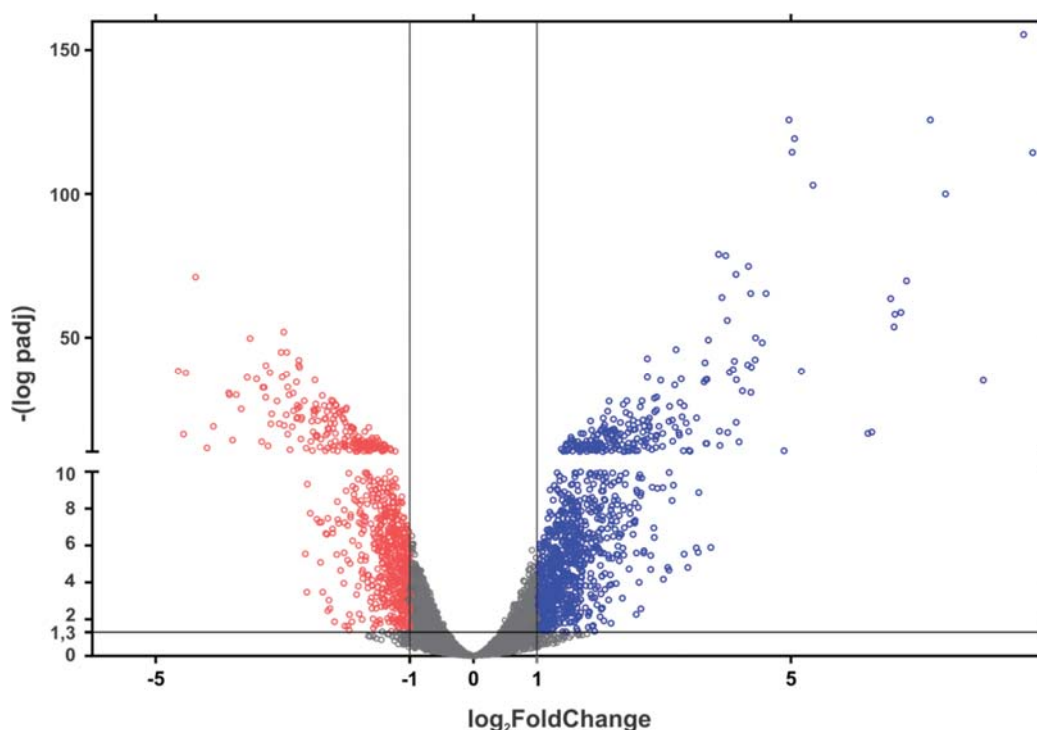


Figura V.2. Representación de la razón de cambio en función del valor de p -value de los transcritos expresados diferencialmente en *R. favelukesii* en condiciones de acidez. Se muestra la distribución del logaritmo de la razón de cambio de la expresión de los transcritos en función del menos logaritmo del p -value ajustado. Los círculos contenidos dentro del cuadrante izquierdo representan los transcritos con mayor abundancia (rojos) en condiciones de acidez de manera significativa y los contenidos dentro del cuadrante derecho representan transcritos con menor abundancia en las mismas condiciones (azul).

V.3.a. Análisis de las funciones (in silico) de los transcritos expresados diferencialmente como respuesta a la acidez.

Para avanzar en la identificación de posibles correlaciones funcionales que permitan explicar la presencia de los diferentes transcritos observados en el contexto de una respuesta celular a la condición de estrés, se realizó el análisis de las funciones bioquímicas de cada uno de los GED. Nuevamente, como en el caso de las PED en el capítulo anterior, los distintos GED fueron agrupados de acuerdo a su pertenencia a los grupos de genes ortólogos (COGs, *Cluster of Orthologous Groups of proteins*) (Tabla V. 1). La distribución de los GED en las distintas categorías funcionales se representa en la Figura V.4. En este sentido, como se observa en esta Figura, las categorías funcionales que contienen una mayor cantidad de GED sobre-expresados en condiciones de acidez, corresponden a los sistemas de transporte y metabolismos de aminoácidos (COG E),

y en segundo lugar, los relacionados con la producción y conversión de energía (COG C). Se suman a éstas, las categorías funcionales relacionadas con la envoltura celular (COG M); la motilidad celular (COG N) y la traducción, estructura y biogénesis de ribosomas (COG J). Mientras que las categorías funcionales que contuvieron un mayor número de GED con una menor expresión en condiciones de acidez fueron las de transporte y metabolismo de carbohidratos (COG G), Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (COG P) y Transcripción (COG K). Es interesante destacar que el 25% de los GED codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida.

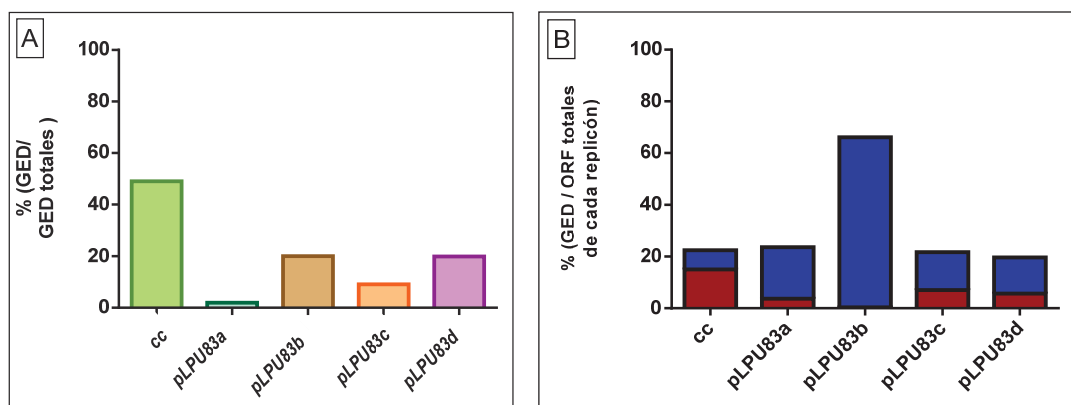


Figura V.3. Distribución genómica de los genes expresados diferencialmente en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*. Se representa el porcentaje de GED de cada replicón sobre el número total de GED (A) y sobre el número total de genes para cada replicón (B). La abreviatura cc corresponde al cromosoma.

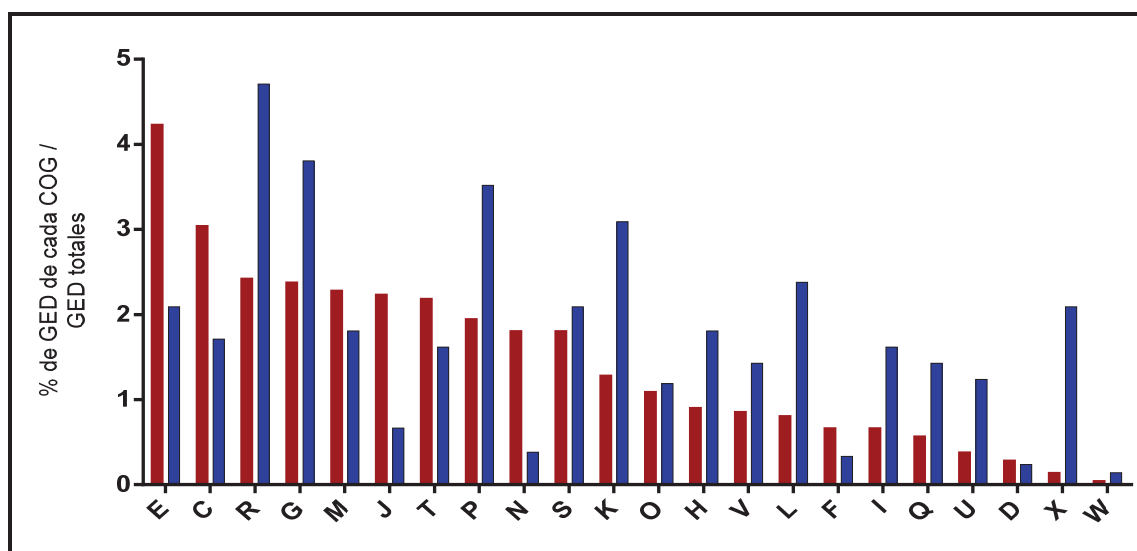


Figura V.4. Representación de las diferentes categorías de productos ortólogos (COGs) en que se agrupan los genes expresados diferencialmente en acidez en *R. favelukesii*. En el gráfico se representa la proporción de cada categoría funcional con respecto a los genes sobre-expresados e inhibidos y a su vez, que proporción de cada categoría funcional corresponde a GED sobre-expresados e inhibidos. Las letras en ambas Figuras se corresponden a las categorías funcionales de las siguiente manera: E: Transporte y Metabolismo de Aminoácidos; C: Producción De Energía Y Conversión; R: Predicción de Funciones Generales; G: Transporte y Metabolismo de Carbohidratos; M: Pared Celular/Membrana/Génesis de la Envoltura; J: Traducción, Estructura Ribosomal y Biogénesis; T: Mecanismos De Traducción de Señales; P: Transporte Y Metabolismo de Iones Inorgánicos; N: Motilidad Celular; S: Función Desconocida; K: Transcripción; O: Modificaciones Postraduccionales, Recambio Proteico, Chaperonas; H: Transporte y Metabolismo de Coenzimas; V: Mecanismos de Defensa; L: Replicación, Recombinación Y Reparación; F: Transporte Y Metabolismo de Nucleótidos; I: Transporte Y Metabolismo de Lípidos; Q: Biosíntesis, Transporte y Catabolismo de Metabolitos Secundarios; U: Tráfico Intracelular, Secreción y Transporte Vesicular; D: Control del Ciclo Celular y División Celular; X: Mobiloma: Profagos, Transposones; W: Estructuras Extracelulares.

Por otra parte, en virtud de obtener mayor información estadísticamente confiable sobre las categorías funcionales alteradas, se realizó un análisis de enriquecimiento e interacciones proteína-proteína con los GED. Dicho análisis se realizó, como en el capítulo IV, con la herramienta bioinformática, STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017). Como resultado, se muestran en la Figura V.5 y IV.6 la red de asociaciones predichas para los GED en acidez en *R. favelukesii*. El análisis de enriquecimiento indicó que varias vías metabólicas (KEGG *pathway*) se encuentran enriquecidas de manera significativa. Ejemplos de dichas vías son la fosforilación oxidativa, el sistema flagelar, la quimiotaxis bacteriana, los componentes ribosomales, sistemas de dos componentes y el TCA entre otros (Figura V.5).

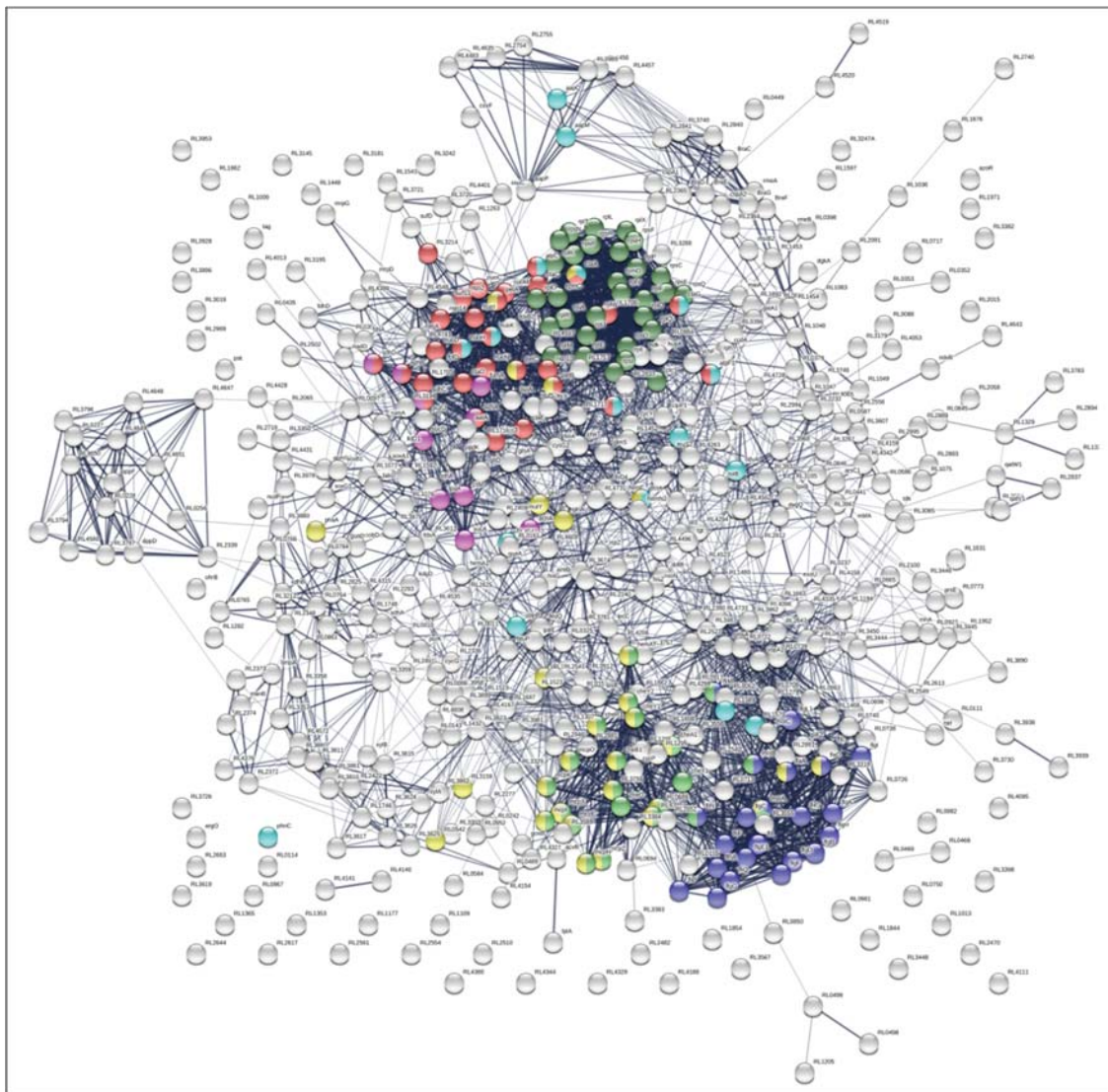


Figura V.5. Red de interacciones de las proteínas codificadas por los transcritos sobre-expresados diferencialmente en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*. Cada nodo corresponde a una proteína codificada por un GED. Verde oscuro: Ribosoma; rojo: fosforilación oxidativa, azul: sistema flagelar, verde claro: quimiotaxis bacteriana, amarillo: sistema de dos componentes, violeta: ciclo del ácido tricarboxílico. FDR (*false discovery rate*): $3,77 \times 10^{-13}$; $9,37 \times 10^{-13}$; $3,68 \times 10^{-12}$; $4,49 \times 10^{-7}$; $6,76 \times 10^{-5}$; 0,00323; respectivamente. Los nodos coloreados muestran el conjunto de proteínas de una determinada vía metabólica enriquecida en interacciones de manera significativa.

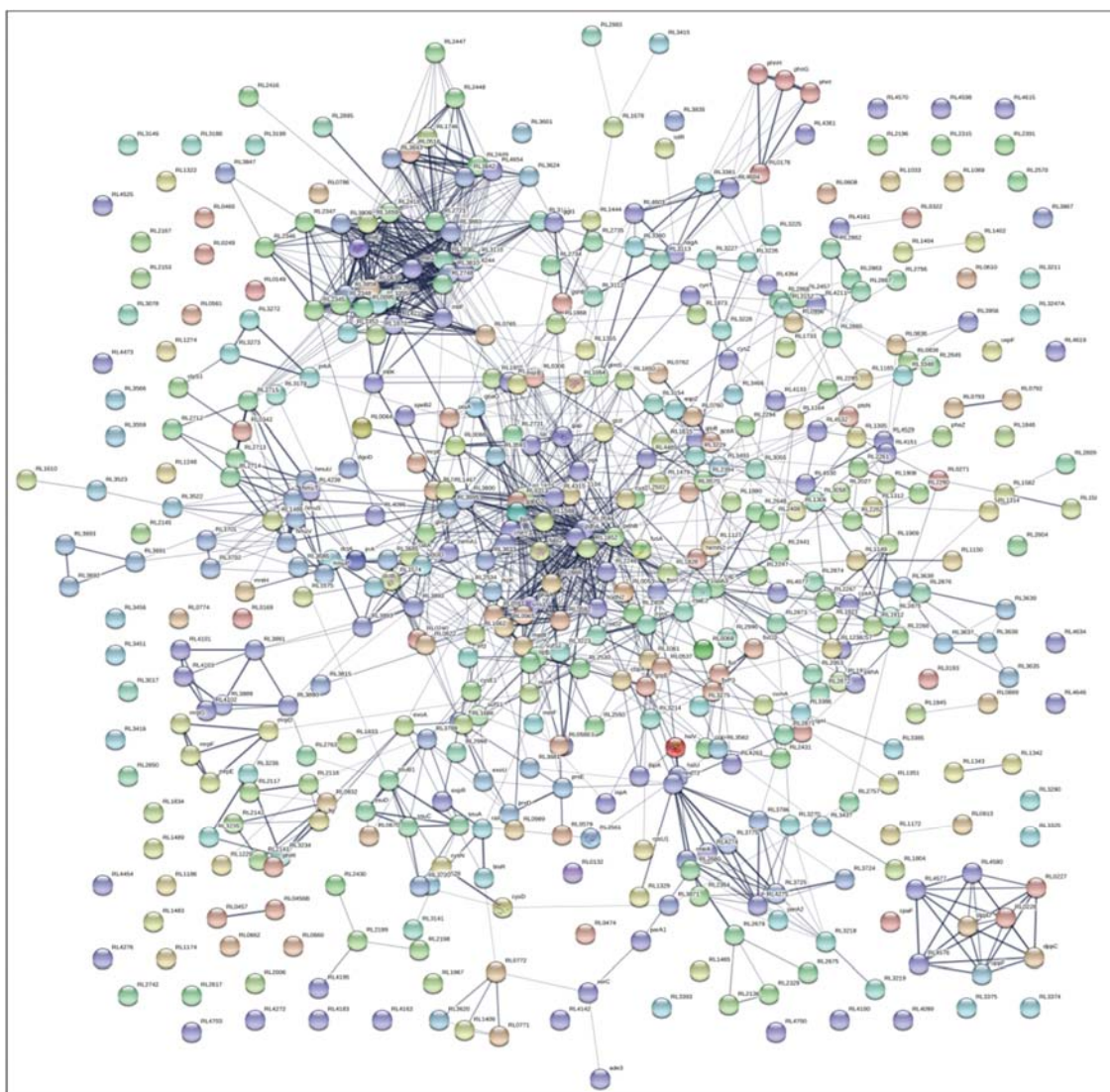


Figura V.6. Red de interacciones de las proteínas expresadas con menor expresión en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii*. Cada nodo corresponde a una proteína codificada por un GED. Este grupo de genes no presentó ninguna vía metabólica enriquecida de manera significativa. En este caso el color de los nodos no representan vías metabólicas.

V.3.b. Metabolismos que contienen genes expresados diferencialmente en condiciones de acidez.

Como se describió previamente, un gran número de transcritos presentan una expresión diferencial cuando las células se exponen a un estrés ácido en *R. favelukesii*. En esta sección describiremos en detalle los metabolismos y componentes celulares más relevantes que contienen a los transcritos expresados diferencialmente.

Fosforilación oxidativa.

Como ha sido descrito en el capítulo anterior, varias especies de rizobios han presentado alteraciones en la fosforilación oxidativa al ser expuesto a un estrés ácido (Tiwari *et al.*, 2004, Yuan *et al.*, 2008, Draghi *et al.*, 2016). Los resultados del transcriptoma de *R. favelukesii* en condiciones de acidez evidencian que un gran

número de genes involucrados en la fosforilación oxidativa presentaron una expresión diferencial al compararlo con la condición de neutralidad. En este sentido, los genes que codifican para 12 de las 14 subunidades de la NADH deshidrogenasa (complejo I) fueron sobre-expresados en condiciones de acidez (de *nuoC* a *nuoN*, Tabla A.2). En la Figura V.7 se muestra la disposición genómica de dichos genes junto a los valores de expresión obtenidos en el RNA-Seq. A su vez, numerosos transcritos pertenecientes al complejo II de la cadena transportadora de electrones (*sdhB*, *sdhA*, *sdhD* y *sdhC*) también presentaron una mayor abundancia en acidez. Del mismo modo, varios genes involucrados en el complejo III y IV mostraron una mayor expresión en acidez. Dichos genes incluyen a varias subunidades de la citocromo c oxidasa (*ctaC*, *ctaB*, *ctaD*, *ctaE*, *ctaG*, *coxP*, *coxO*, *coxN*) y varias de la citocromo reductasa del complejo citocromo bc1 (*fbcC*, *fbcB* y *fbcF*). Estos resultados demuestran un incremento sustancial en la expresión de los transcritos que codifican para la cadena transportadora de electrones en condiciones de acidez.

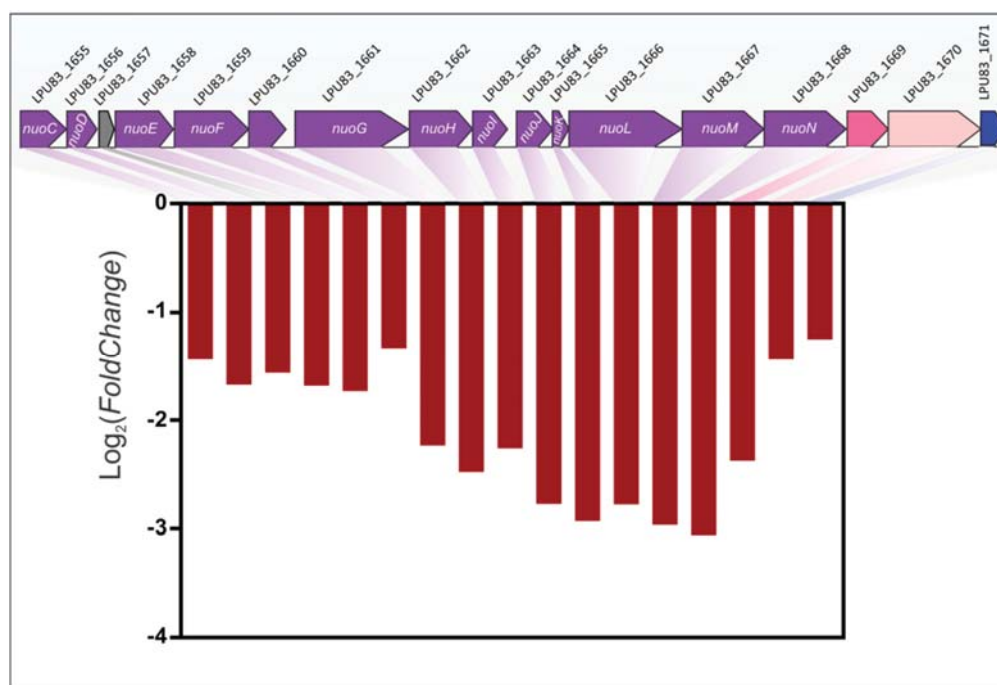


Figura V.7. Estructura genómica de la región que codifican para la NADH deshidrogenasa y su expresión en respuesta al pH ácido en *R. favelukesii*. Se muestra la disposición genómica de la región que contiene los genes de *nuoC* a *nuoN* que codifican para las subunidades de la NADH deshidrogenasa (complejo I) de la cadena transportadora de electrones. Dichos genes se representan por flechas violetas. En la sección inferior se muestra sobre el eje Y el logaritmo en base 2 de la razón de cambio de la abundancia de los transcritos a pH neutro con respecto a pH ácido (valor M).

Por último, los genes *atpF* y *atpC*, que codifican para las subunidades b y épsilon de la F₀F₁ ATP sintasa respectivamente, también presentaron un incremento en sus transcritos en condiciones ácidas. Ambas subunidades, b y épsilon, están relacionadas con el transporte de protones. En concordancia con los resultados obtenidos, Guerrero-Castro *et al.* (2018) describieron recientemente en *Rhizobium tropici* CIAT 899, un aumento en la expresión de dos genes que codifican para subunidades de F₀F₁ ATP sintasa cuando son expuestas a un estrés ácido, entre ellas la subunidad épsilon. Esta ATP sintasa normalmente cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP + Pi utilizando la energía del gradiente de protones electroquímico. Bajo condiciones de acidez, la hidrólisis de ATP puede ser usada para expulsar protones del citoplasma. Este flujo

vía de síntesis de este aminoácido (*hisZ*, *hisG*) cuya expresión aumenta en condiciones de acidez. Por otro lado, el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato presentó varios GED. Entre estos se encuentran *gltD*, *glnT* y *glsA*, los cuales presentan una mayor expresión en condiciones de acidez. El primero, *gltD*, codifica para una subunidad beta de una glutamato sintasa, que cataliza la conversión de dos glutamatos a glutamina más 2-oxoglutarato, $\text{NAD(P)}\text{H}^+$ y H^+ . El segundo, *glnT*, codifica para una glutamina sintetasa, que cataliza la incorporación de amonio a glutamato generando glutamina. Por último, *glsA*, codifica una glutaminasa que hidroliza la glutamina a glutamato con liberación de amonio. Un esquema de la organización de estas enzimas se presenta en la Figura V.9.

Metabolismo del carbono.

Del total de GED en condiciones de acidez, 24 agruparon en la categoría funcional relacionada al metabolismo y transporte de carbohidratos. En particular dos genes correspondientes a la vía de las pentosas fosfato presentaron una expresión diferencial. Uno de ellos, *tktB* (transcetolasa), presentó una mayor expresión en acidez, mientras que la expresión de *tal* (probable transaldolasa), presentó una menor expresión en estas condiciones con respecto a la condición neutra. Asimismo, los transcritos correspondientes a dos enzimas del metabolismo de piruvato, piruvato ortofosfato diquinasa (*ppdK*) y L-lactato deshidrogenasa (*lldD*), presentaron una mayor abundancia en condiciones de estrés. Esta última enzima cataliza la reacción de piruvato a lactato con producción de dos protones. Por otro lado, los genes que codifican para la mayoría de las enzimas involucradas en el ciclo del ácido tricarboxílico (*sucA*, *sucB*, *sucD*, *lpdA*, *sdhA*, *sdhB*, *sdhC*, *sdhD*, *fumB*, *acnA*) presentaron una mayor expresión en condiciones de estrés ácido.

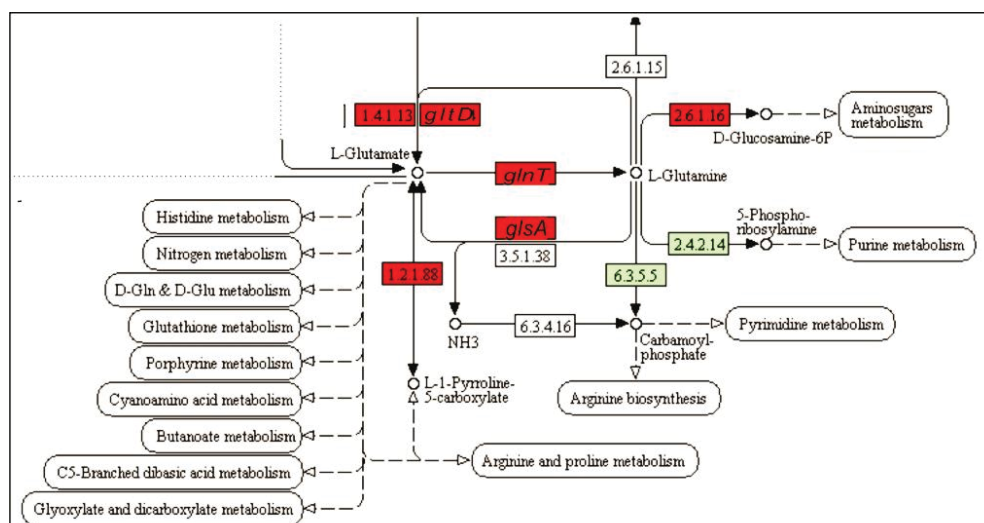


Figura V.9. Esquema de las reacciones involucradas en el metabolismo del glutamato en *R. favelukesii*. Las enzimas que catalizan la reacción se representan por recuadros con los nombres de los respectivos genes o con los códigos E.C. correspondientes. En rojo se muestran las enzimas cuyos transcritos presentaron una mayor expresión en condiciones de acidez. En verde se muestran las enzimas que están presentes en el genoma de *R. favelukesii* y en blanco las que se encuentran ausentes. E.C.2.6.1.16, glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa; E.C.1.2.1.88, L-glutamato gamma-semialdehído deshidrogenasa; E.C.1.4.1.13, glutamato sintasa (NADPH); E.C.2.4.2.14, amidofosforibosiltransferasa; E.C.6.3.5.5, carbamoyl-fosfato sintasa. Esquema obtenido a través de la herramienta KEGG Mapper.

Biosíntesis del flagelo, motilidad celular.

La motilidad bajo estrés ácido tiene un comportamiento variable según la especie que se observe. En *E. coli*, por ejemplo, la motilidad es inducida frente a un gradiente pronunciado de pH (Maurer *et al.*, 2005), sin embargo en *E. meliloti* se observa una disminución en la expresión de los genes del flagelo frente a un estrés ácido (Hellweg *et al.*, 2009). En *R. favelukesii*, 22 de los 25 genes involucrados en la biosíntesis del flagelo (*fliF*, *fliI*, *fliM*, *fliN*, *fliL*, *fliQ*, *fliP*, *flhA*, *motA*, *flgA*, *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgI*, *flgH*, *flaC*, *motA*, *motB*, *motD*, *hrpN*) presentaron una mayor expresión en condiciones de acidez (Figura V.10), en contrapuesto con lo descrito en *E. meliloti*. Llamativamente, *R. favelukesii* presenta un fenotipo no móvil, planteando la pregunta de la funcionalidad de esta respuesta.

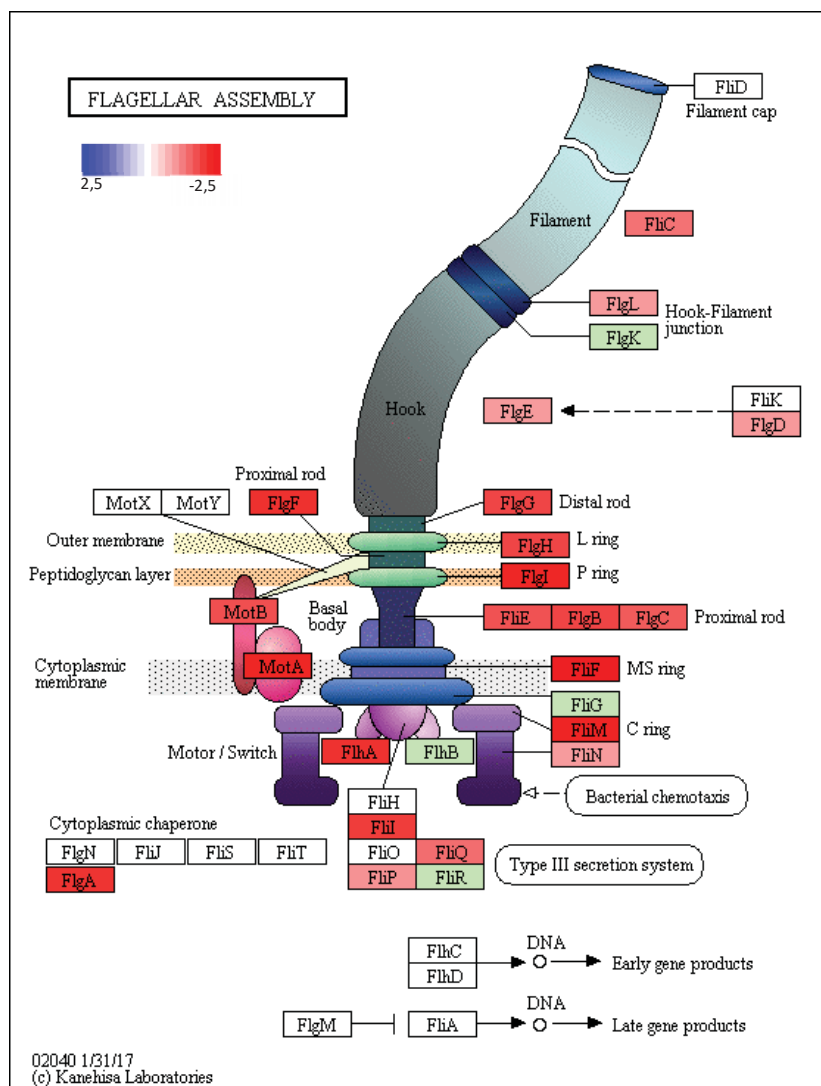


Figura V.10 Esquema de la estructura del flagelo en el que se representa la expresión diferencial de los transcritos involucrados en la respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El esquema fue realizado a través de la herramienta KEGG Mapper. El nivel de expresión de los GED se representa con una gama de colores, cuanto mayor es el nivel de sobre-expresión más intenso es el rojo. En verde se muestran las enzimas que están presentes en el genoma de *R. favelukesii* y en blanco las que se encuentran ausentes.

Envoltura celular.

Varios genes asociados con la envoltura celular presentaron una expresión diferencial en condiciones de estrés ácido en *R. favelukesii* (Tabla A.2). En este sentido, como ya hemos mencionado anteriormente, *E. meliloti* y *A. tumefaciens* presentan un aumento en la expresión de la mayoría de los genes *exo*, así como también en el sistema regulatorio de dos componentes *ExoS-ChvI*, bajo condiciones de estrés ácido (Yuan *et al.*, 2008, Hellweg *et al.*, 2009). En el análisis transcriptómico de *R. favelukesii*, se evidencia que los genes *exoA*, *exoK*, *exoL* y *exoY* presentan una menor expresión en condiciones de acidez, mientras que *exoN* y *exoQ* presentan una mayor expresión, siendo estos resultados nuevamente no concluyentes para dilucidar el comportamiento del EPS en acidez.

Por otro lado, varios genes relacionados a la biosíntesis del peptidoglicano presentaron una expresión alterada. Entre ellos, se encuentran los genes, *ddl*, *uppP* y *pbpC*, que codifican para una D-alanina-D-alanina ligasa, una undecaprenil-difosfatasa y una proteína de unión a penicilina 1A, respectivamente. Los tres genes mostraron tener una mayor expresión en acidez. Además, tres probables glicosiltransferasas (GTasas; LPU83_0377, LPU83_1936 y LPU83_pLPU83d_0134) involucradas posiblemente en la biosíntesis del mismo componente fueron sobre-expresadas. Además, dos genes que catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (*mltB* y LPU83_2746) también presentaron una mayor abundancia en condiciones de acidez. Sumado a esto, el gen *lppB*, que codifica para la lipoproteína NlpD, reguladora de la actividad de amidasas, también presentó un incremento en su nivel de expresión en condiciones de estrés. Otro gen, que mostró un incremento en su expresión frente al estrés, es el gen *pal* que codifica para una proteína asociada al peptidoglicano del sistema Tol-Pal, el cual está involucrado en mantener la integridad de la membrana externa e importar moléculas orgánicas como nutrientes.

Por otro lado, la biosíntesis del lipopolisacárido también contuvo varios GED frente al estrés. El lipopolisacárido es requerido por los rizobios para suprimir las defensas del huésped, permitiendo a los rizobios infectar exitosamente y sobrevivir durante un largo tiempo en las células huésped (Rincon-Zachary, 2010). En este sentido, en *R. favelukesii*, 4 genes involucrados en las etapas tempranas de biosíntesis de lipopolisacárido: *lpxA*, *lpxB*, *lpxC*, *lpxL* tuvieron un nivel de transcripto superior frente a la acidez. Además, el gen *LptA* (LPU83_2061) presentó una mayor expresión. Dicho gen podría estar involucrado en el transporte del LPS a través del periplasma y la membrana externa (Schultz *et al.*, 2017).

Transferencia conjugativa y quimiotaxis.

Varios genes involucrados en la transferencia conjugativa de uno de los plásmidos de *R. favelukesii* presentaron un menor nivel de expresión en condiciones de acidez (*trbB*, *trbC*, *trbD*, *trbE*, *trbF*, *trbG*, *trbH*, *trbI*, *trbJ*, *trbK*, *trbL*, *trbE*). Por otro lado, los transcriptos de 25 genes involucrados en la quimiotaxis presentaron en su mayoría una mayor expresión bajo condiciones de estrés (Figura V.11). Entre estos se encuentran genes asociados a sistemas de dos componentes (*cheA*, *cheB*, *cheW*, *cheR*, *cheY*) y varios genes

que codifican para proteínas quimiotácticasceptoras de metilo (proteínas receptoras transmembrana, *mcpV*, *mcpX*, *mcpA7* y LPU83_pLPU83d0676).

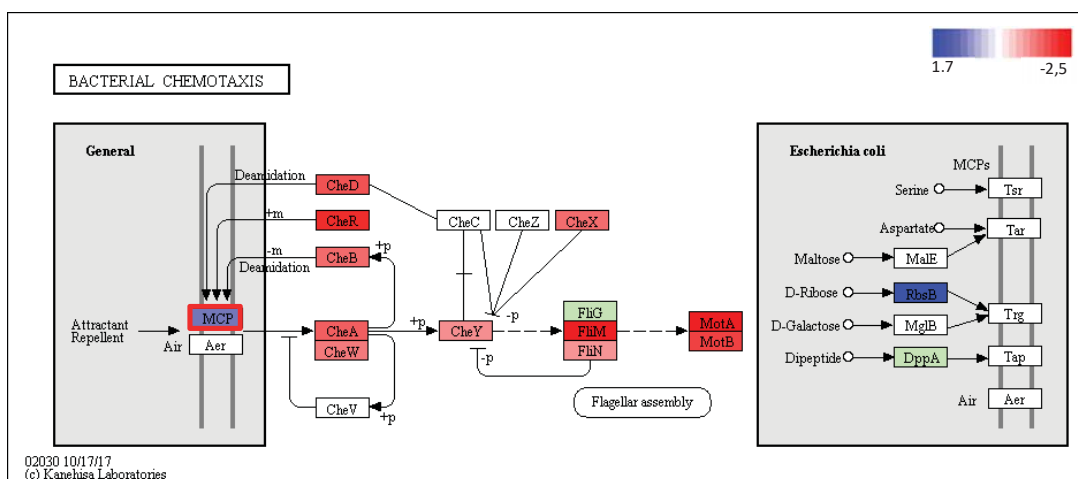


Figura V.11. Esquema de quimiotaxis bacteriana donde se representa la expresión diferencial de los transcritos involucrados en la respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El esquema fue realizado a través de la herramienta KEGG Mapper. El nivel de expresión de los GED se representa con una gama de colores, cuanto mayor es el nivel de sobre-expresión más intenso es el rojo y cuanto mayor es el nivel de inhibición más intenso es el azul. El recuadro rojo con relleno azul representa varios genes con niveles de expresión aumentados y disminuidos. En verde se muestran las enzimas que están presentes en el genoma de *R. favelukesii* y en blanco las que se encuentran ausentes.

Otros grupos funcionales.

Como hemos mencionado anteriormente, las chaperonas pueden estar involucradas en la respuesta al estrés. En este análisis, los transcritos que corresponden a las chaperonas *dnaK* y *groES* mostraron estar sobre-expresados, al igual que una serin proteasa tipo DegP (*degQ*) y una posible proteína de choque al frío (Putative cold shock protein, LPU83_0110). En contraposición, el nivel de expresión de los transcritos de una chaperona DnaJ (LPU83_pLPU83d_1507) y una pequeña chaperona de choque térmico (LPU83_0456) fue menor en condiciones de estrés. En este sentido, también fue menor la expresión de dos genes codificantes para proteínas de choque térmico (LPU83_2461, LPU83_pLPU83b_0295), así como también la expresión del transcritos de una peptidasa (*clpP1*, LPU83_pLPU83d_0474) asociada a la respuesta SOS.

Una categoría funcional relevante por el número de GED que contuvo fue la categoría funcional: traducción, estructura y biogénesis de ribosomas (COG J), contuvo 61 GED y en su mayoría presentaban una mayor expresión en condiciones de acidez (Figura V.5). Treinta genes codificantes para proteínas ribosomales mostraron un incremento de la expresión (ver Tabla A.2). El mismo comportamiento se evidenció en la expresión de 24 transcritos correspondientes a 14 ARN de transferencia de los aminoácidos glutamato, alanina, aspartato, asparagina, glicina, treonina, serina, cisteína, metionina, fenilalanina, arginina, prolina, lisina, isoleucina y valina. En concordancia, 6 genes codificantes para aminoacil-ARNt sintetasas (*pheT*, *trpS*, *aspS*, *gltX1*, *lysS*, *leuS*) presentaron una mayor expresión en sus transcritos en condiciones de acidez, así como también el factor de elongación Tu, EF-Tu (*tufB*) (ver Tabla A.2).

Cabe destacar que dentro de los GED se encontraron varios genes que codifican para sistemas de dos componentes, 4 reguladores de respuesta y 5 histidina quinasas (ver Tabla A.2). Además de los nombrados

previamente en quimiotaxis (*cheA*, *cheB*, *cheW*, *cheR*, *cheY*), entre estos GED, se encuentra el sistema de dos componentes *feuP-feuQ* (LPU83_1257 y *feuQ*) cuya expresión se encontró incrementada en acidez. En *E. meliloti* la histidina quinasa, FeuQ, y el regulador de respuesta, FeuP, juegan un rol importante en la etapa de infección de la simbiosis por regulación positiva de la expresión del exportador del glucano cíclico, NdvA. La activación transcripcional de *ndvA* es estimulada por baja osmolaridad extracelular (Griffitts *et al.*, 2008).

Asimismo, numerosos reguladores transcripcionales presentaron una expresión alterada a nivel transcriptómico en acidez. Dos de ellos codifican para dos posibles reguladores transcripcionales transmembrana (factor anti-sigma, LPU83_pLPU83d_0193; LPU83_2665) y mostraron una menor expresión en condiciones de estrés. Estos reguladores poseen un dominio RsiW. En *Bacillus subtilis*, antisigma RsiW inhibe la actividad de SigW, requerida para la iniciación de la transcripción de genes de respuesta a diversos estreses (Devkota *et al.*, 2017). En relación a esto, el gen codificante de la RNA polimerasa factor sigma *sigW* (LPU83_2664) también presentó una menor expresión en *R. favelukesii* en condiciones de acidez.

Por otro lado, el análisis transcriptómico de *R. favelukesii* reveló la expresión diferencial de tres bombas transportadoras de membrana (*Efflux pump membrane transporter*) codificadas por los genes *acrF1*, *acrF5* y *bepG*. Entre ellos, *acrF5* fue el único que presentó una mayor expresión en condiciones de acidez.

Por último, resulta interesante destacar que, al igual que en otros rizobios, el gen *lpiA* (*low pH-inducible gene A*) presentó un aumento en su nivel de expresión en acidez. Este gen es requerido para la adaptación a pHs bajos en *E. medicae* (Tiwari *et al.*, 2004, Reeve *et al.*, 2006). Este resultado concuerda con lo descrito por Hellweg *et al.* (2009), que en *E. meliloti* evidenciaron que *lpiA* presenta un fuerte y permanente incremento en su expresión en condiciones de acidez.

En este capítulo se avanzó en la caracterización de la respuesta al estrés ácido de *R. favelukesii* a nivel transcripcional. Se obtuvo un protocolo optimizado de extracción y purificación de ARN específico para las condiciones a evaluar. A su vez, se evaluó el resultado de varios secuenciamientos utilizando distintas estrategias. Estos resultados permitieron demostrar la relevancia de secuenciar cada réplica biológica de manera independiente. Sin embargo, los genes obtenidos con un presumible cambio de expresión en la secuenciación de las muestras compuestas correlacionan con los obtenidos en las secuenciaciones realizadas de las réplicas de manera independiente. Es por esto, que se podría considerar el análisis a través de muestras compuestas como una primera aproximación para la caracterización de la respuesta al estrés más accesible en términos de costos y manejo de datos.

Por otra parte, considerando los resultados obtenidos en el transcriptoma de *R. favelukesii*, se encontraron cerca de 2000 genes involucrados en la tolerancia a la acidez. En efecto, este resultado, refleja la complejidad de la respuesta al estrés ácido y la potencia de la técnica utilizada para detectar genes diferencialmente expresados de manera significativa. Profundizando este estudio, a través de un análisis *in*

silico de las funciones bioquímicas de este gran número de genes, se evidenciaron los metabolismos y sistemas alterados más relevantes. Estos involucran a la fosforilación oxidativa, la maquinaria de motilidad celular, el metabolismo de aminoácidos y la síntesis del peptidoglicano, entre otros. Cabe destacar, además, que cerca del 25% de los genes expresados diferencialmente codifican para proteínas hipotéticas

En el capítulo siguiente se presenta una evaluación de la respuesta fenotípica de cepas mutantes en varios de los genes involucrados en la tolerancia a la acidez identificados por medio de esta técnica y del análisis proteómico del capítulo anterior.

CAPÍTULO VI

EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE MUTANTES EN
GENES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA A
LA ACIDEZ EN *RHIZOBIUM FAVELUKESII*

VI.1. Introducción

Las aproximaciones ómicas permiten caracterizar múltiples cambios en los determinantes moleculares bajo diferentes condiciones. Sin embargo, lamentablemente, no hacen referencia a la contribución individual que pueda tener cada uno de estos determinantes en el comportamiento fenotípico global ante la condición de estrés evaluada. Al observar la respuesta de *R. favelukesii*, tanto a nivel transcriptómico como proteómico (Capítulos IV y V), la misma presenta una alta complejidad cuando se expone el rizobio a pH ácido. En consecuencia, resulta necesario invertir esfuerzos en caracterizar la contribución real, de cada uno de estos determinantes, al fenotipo observado frente a la condición de estrés.

En este capítulo se describirá la caracterización fenotípica de mutantes en genes que fueron detectados como diferenciales por ambas técnicas, así como también, de una cepa de *R. faveleukesii* carente de su plásmido simbiótico. En este sentido, explorar el grado de relevancia de los determinantes de expresión diferencial permitirá conocer si los estudios ómicos, más allá de su aporte al conocimiento global de la adaptación al estrés, son de utilidad para identificar determinantes que sean directamente responsables sobre el fenotipo de la tolerancia a la acidez y, como consecuencia, que puedan ser útiles en el futuro para el mejoramiento general de los rizobios a la tolerancia a la exposición a bajos pHs.

VI.2. Determinación del nivel de expresión de los transcriptos de genes seleccionados a partir de los estudios ómicos a través de una técnica no masiva.

Luego de realizar los estudios a nivel global de la expresión en *R. favelukesii* en respuesta al estrés ácido, resulta interesante corroborar la expresión de los genes identificados con una expresión diferencial a través de una técnica no masiva. En este sentido, la técnica de la reacción de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), o PCR cuantitativa, permite determinar la cantidad de transcriptos presentes en distintas condiciones. En consecuencia, se analizaron los niveles de expresión de algunos transcriptos, correspondientes a genes que mostraron una expresión diferencial, tanto por proteómica como por transcriptómica. Para este análisis, se cuantificó la cantidad de transcripto de 5 GED, en condiciones de acidez y de neutralidad, por el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los 5 GED seleccionados fueron: *nuoH*, codificante de la subunidad H de la NADH deshidrogena, involucrada a la fosforilación oxidativa (sobre-expresado); *livK*, un transportador de aminoácidos ramificados que podría estar involucrado en el transporte de GABA (sobre-expresado); LPU83_3186 y LPU83_3191, dos proteínas hipotéticas; y *hmuS*, una proteína transportadora de hierro (los 3 con menor expresión). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VI.1, donde se presentan los valores de la razón de cambio de la condición de acidez con respecto a la condición neutra. En esta Figura, se evidencia que todos los genes evaluados presentan la misma tendencia de expresión que los obtenidos tanto en el análisis transcriptómico como en el proteómico. En la Tabla de la Figura VI.1 se pueden comparar los

valores del $\log_2\text{FoldChange}$ (M) de los genes caracterizados con cada técnica. Esto demuestra la correlación en el nivel de expresión de los transcritos obtenidos por RT-PCR, con los obtenidos a través de las dos técnicas ómicas.

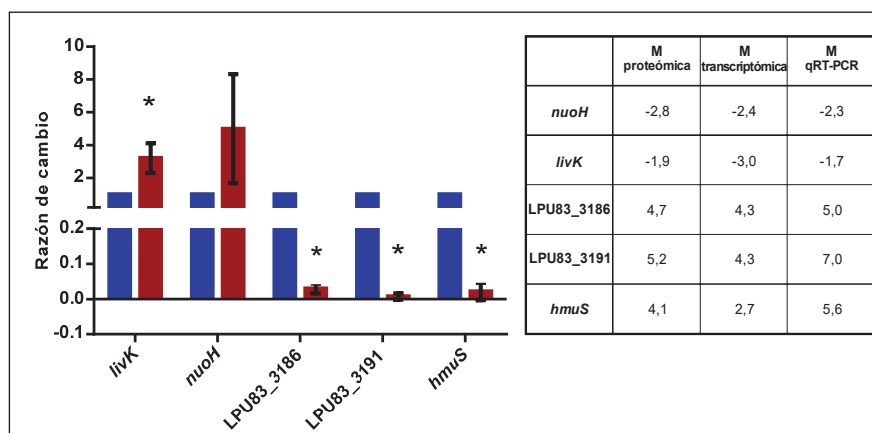


Figura VI.1. Niveles de expresión de los transcritos de GED identificados a partir de transcriptómica y proteómica en *R. favelukesii*. Para cada uno de los genes indicados en la abscisa, se muestran los valores de *foldchange* en condiciones de acidez (rojo) y de neutralidad (azul). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 réplicas biológicas. Los niveles de transcritos presentaron diferencias significativas (* p-value <0.05). En la Tabla se muestran los valores de expresión obtenidos a partir de cada técnica utilizada.

VI.3. Efectos del pH en la permeabilidad celular de *R. favelukesii* LPU83.

Como resultado del análisis transcriptómico y proteómico se puso de manifiesto que numerosas proteínas asociadas en la síntesis del peptidoglicano presentaron una expresión diferencial. A partir de estos resultados, se decidió avanzar en la caracterización de la envoltura celular en condiciones de acidez. Por consiguiente, a fin de determinar la permeabilidad celular de *R. favelukesii*, se realizó un ensayo de la actividad β -galactosidasa en la condición control y bajo estrés ácido. El sustrato de la β -galactosidasa puede difundir regularmente en forma pasiva por medio de la permeasa. No obstante, si la permeabilidad de la membrana se ve afectada por algún estímulo externo, consecuentemente el ingreso del sustrato también se verá alterado en dichas condiciones. Este hecho permite correlacionar la actividad de la β -galactosidasa con el grado de permeabilidad de la membrana (Lehrer *et al.*, 1988). En este sentido, *R. favelukesii* posee, en el plásmido A, los genes codificantes para la β -galactosidasa y la permeasa del sistema de transporte de lactosa. El resultado del ensayo de permeabilidad en *R. favelukesii* en condiciones neutras y de acidez se muestra en la Figura VI.2. En dicha Figura se presentan las unidades Miller obtenidas para cada condición en el transcurso de 3 horas. Se evidencia así, que *R. favelukesii* presenta una disminución en la actividad β -galactosidasa al ser cultivado en condiciones de acidez. Este resultado sugiere que las células de *R. favelukesii* poseen una menor permeabilidad que a pH neutro en esta condición.

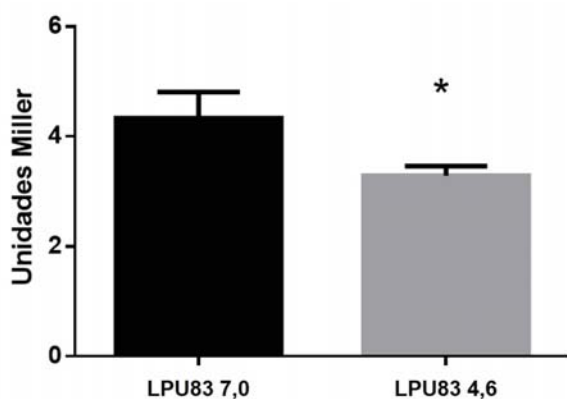


Figura VI. 2 Determinación de la actividad β -galactosidasa en células de *R. favelukesii* cultivadas en condiciones de acidez y de neutralidad. La actividad β -galactosidasa se expresa en Unidades Miller. Se observan diferencias significativas en ambas condiciones con un p-value de 0,05 (t-test). El análisis estadístico fue realizado utilizando 3 réplicas biológicas.

VI.4. Evaluación del fenotipo de mutantes en genes de expresión diferencial en respuesta a la acidez.

VI.4.a. Caracterización del crecimiento en acidez de mutantes en genes expresados diferencialmente en respuesta a la acidez.

A través del uso de mutantes se puede estudiar el rol de un gen en una función determinada. En esta sección se propone avanzar en el estudio fenotípico de mutantes con el fin de caracterizar el rol que cumplen en la tolerancia a la acidez. A tal efecto, se seleccionó un grupo reducido de genes sobre-expresados (proteómica y transcriptómica) a estudiar en condiciones de acidez. Este grupo de genes contiene el gen *livK* y *braD*, que forman parte de un complejo transportador de aminoácidos ramificados que en *Agrobacterium* está involucrado en la absorción de GABA; el gen LPU83_pLPU83a_0021, que codifica para una proteína hipotética y por último, el gen LPU83_2016, que codifica para una posible proteína de fago. A partir de la cepa salvaje, *R. favelukesii* LPU83, se obtuvieron los mutantes por inserción de un vector en cada uno de estos genes (ver sección II.3.f). En primer lugar, a fin de avanzar en el estudio de su relevancia en la tolerancia a la acidez, se evaluó la capacidad de crecimiento de los distintos mutantes en condiciones de estrés ácido (pH 4,6).

Mutante en LPU83_pLPU83a_0021.

El gen LPU83_pLPU83a_0021; codifica para una proteína hipotética pero la misma presenta un dominio relacionado con FixH, una proteína presente en el género *Rhizobium*. Se ha sugerido que dicha proteína puede participar en un complejo unido a la membrana que acopla la bomba de cationes, FixI, con un proceso redox catalizado por FixG. También posee un dominio YtkA, el cual en *Bacillus subtilis* está relacionado con una proteína involucrada en la captación de cobre extracelular oxidado en condiciones limitantes de cobre.

Las curvas de crecimiento para el mutante en LPU83_pLPU83a_0021, denominado *R. favelukesii* LPU83-pLPU83a_0021, se realizaron en condiciones de acidez y a pH neutro en paralelo con la cepa salvaje. La Figura VI.3 muestra las curvas resultantes para cada una de las cepas. Se evidencia que la cepa mutante presenta

un crecimiento similar al compararlo con la cepa salvaje tanto en la condición de estrés como en la condición control durante las primeras horas de crecimiento, sin embargo, en ambas condiciones el mutante alcanza un menor valor de DO_{600nm} .

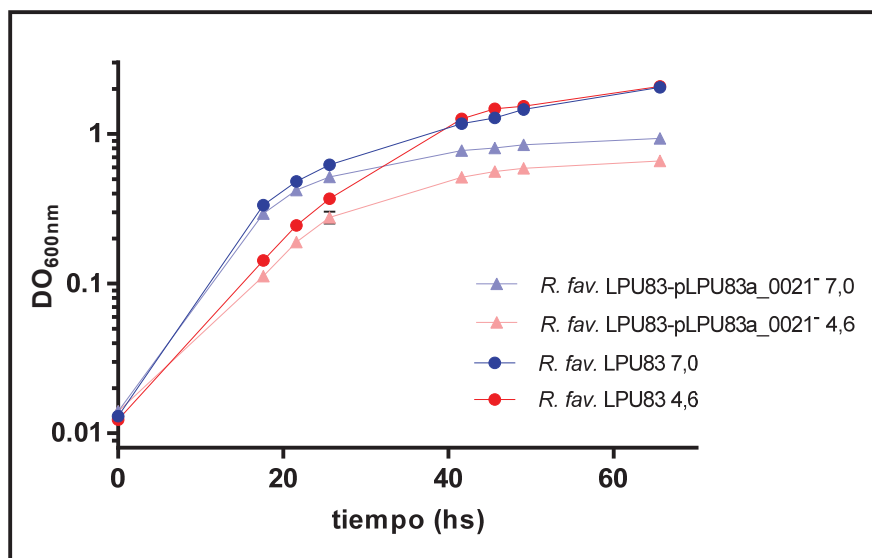


Figura VI.3. Curvas de crecimiento de *R. favelukesii* LPU83-pLPU83a_0021⁻ y de la cepa salvaje en medio GS en acidez y neutralidad. Se observa el progreso del número de DO a 600 nm en función del tiempo para la cepa salvaje y la cepa mutante a pHs 7,0 y 4,6. El mutante presenta un fenotipo alterado tanto pH neutro como en acidez.

Mutante en *livK*.

El siguiente mutante a evaluar fue el mutante en *livK*, denominado *R. favelukesii* LPU83-*livK*⁻. Para avanzar en su caracterización, se realizó en primera instancia, al igual que en el mutante anterior, una curva de crecimiento de seguimiento manual. En este sentido, se pudo evidenciar un crecimiento diferencial del mutante en *livK* con respecto a la cepa salvaje en condiciones de acidez (resultados no mostrados). Como consecuencia, se decidió caracterizar la cinética de crecimiento para este mutante, realizando las curvas de crecimiento en un lector de microplacas multifuncional, que permite determinar la tasa de crecimiento con mayor exactitud. Las curvas resultantes se muestran en la Figura VI.4A. Se puede observar que el mutante presenta un crecimiento diferencial a pH ácido con respecto a la cepa salvaje. Al determinar los parámetros cinéticos, se observa que a pH 7 no existen diferencias significativas con la cepa salvaje, pero si se ven a pH 4,6, donde el mutante presenta un mayor tiempo de duplicación (Figura VI.4.B). Resulta interesante destacar el cambio en la forma de la curva en la condición de acidez al comparar la cepa salvaje con el mutante. Estos resultados refuerzan la identificación de este gen como partícipe de la tolerancia a la acidez en *R. favelukesii*.

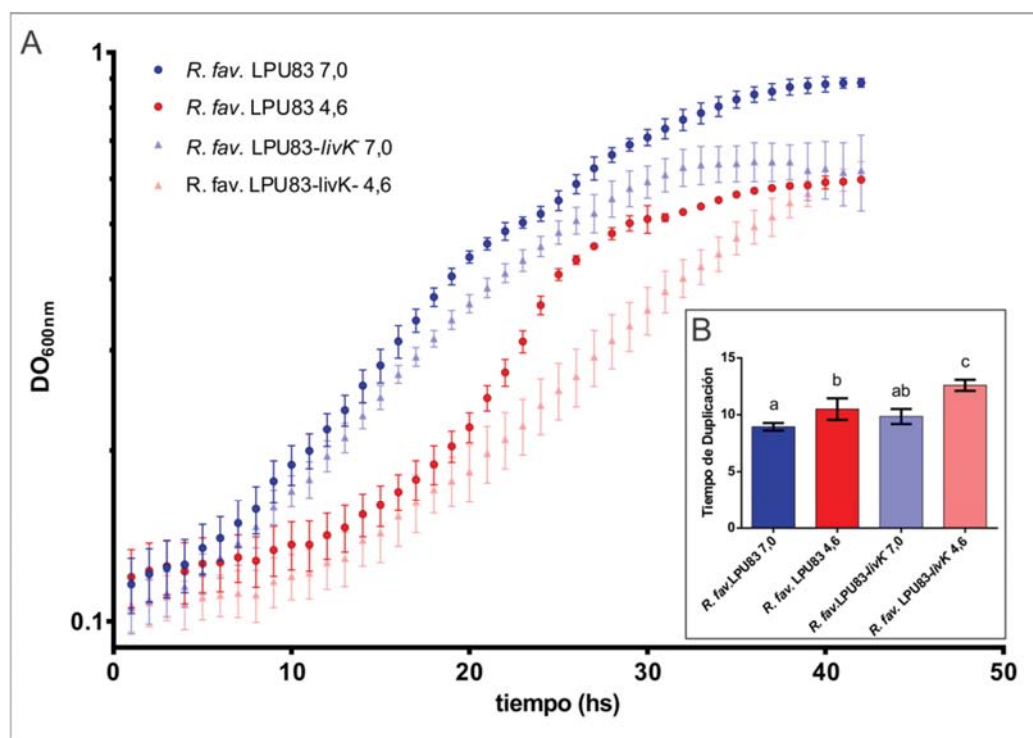


Figura VI.4. Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación correspondientes al mutante *R. favelukesii* LPU83-*livK* y a la cepa salvaje, a pH 7,0 y 4,6. A. Curvas de crecimiento para la cepa mutante y salvaje. B. Tiempos de duplicación a cada pH, siendo los mismos significativamente diferenciales (test de Tukey, α : 0,05). Los datos estadísticos se realizaron a partir de 3 réplicas biológicas independientes.

Mutante en *braD*.

Asociado al mutante anterior, el siguiente gen a evaluar fue el mutante en *braD*, denominado *R. favelukesii* LPU83-*braD*⁻. Ambos genes, *braD* y *livK*, forman parte del mismo complejo transportador. Para avanzar en su caracterización, se realizó directamente la caracterización de la cinética de crecimiento a través del lector de microplacas multifuncional. Los resultados de dicha caracterización se muestran en la Figura VI.5. Al observar las curvas (Figura VI.5.A), el mutante presenta un crecimiento diferencial a pH ácido con respecto a la cepa salvaje. En este sentido, cabe destacar que nuevamente se observa el mismo cambio, que se evidenció en el mutante en *livK*, en la forma de la curva del mutante comparada con la cepa salvaje en la condición de acidez. Al observar las formas de las curvas parecería que el crecimiento del mutante a pH neutro también es diferencial respecto a la cepa salvaje en las mismas condiciones. Sin embargo, al determinar los parámetros cinéticos, el tiempo de duplicación a pH 7 no presenta diferencias significativas con la cepa salvaje. Por el contrario, a pH 4,6, si se ven diferencias significativas, presentando el mutante un mayor tiempo de duplicación (Figura VI.5.B). Por otro lado, las curvas correspondientes al mutante presentan un cambio singular en el crecimiento sobre el final de las mismas. Relacionado a esto, se evidenció un fenotipo particular sobre las microplacas de cultivo en el mutante a pH neutro, donde se observa una aglutinación de las células sobre el fondo (Figura VI.5.C). Estos resultados, sumados a los del gen *livK*, fortalecen la posibilidad del rol del complejo transportador, conformado por ambos genes, como partícipe de la tolerancia a la acidez en *R. favelukesii*.

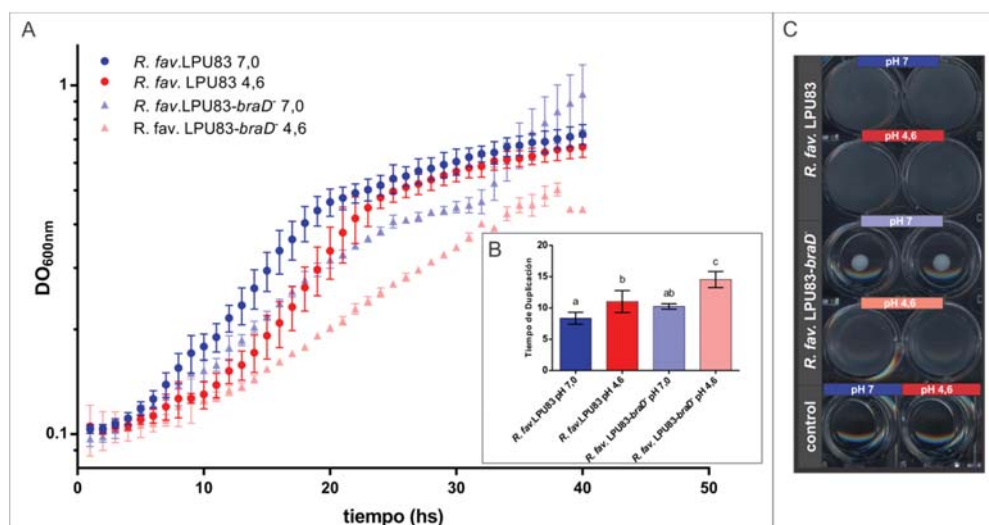


Figura VI.5. Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación correspondientes al mutante *R. favelukesii* LPU83-braD⁻ y a la cepa salvaje, a pH 7,0 y 4,6. A. Curvas de crecimiento para la cepa mutante y salvaje. B. Tiempos de duplicación a cada pH, siendo los mismos significativamente diferenciales (test de Tukey, α : 0,05). Los datos estadísticos se realizaron a partir de 3 réplicas biológicas independientes. C. Fenotipo de crecimiento en microplaca para la cepa mutante y la para la cepa salvaje en condiciones neutras y de acidez. Los controles corresponden a medio GS sin inocular. La Figura es representativa de 3 réplicas biológicas.

Mutante en LPU83_2016.

Por último, se estudió el fenotipo en acidez del mutante en LPU83_2016, denominado *R. favelukesii* LPU83-2016⁻. Las curvas de crecimiento se realizaron a través del lector de microplacas para la cepa salvaje y mutante. En la Figura VI.6 se puede observar que la cepa mutante en LPU83_2016 no presenta diferencias en las curvas de crecimiento comparado con la cepa salvaje, tanto a pH ácido como neutro. Estos resultados sugieren que este gen no sería indispensable en el crecimiento en condiciones de acidez.

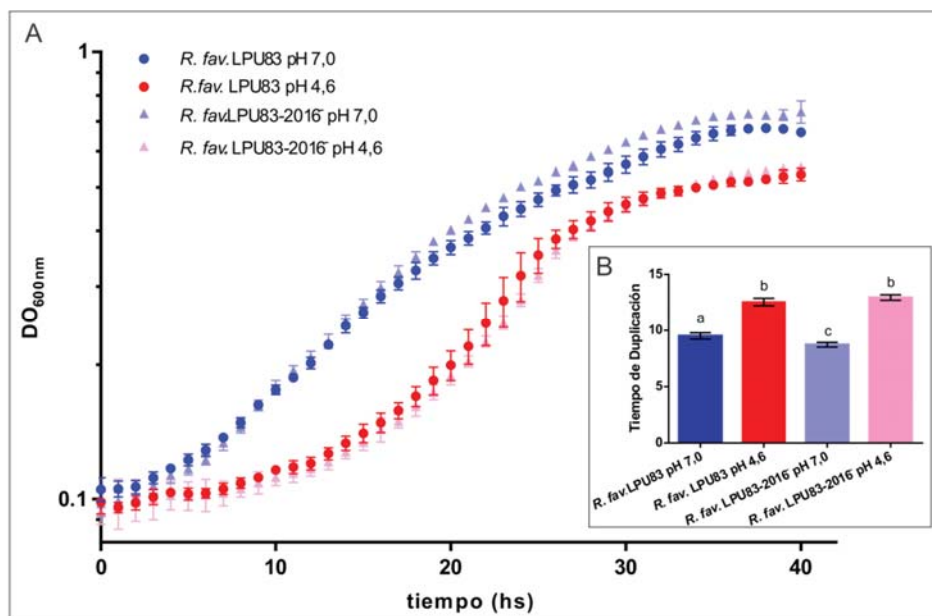


Figura VI.6. Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación correspondientes al mutante *R. favelukesii* LPU83-2016⁻ y a la cepa salvaje, a pH 7,0 y 4,6. A. Curvas de crecimiento para la cepa mutante y salvaje. B. Tiempos de duplicación a cada pH, siendo los mismos significativamente diferenciales (test de Tukey, α : 0,05). Los datos estadísticos se realizaron a partir de 3 réplicas biológicas independientes.

VI.4.b. Caracterización de la cinética de muerte en acidez de los mutantes.

Una manera de evaluar la función de un gen frente a un estrés determinado es observar si una mutación del mismo puede producir alteraciones en el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, la ausencia de un cambio fenotípico no necesariamente indica que ese gen no esté involucrado en la supervivencia al estrés. Por esta razón, también resulta de interés evidenciar el fenotipo de cepas mutantes en condiciones de estrés severo (muerte celular). En consecuencia, como parte de la caracterización fenotípica se evaluó también la cinética de muerte de los mutantes a pH ácido. El comportamiento de la cepa salvaje a pHs inferiores a 4,0 se evaluó en el tercer capítulo de este trabajo (Capítulo III.2.d). Teniendo en cuenta dichos resultados, se decidió utilizar un valor de pH de 3,5 para evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las cepas mutantes en el transcurso de 2 hs de exposición al estrés severo. Para este ensayo, se seleccionaron de manera representativa dos de los cuatro mutante descritos anteriormente, un mutante que haya mostrado un fenotipo diferencial en el crecimiento y uno que no lo presentara. De este modo, las cepas que se caracterizaron en este estudio fueron las cepas mutantes en *livK* y en LPU83_2016. En la Figura VI.7 se muestran los valores del tiempo de reducción decimal ($D = 1/\text{pendiente del log ufc/ml en función del tiempo}$). D , es el tiempo en el cual el número de células viables se reduce en un factor de 10. Ambos mutantes presentan una disminución en el tiempo de reducción decimal cinco veces menor a la cepa salvaje. Es decir, que los mutantes presentan una velocidad de muerte significativamente mayor frente a la condición de estrés ácido ensayada.

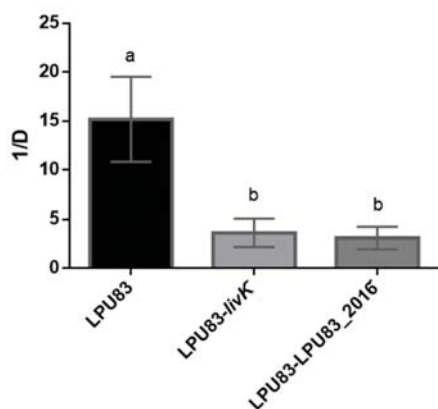


Figura VI. 7 Determinación del tiempo de reducción decimal (D) en medio GS a pH 3,5. Valores del tiempo de reducción decimal (D) obtenidos por exposición a pH 3,5 de las células provenientes de las cepa salvaje y mutantes en *livK*, y LPU83_2016. El valor D corresponde al tiempo en el que el número de células viables se reduce en un factor 10, y se calcula como el módulo de la inversa de la pendiente de cada una de las rectas que resultan de graficar log ufc/ml en función del tiempo post-exposición al ácido. Las barras de error corresponden a la varianza de 3 ensayos independientes. Las pendientes de los mutantes presentan diferencias significativas con respecto al mutante (*test* de Tukey, $\alpha=0,05$).

VI.5. Evaluación del fenotipo en respuesta a la acidez de una cepa de *R. favelukesii* carente de plásmido simbiótico.

Como se ha descrito previamente, *R. favelukesii* contiene 4 plásmidos, entre los que se encuentra incluido el plásmido simbiótico (pLPU83b). En el capítulo anterior al analizar la localización genómica de los GED se observó que una gran parte de estos genes pertenecían al plásmido simbiótico (pSym). De hecho, el 60 % de los genes de este plásmido presentaron una expresión diferencial en condiciones de estrés ácido (Figura V.4). Estos resultados impulsaron el interés de determinar cómo sería el comportamiento fenotípico

de una cepa de *R. favelukesii* que no contuviera dicho plásmido frente al estrés ácido. En consecuencia, se propuso evaluar el fenotipo resultante ante la ausencia de gran número de genes (el total de genes del pSym).

VI.5.a. Obtención de una cepa de *R. favelukesii* curada de su plásmido simbiótico.

Para evaluar el impacto de la carencia de todo un replicón en la tolerancia a la acidez es necesario, en primer lugar, obtener una cepa de *R. favelukesii* que no contenga dicho replicón. En este sentido, a fin de curar el plásmido simbiótico de este rizobio, se propuso curarlo por incompatibilidad. La incompatibilidad plasmídica es una característica que está asociada al mecanismo por cual los plásmidos controlan el inicio de la replicación y herencia estable. Los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo de incompatibilidad comparten estos mecanismos y, como consecuencia, no pueden ser coheredados en forma estable. Es decir, dos plásmidos son incapaces de coexistir en la misma célula si sus funciones de replicación y partición interfieren, por ende, son incompatibles. Aprovechando esta característica, se planteó como estrategia introducir, en *R. favelukesii*, una copia de la región de replicación y partición *repABC* de su pSym en el plásmido pCR 2.1-Topo. El plásmido incompatible con el pSym de *R. favelukesii* se denominó TOPO-*repABC-mob*. Una vez obtenido dicho plásmido se introdujo por conjugación en *R. favelukesii*. Como receptora de la conjugación se utilizó una cepa de *R. favelukesii* que contiene el gen de resistencia a gentamicina (Gm) interrumpiendo el gen *nodH* (ubicado en el plásmido simbiótico). El uso de esta cepa permitió monitorear la pérdida del plásmido simbiótico por pérdida de la resistencia a Gm. Luego, con las bacterias transconjugantes sensibles a Gm, se corroboró la pérdida del pSym a través de distintos ensayos (ver II.3.i).

VI.5.a.1. Análisis del contenido plasmídico de los transconjugantes Gm sensible.

Para avanzar en la caracterización de los transconjugantes obtenidos, se analizó el contenido plasmídico de cada uno por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa. Esta técnica permite visualizar fácilmente el contenido genómico de las bacterias evidenciando la presencia de plásmidos de alto peso molecular. En la Figura VI.8 se observa el perfil plasmídico de la cepa salvaje de *R. favelukesii*, donde se puede notar la presencia de 3 bandas correspondientes a sus 4 plásmidos. Esto se debe a que la resolución de la técnica no permite discriminar entre el plásmido pLPU83c y el pSym (pLPU83b), ya que la diferencia de tamaño entre ambos no es suficiente para poder visualizarlos con esta técnica de manera individual. En la Figura VI.8 también se muestran los perfiles plasmídicos de los posibles candidatos (bacterias transconjugantes sensibles a Gm). En este sentido, todos los candidatos presentan las 3 bandas correspondientes a la cepa salvaje, denotando ser todas *R. favelukesii*. Pero sólo cuatro de ellos presentan, además, una banda adicional del tamaño correspondiente al plásmido introducido por conjugación (ver perfil de la cepa donadora). Estos cuatro perfiles confirman la presencia del plásmido construido en estos cuatro candidatos. De este modo, la presencia del plásmido TOPO-*repABC-mob* en estas cepas, junto a la ausencia de la resistencia a gentamicina de las mismas, sustentan la posibilidad de la pérdida del pSym en estos candidatos. Sin embargo, la imposibilidad de distinguir entre el plásmido pLPU83c y el pSym hace necesario verificar por alguna otra técnica la ausencia de este último.

VI.5.a.2. Búsqueda de la pérdida de secuencias específicas del pSym por PCR.

A partir de los clones en los que se observó la presencia del plásmido TOPO-*repABC-mob* se realizaron reacciones de amplificación con cebadores específicos para marcadores ubicados a lo largo del pSym. En la Figura VI.9 se muestran los resultados obtenidos para cuatro marcadores, donde se observa que sólo el clon 16 no presentó amplificación para ninguna las secuencias evaluadas.

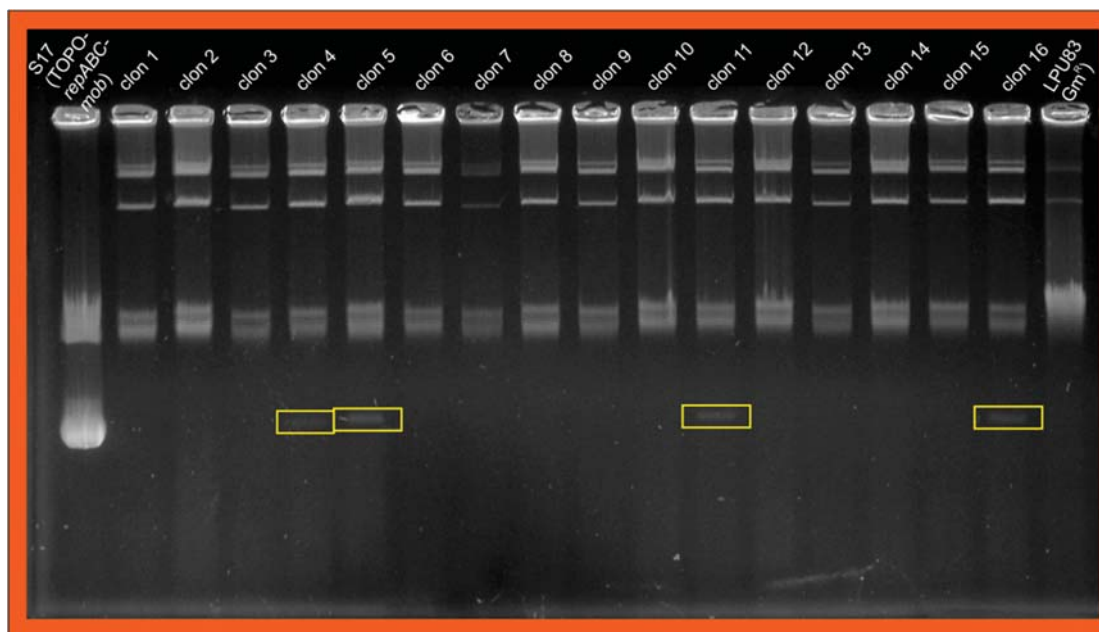


Figura VI.8. Perfiles plasmídicos de las posibles cepas curadas de su plásmido simbiótico. Se presentan los perfiles plasmídicos de 16 transconjugantes (Gm^S) junto a los perfiles de *R. favelukesii* LPU83-*nodH*⁺ y la cepa de *E. coli* S17 que contiene el plásmido TOPO-*repABC-mob* (plásmido con la región *repABC* a transferir). Los recuadros amarillos indican la presencia del plásmido TOPO en el entorno genómico de *R. favelukesii*.

VI.5.a.3. Ensayos de nodulación

Para seguir avanzando hacia la confirmación de la ausencia del pSym, se propuso evaluar la capacidad de nodulación del clon 16. Ensayar esta capacidad resulta de interés dado que al no contener pSym esta cepa no debería ser capaz de nodular. A tal efecto, se realizaron ensayos de nodulación con plantas de alfalfa en placas de Petri con agar-Fåhræus como soporte. Las plantas se inocularon con el clon 16 y, como control, con la cepa salvaje de *R. favelukesii* LPU83 y *Ensifer meliloti* 2011. En la Figura VI.10 se observa que el rizobio eficiente de alfalfa, *E. meliloti* 2011, produjo la formación de nódulos al igual que la cepa salvaje de *R. favelukesii*. Sin embargo, esta última produjo un menor número de nódulos. Ambos resultados coinciden con los resultados esperados para estas cepas. Al observar las plantas inoculadas con el clon 16, ninguna mostró la presencia de nódulos al igual que el control negativo. La pérdida de la capacidad de nodulación evidenciada sugiere fuertemente que se produjo la eliminación del plásmido simbiótico en el clon 16.

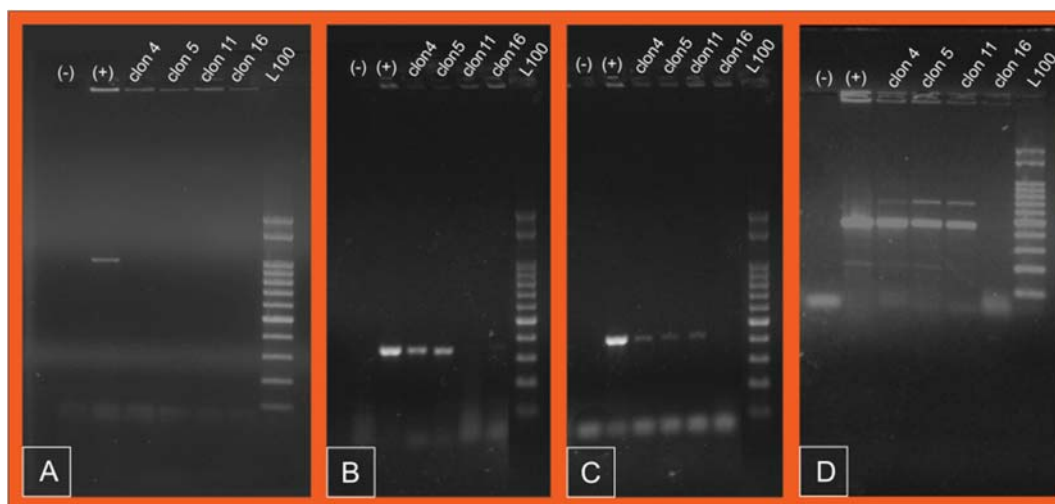


Figura VI.9. Amplificación por PCR de marcadores específicos del pSym de *R. favelukesii*. Se muestran los resultados de las amplificaciones, utilizando cebadores de 4 marcadores diferentes del pSym, para los cuatro candidatos de *R. favelukesii* que contienen el plásmido TOPO-*repABC-mob*. Para cada PCR se muestran los controles positivo y negativo respectivamente. L100: Marcador de PM. **A.** Cebadores que amplifican una región del gen *nodC*. **B.** Cebadores 12t, amplifican regiones a lo largo del pSym utilizados previamente por el grupo de trabajo para completar la secuenciación de *R. favelukesii* LPU83. **C.** 32t. **D.** 43t, ídem B.

VI.5.a.4. Secuenciación

Como confirmación final de que el clon 16 perdió su pSym, se realizó una secuenciación de alto rendimiento de dicha cepa (Capítulo II.3.h). Con respecto a la secuenciación se obtuvo un número de lecturas alineadas de 410.981. Asimismo, el número de bases ensambladas fue de 84.212.265 y se obtuvo una cobertura del 12,72. Por otro lado, se muestra en la Figura VI.11 que proporción de las lecturas totales obtenidas mapea con cada replicón. A su vez, esta proporción se compara con la proporción del genoma que pertenece a cada replicón (proporción esperada). En este sentido, se puede observar que estas dos proporciones se mantienen para todos los replicones salvo para el caso del plásmido simbiótico (pLPU83b). En este replicón se evidencia que la proporción obtenida es mucho menor (0.45 %) a la esperada (7,0 %). Cabe destacar que la pequeña cantidad de lecturas que mapearon con la secuencia del plásmido simbiótico se deben en su mayoría a secuencias repetitivas (transposasas, integrasas y secuencias de inserción). También en este porcentaje, se encuentra incluida la secuencia de la región *repABC* clonada en el vector comercial TOPO. Estos resultados confirman de manera contundente la ausencia del pSym en el clon 16. Como consecuencia de todas las evaluaciones realizadas podemos afirmar que el clon 16 corresponde a una cepa de *R. favelukesii* curada de su plásmido simbiótico, la cual se denominó *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻.

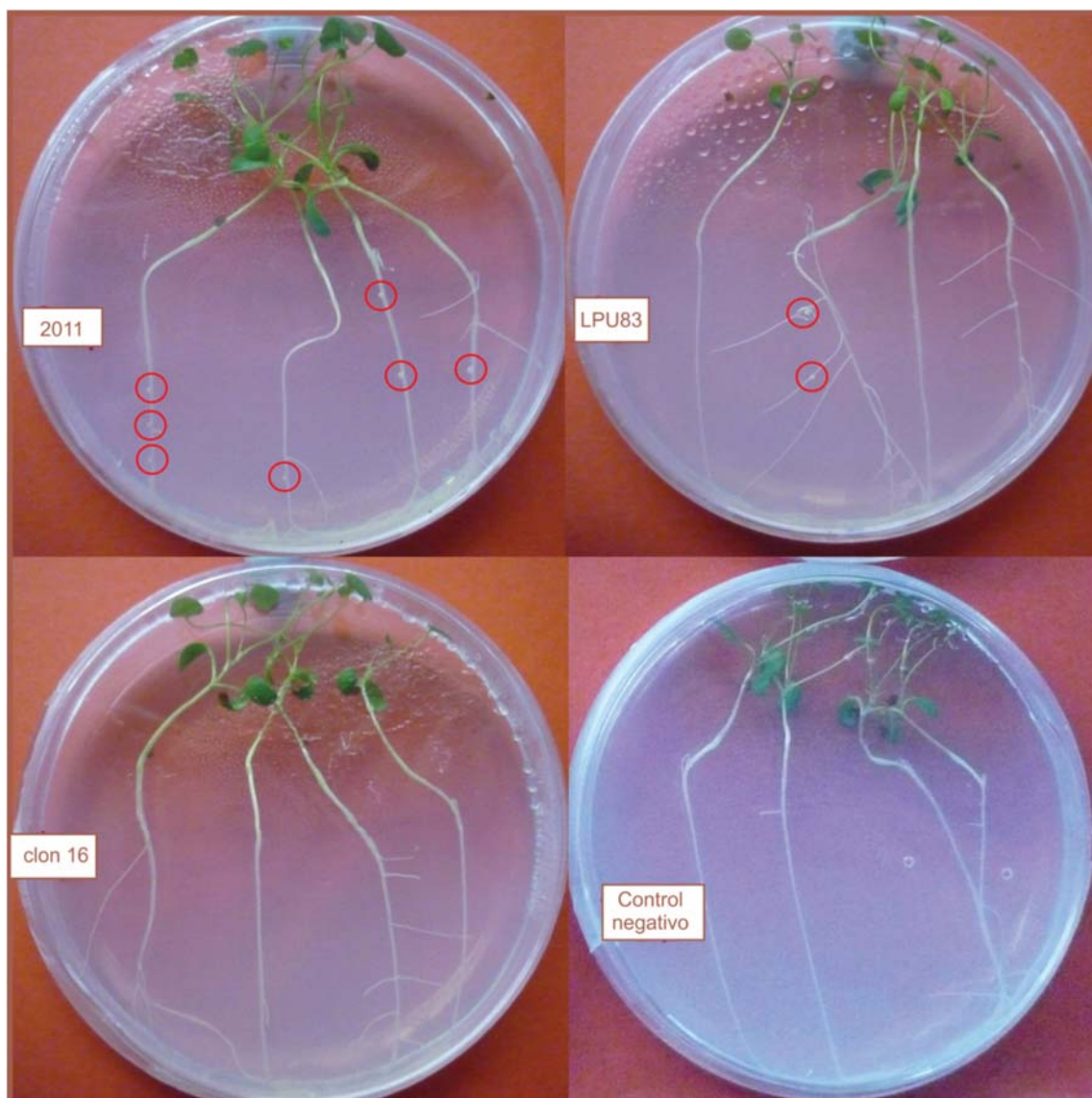


Figura VI.10. Capacidad de nodulación del clon 16 de *R. favelukesii* en alfalfa. Se muestran los ensayos de nodulación en alfalfa del clon 16, la cepa salvaje de *R. favelukesii* LPU83, *E. meliloti* 2011 y un control negativo donde las plantas se inocularon con Fåhræus esteril. Los círculos rojos destacan los nódulos presentes en cada caso. Se muestran 4 plantas por placa para cada tratamiento. Cada una de las placas es representativa de 3 placas realizadas de manera independientes.

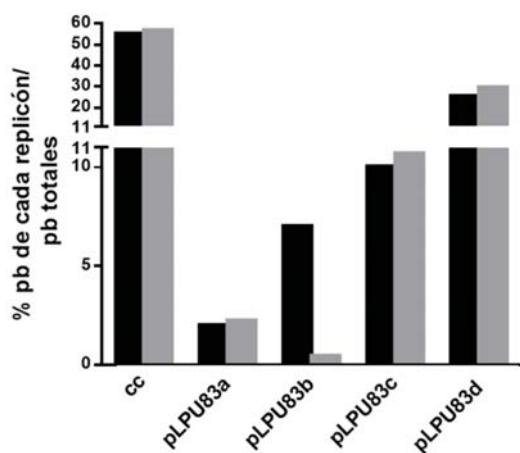


Figura VI.11. Porcentaje de secuencias pertenecientes a cada replicón del clon 16 y de la cepa salvaje. En barras grises se representa la proporción del número de lecturas que mapean en cada replicón con respecto al número total de lecturas. En barras negras se representa la proporción de pares de bases de cada replicón sobre el número total de pLPU83b del genoma.

VI.5.b. Cinética de crecimiento de *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻ en condiciones de estrés ácido.

Una vez obtenida la cepa de *R. favelukesii* curada de su plásmido simbiótico se prosiguió a determinar su respuesta a la tolerancia a la acidez, evaluando en primer lugar su cinética de crecimiento. A tal efecto se realizaron las curvas de crecimiento de dicha cepa a pH 7,0 y a pH 4,6 a través del uso de un lector automatizado de micro placas. La Figura VI.12 muestra las curvas de crecimiento obtenidas para la cepa salvaje y para *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻. Se puede observar que la cepa curada de su plásmido simbiótico presenta una cinética de crecimiento similar a pH neutro. Sin embargo, en condiciones de acidez presenta una mayor velocidad evidenciada en el menor tiempo de duplicación. Agregando a lo anterior, esta curva presenta un carácter intermedio entre la condición estresada y control de la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que la ausencia del pSym podría otorgarle una ventaja a dicha cepa frente a las condiciones de estrés ácido y concuerdan con el hecho de que la mayoría de los GED ubicados en este replicón se encontraron inhibidos.

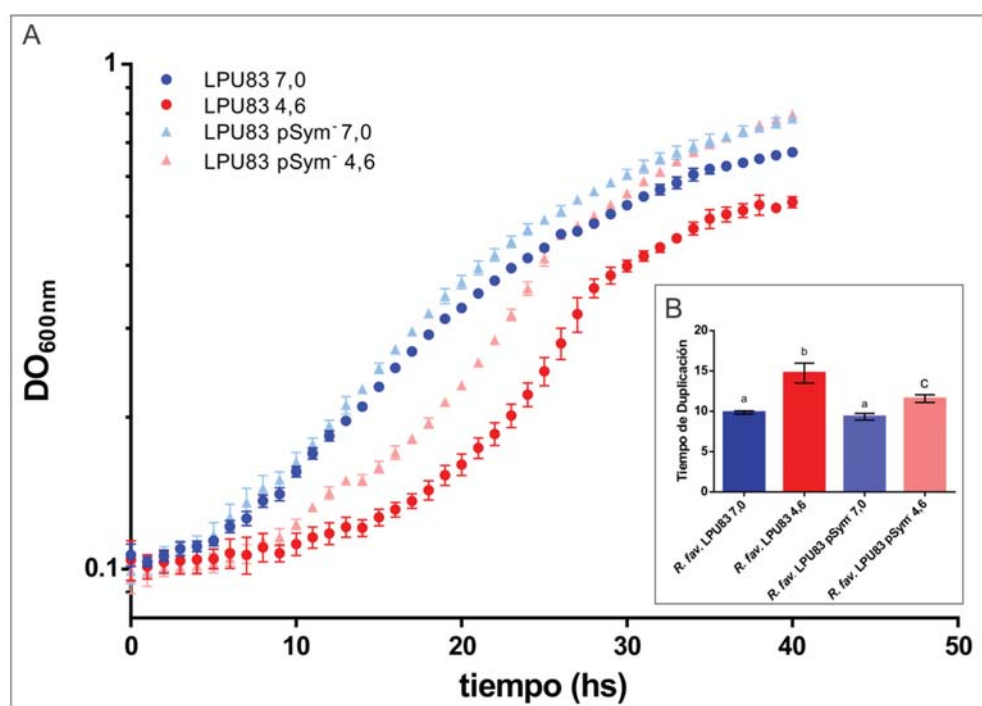


Figura VI.12. Cinética de crecimiento de *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻. A. Curvas de crecimiento para la cepa salvaje y para la cepa curada de su plásmido simbiótico en condiciones de neutralidad y bajo estrés ácido. B. Tiempos de duplicación para cada una de las curvas, siendo los mismos significativamente diferenciales (test de Tukey, α : 0,05). Los datos estadísticos se realizaron a partir de 3 réplicas biológicas independientes.

VI.5.c. Cinética de muerte de *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻ en condiciones de estrés ácido.

Para ampliar la caracterización de la ausencia del plásmido simbiótico en condiciones de acidez. Se evaluó también la contribución de su ausencia bajo un estrés ácido severo. De este modo, se realizó la cinética de muerte del clon 16, de manera de evidenciar si presenta diferencias con la cepa salvaje. En este sentido, los resultados mostraron que la cepa salvaje y *R. favelukesii* LPU83-pSym⁻ no presentan diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivencia cuando ambas son expuestas a un pH de 3,5 (Figura VI.13). Estos resultados

sugieren que la ausencia del plásmido simbiótico no le otorga una mayor resistencia en la sobrevida a pHs ácidos donde ya no le es posible crecer.

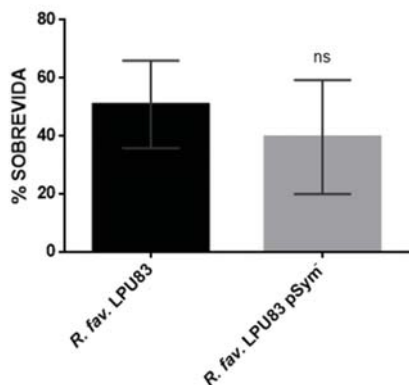


Figura VI.13. Porcentaje de sobrevida de *R. favelukesii* LPU83 pSym. Se representa el porcentaje de sobrevida de la cepa salvaje y la cepa curada de su plásmido simbiótico luego de una exposición por 4 horas a un pH de 3,5 en medio GS. Ambas cepas no presentan diferencias significativas (t-test). El análisis estadístico fue realizado con 3 réplicas biológicas para cada condición.

En este capítulo se ha avanzado en la caracterización de GED en respuesta a la acidez de *R. favelukesii* a través de distintos enfoques. En primer lugar, se verificaron los niveles de expresión de los GED seleccionados, a través de una técnica no masiva, como la RT-PCR, observando concordancia entre las por las 3 técnicas (RT-PCR, proteómica y transcriptómica).

Por otro lado, a partir de los estudios de expresión masivos, surgió la pregunta de si la envoltura celular podría estar alterada en condiciones de estrés ácido. En este sentido, a través de un ensayo de determinación de la actividad β -galactosidasa se pudo demostrar que *R. favelukesii* presenta una disminución en la permeabilidad de la membrana en condiciones de acidez.

Con el propósito de estudiar la relevancia en la respuesta a la acidez de ciertos GED identificados en los capítulos anteriores se construyeron mutantes y se los evaluó en su respuesta al estrés ácido a través de curvas de crecimiento y de muerte (*livK*, *braD*, LPU83_2016 y LPU83_pLPU83_2016). Los distintos mutantes evaluados mostraron un fenotipo diferencial comparado con la cepa salvaje en condiciones de acidez (ya sea durante el crecimiento y/o la sobrevida de los mismos).

Como ya se ha mencionado en el Capítulo V, como resultado del análisis transcriptómico se observó que un 60 % de los genes del pSym presentaron una expresión diferencial, motivo por el cual resultó interesante estudiar la respuesta de *R. favelukesii* a la eliminación de un número importante de GED, a través de una cepa curada del pSym, bajo condiciones de estrés ácido. A partir de una estrategia por incompatibilidad plasmídica, se generó dicha cepa y se evidenció un menor tiempo de duplicación en condiciones de acidez comparado con su cepa parental. En contraste, no presentó diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje en el porcentaje de sobrevida cuando las células se exponen a un pH de 3,5. Se puede suponer que la menor expresión de los genes presentes en el pSym ante el estrés ácido, contribuye con un gasto de energía que en la cepa curada no sucede, aportando así energía extra para el crecimiento.

El conjunto de estos resultados apoya y pone de manifiesto la utilidad, potencia y fiabilidad de los resultados obtenidos con las técnicas masivas utilizadas. De esta manera, estas técnicas brindan una gran cantidad de información sobre lo que ocurre en las células estresadas a nivel molecular. Asimismo, actúan como indicadores sobre qué genes focalizar el estudio en mayor profundidad, permitiendo obtener un panorama global y detallado de la respuesta al estrés en general, y en particular de este trabajo, sobre la tolerancia a la acidez en *R. favelukesii* LPU83.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

VII.1. Discusión general.

La tolerancia a la acidez es un fenómeno complejo. El estudio de los mecanismos que permiten la adaptación de los microorganismos a condiciones de estrés ácido ha sido indagado por más de cincuenta años. En particular, en los rizobios, la capacidad de los mismos de tolerar acidez representa una ventaja adaptativa frente al entorno y frente a la interacción con la planta hospedadora. Así, la tolerancia a la acidez de los rizobios como carácter fenotípico para la selección de cepas inoculantes, ha sido considerada como una característica que influye positivamente en el establecimiento de la simbiosis en condiciones de acidez (Howieson *et al.*, 1988). En consecuencia, esta característica ha sido buscada y estudiada ampliamente con propósitos agronómicos (Del Papa *et al.*, 1999). Décadas atrás, los esfuerzos dirigidos hacia la caracterización de la tolerancia a la acidez en rizobios llevaron a encontrar los primeros genes asociados, genes *act* (*acid tolerance*), a través de mutagénesis e identificación de fenotipos sensibles a dicho estrés (Tiwari *et al.*, 1996, Tiwari *et al.*, 1996). Años más tarde, se sabe que lejos de ser una respuesta en consecuencia de un único regulador, la respuesta involucra numerosos genes. Por lo tanto, el estudio y/o manipulación de un único determinante resulta poco conveniente. En este contexto, la caracterización a nivel global (ómica) de la bioquímica del estrés ácido resulta una alternativa valiosa para aportar claridad a los cambios bioquímicos y fisiológicos generales que participan en los rizobios.

Teniendo en cuenta la respuesta pleiotrópica de la tolerancia a la acidez en los rizobios, en este trabajo se ha abordado, mediante proteómica y transcriptómica, la caracterización de la respuesta al estrés ácido de una especie rizobiana particular, *R. favelukesii*. Estos rizobios tienen como característica ser tolerantes a la acidez, muy competitivos para la nodulación de alfalfa, pero ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno. Estas características lo posicionan como un rizobio más parasítico que simbiótico, y lo convierte en un potencial factor de riesgo al competir con el rizobio eficiente, *E. meliloti*. Como se ha presentado en el Capítulo III, se ha podido establecer una condición de estrés ácido que refleja primordialmente diferencias fisiológicas derivadas de la acidez extracelular. Dicha condición se seleccionó a partir de establecer el valor extremo de acidez que aún es compatible con el crecimiento de *R. favelukesii*, valor que corresponde a un pH de 4,6 en medio GS. En este sentido, los ensayos realizados mostraron un estrecho margen en el que pequeños cambios en el pH resultaron críticos para mantener el crecimiento. Así como la disminución de 0,5 unidades de pH, revierte la situación de crecimiento hacia la muerte celular, un aumento de pH de igual magnitud, hace que crezca normalmente (Figura III.1). La habilidad de sobrevivir en condiciones de pH inferiores a 4,6 también se evaluó, encontrando que un valor de pH de 3,0 resulta en una condición radical, difícil para sostener la sobrevivencia de este rizobio en el tiempo (Figura III.4). El conjunto de resultados confirma la elevada capacidad de tolerancia a la acidez de *R. favelukesii* comparada con otros rizobios, como por ejemplo *E. meliloti* y *E. medicae* (Lowendorf *et al.*, 1981, Graham, 1994, Del Papa *et al.*, 1999). Dentro de los mecanismos descritos de tolerancia a la acidez se destacan los mecanismos que se centran en la protección del periplasma de los efectos de un medio ácido, mediante la síntesis de chaperonas y mecanismos que

incrementen el pH a nivel local (periplasma). Un hecho particularmente interesante respecto del crecimiento de *R. favelukesii* en estas condiciones, ha sido la capacidad de reducir la acidez extracelular en paralelo a su crecimiento exponencial (Figura III.1). Este hecho, implicaba que *R. favelukesii* podía estar implementando como mecanismo de tolerancia a la acidez incrementar el pH extracelular. Se generó entonces la incógnita de si *R. favelukesii* necesita incrementar primero el pH para su posterior crecimiento o si realmente es capaz de crecer en el pH 4,6 sin modificar el pH del medio extracelular. A través de cultivos en los que el pH extracelular se mantuvo constante, se pudo dilucidar que el incremento de pH asociado al crecimiento no es condición necesaria para que este rizobio crezca en estas condiciones de acidez (Figura III.3). Ahora bien, queda sin resolver cómo *R. favelukesii* logra este comportamiento. Una posibilidad, es que esta cepa genere un aumento en el pH extracelular a través de la liberación de alguna molécula al medio como resultado de su actividad metabólica a pH 4,6. Cabe destacar, que este tipo de comportamiento no ha sido descrito prácticamente en otros rizobios, con excepción de la cepa *Rhizobium* sp. PR389, capaz de nodular *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. Esta cepa presenta un fenotipo similar a *R. favelukesii* bajo estrés ácido, ya que es capaz de crecer hasta un pH de 4,5 con un aumento en el pH del medio extracelular asociado a su crecimiento (Lei *et al.*, 2011). Sin embargo, esta cepa no ha sido caracterizada por lo que resulta difícil obtener información detallada de la misma.

Tomando en cuenta que la condición natural del mundo microbiano es el cambio constante y en más de una variable, es razonable que los procesos adaptativos estén guiados por factores múltiples y naturalmente coexistentes. En los capítulos IV y V de este trabajo, se presenta un análisis proteómico y transcriptómico, respectivamente, evaluando la respuesta global frente al estrés ácido. El estudio del proteoma de una situación celular permite la observación directa de la mayoría de las especies proteicas existentes en cada una de las condiciones a estudiar; por otro lado, el transcriptoma brinda una visión más amplia del genoma expresado y permite acceder a genes de baja expresión, así como a ARN regulatorios, que escapan al análisis proteómico utilizado. Este hecho queda demostrado al comparar el número de determinantes detectados en ambos análisis. El análisis transcriptómico reveló una cantidad considerablemente mayor de transcritos diferenciales (1924 GED) comparados con el número de proteínas diferenciales obtenidas del análisis proteómico (336 PED). Es decir, a través de la transcriptómica se pudieron identificar casi seis veces más determinantes diferenciales que por proteómica. Tal diferencia es consecuencia, en parte, del método de identificación/cuantificación de ambas técnicas. En este sentido, la técnica *shotgun proteomics* (ver II.6.b) utilizada en este trabajo, provee una medida indirecta de proteínas a través de péptidos derivados de la digestión proteolítica de las proteínas intactas. La identificación de los péptidos se logra por comparación de los espectros de masa en tándem derivados de la fragmentación de los péptidos, con los espectros teóricos de la digestión *in silico* a partir de una base de datos proteica. Luego, la identificación de las proteínas se logra a partir de la asignación de las secuencias peptídicas a cada proteína. Cabe destacar que, de cada fracción de muestra que sale de la cromatografía de alta resolución e ingresa al espectrómetro de masas, se seleccionan diez péptidos, del conjunto de péptidos presentes para realizar la identificación descripta. La

selección de estos diez péptidos está supeditada a su “calidad de vuelo” y a su abundancia. A pesar de que este proceso se repite varias veces sobre la misma muestra que ingresa, la mayoría de los péptidos de la muestra son identificados. Sin embargo, péptidos con una proporción o calidad de vuelo inferior, pueden pasar desapercibidos al encontrarse inmersos con otros péptidos de mejores características. A pesar de esta dificultad, la técnica de *shotgun proteomics* brinda información valiosa sobre la presencia real de las proteínas en el momento celular que se desea estudiar, permitiendo la identificación de numerosas proteínas a partir de una mezcla compleja (Gunawardena *et al.*, 2013, Heunis *et al.*, 2014, Otto *et al.*, 2014, Shalit *et al.*, 2015).

La comparación de los resultados obtenidos a través del análisis proteómico y transcriptómico, evidencia en ambos un mayor número de determinantes reprimidos que sobre-expresados en condiciones de acidez. Una visión más detallada a nivel global revela que las categorías funcionales que contuvieron una cantidad considerable de determinantes diferenciales coincidieron en ambos análisis. Dichas categorías corresponden a sistemas de transporte y metabolismo de aminoácidos (COG E) y a la producción y conversión de energía (COG C) (Figuras IV.5 y V.4). A su vez, un análisis minucioso sobre el nivel de correlación de ambas técnicas evidenció coherencia al comparar los valores de expresión de cada uno de los determinantes diferenciales detectados, tanto por proteómica como por transcriptómica. Como resultado de este análisis, se encontró que de las 336 PED totales, 208 presentaron la misma tendencia en la expresión a nivel de transcripto. En la Tabla A.3, se puede ver la correlación de los valores obtenidos en cada una de las técnicas para estas 208 PED. Se debe mencionar que para esta comparación se utilizaron todos los genes identificados en el transcriptoma. En efecto, muchas de las 208 PED presentan un nivel de transcripto por debajo del número de corte definido para los GED detectados en el RNA-Seq. Sin embargo, coinciden en la tendencia de expresión. La elección del punto de corte en la mayoría de los estudios de análisis masivo es controversial. Generalmente, para minimizar la cantidad de GED presumiblemente falsos, se eligen valores de corte altos, aceptando así, la posibilidad de descartar genes que sí se expresen diferencialmente pero en una menor proporción. En nuestro análisis, por ejemplo, el punto de corte seleccionado excluye a todos los transcriptos con un nivel de expresión que sea menor al doble (por ejemplo un *foldchange* de 1,5). No obstante, varios de estos transcriptos probablemente sean diferenciales y, quizás, relevantes en la tolerancia a la acidez. Por otro lado, el hecho de que los valores numéricos de *foldchange* obtenidos en cada técnica no coincidan, no necesariamente representa una incorrecta representación de lo que sucede a nivel celular. Para aclarar este concepto se deben contemplar varios factores, ya que la expresión de los genes está regulada a diferentes niveles (Kozak, 1983, Gilbert, 2000, Kaberdin & Blasi, 2006, Picard *et al.*, 2009). En este sentido, muchos factores influyen en la velocidad de traducción de un ARNm a proteína, así como en la modificación postraducciona de la proteína, su destino y finalmente su degradación. Un factor crucial en la expresión génica es la concentración celular del correspondiente ARNm, la cual depende de su velocidad de síntesis y de degradación. Con respecto a esto, las vías de degradación garantizan que los ARNm no se acumulen en la célula y sean causa de la síntesis de proteínas innecesarias. Un cambio en las velocidades de síntesis o de

degradación conduce a la acumulación o a la disminución neta del ARNm. Por ende, un cambio de n veces en un ARNm no siempre significa un cambio de n veces de su producto proteico. Así, el nivel de expresión transcripcional no necesariamente debe coincidir con el nivel de expresión proteómico.

Como ya se ha mencionado, la respuesta a la acidez en rizobios es una respuesta multigénica y, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que *R. favelukesii* no escapa a ello. Estudios previos han demostrado que diferentes bacterias comparten respuestas generales frente a condiciones medioambientales, como el estrés ácido (Boor, 2006, Yuan *et al.*, 2008). Esta respuesta general, usualmente involucra el metabolismo celular y la respiración, así como también, la síntesis de aminoácidos y proteínas; motilidad y quimiotaxis y mecanismos de reparación celular, entre otros. Dentro de lo que podría ser parte de una respuesta metabólica general frente al estrés, en el metabolismo de *R. favelukesii* se observan cambios como consecuencia a la gran demanda energética que les representa a las células crecer frente a esta condición. En efecto, los determinantes involucrados en el metabolismo de la respiración celular, como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa, se encuentran sobre-expresados en condiciones de acidez (Figuras VII.1 y VII.2). Conjuntamente con esto, también se encontraría aumentada la vía de las pentosas-fosfato. La entrada de la glucosa 6-fosfato en la glucólisis o en la ruta de las pentosas-fosfato está determinada mayoritariamente por las concentraciones relativas de NADP⁺ y NADPH. Cuando la célula está convirtiendo rápidamente NADPH en NADP⁺ a través de reducciones biosintéticas, aumenta el nivel de NADP⁺, lo que estimula alostéricamente la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, e incrementa, de este modo, el flujo de glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas-fosfato. En este sentido, esta última vía es la principal vía productora de NADPH. El NADPH es un co-factor fundamental que proporciona poder reductor en la biosíntesis de biomoléculas como ARN, ADN, aminoácidos y un gran número de co-enzimas (ATP, NADH, FADH₂ y coenzimaA). De este modo, la utilización de carbono a través de la vía de las pentosas por *R. favelukesii* denota un incremento en la necesidad de generar intermediarios y poder reductor por las células expuestas a las condiciones de estrés ácido. Este hecho indica que una gran parte de la energía necesaria, así como del carbono utilizado, son dirigidos hacia la biosíntesis en estas condiciones. Este aumento en la biosíntesis se ve sustentado con la evidencia de una mayor expresión observada en las enzimas y ARN involucrados en la síntesis de proteínas y en la biosíntesis de aminoácidos. En particular, la ribosa 5-fosfato (intermediario de la vía de las pentosas fosfato) es precursor de la síntesis de nucleótidos e histidina. De manera notoria, se observó que varias enzimas de la biosíntesis de histidina presentaron mayor expresión frente al estrés. Hecho que resulta relevante dado que el aumento de este aminoácido en el citoplasma podría ser una respuesta específica al estrés ácido (ver Capítulo IV y V). En este sentido, Broadbent *et al.* (2010), a partir de un estudio transcriptómico y fisiológico de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en respuesta al estrés ácido, sugirieron que la acumulación de histidina intracelular podría contribuir a la respuesta ATR de dicha bacteria, pudiendo atribuirse dicha acumulación a una posible capacidad como buffer intracelular.

La mayor actividad en la vía de las pentosas-fosfato, junto con la gran demanda energética, recae inexorablemente sobre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. A pesar del papel central que juega este ciclo en el metabolismo energético, su función no se limita a la conservación de la energía. Varios de sus intermediarios actúan de precursores de una amplia gama de productos. De este modo, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos es una ruta anfibólica, es decir, que sirve tanto para procesos anabólicos como catabólicos. En este sentido, el ciclo proporciona diversos precursores para muchas de las vías biosintéticas. Sus intermediarios se utilizan, por ejemplo, para sintetizar otros aminoácidos así como los nucleótidos. La regulación del ciclo está dada por sus productos finales, como ATP y NADH, y por sus sustratos NAD^+ y ADP, que actúan como inhibidores y estimuladores, respectivamente. Tomando en cuenta todo lo descrito hasta aquí, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos probablemente, además de participar en la respiración celular y como parte del catabolismo para la obtención de la aparentemente tan demandada energía en estas condiciones, también sería clave en el aporte de precursores de manera de satisfacer el aumento en las reacciones biosintéticas en condiciones de acidez (Figura VII.2).

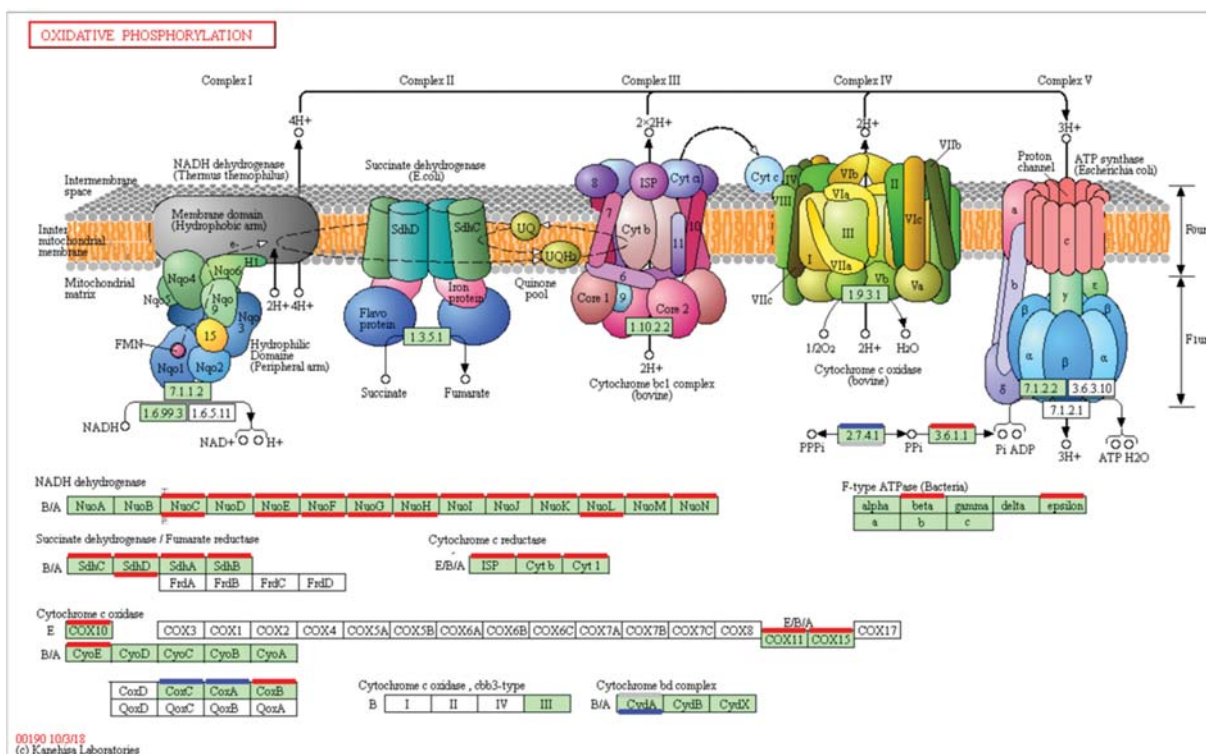


Figura VII.1. Esquema de la fosforilación oxidativa en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcritos como de las proteínas involucrados como respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El esquema fue realizado a través de la herramienta KEGG Mapper. La expresión a nivel de transcritos se representa en la parte superior de cada proteína, mientras que la expresión a nivel proteómico se representa en la parte inferior. El color rojo representa una mayor expresión en acidez. El color azul representa una menor expresión en acidez (mayor expresión en neutralidad). En verde se muestran las enzimas que están presentes en el genoma de *R. favelukesii* y en blanco las que se encuentran ausentes.

Estas evidencias apoyan de modo directo la presunción de que el crecimiento en acidez en los cultivos se desarrolla con un deterioro marcado de componentes celulares, con mayores tasas de recambio de los mismos, y como consecuencia de ello, con una mayor actividad biosintética a expensas de mayor gasto de poder reductor (NADPH) y de energía (ATP) (Booth, 2002, Draghi *et al.*, 2016). En concordancia con esto, parte de la respuesta de *R. favelukesii* involucra un gran número de chaperonas, proteasas y varias enzimas

asociadas a la reparación celular, denotando de manera fehaciente el deterioro celular. Las chaperonas, a su vez, han sido descritas por tener un rol importante en la tolerancia a la acidez. De manera coincidente, este comportamiento metabólico general frente al estrés ácido, ha sido evidenciado en *E. meliloti* por Draghi *et al.* (2016).

Por su parte, la vía de las pentosas-fosfato también ha sido descrita por participar en contrarrestar los efectos perjudiciales de los radicales libres (Wood, 1986). En este sentido, el aumento en la fosforilación oxidativa puede traer aparejado un aumento en las especies reactivas de oxígeno. En los capítulos previos, ha sido descrito un incremento en la expresión de enzimas asociadas al estrés oxidativo (*sodB*, *sodC*). Asimismo, se debe considerar, también, que dicha respuesta podría estar relacionada con el efecto de protección cruzada. Por ejemplo, en *Staphylococcus aureus*, cepas mutantes en el gen *sod* (relacionado con estrés oxidativo) mostraron una mayor sensibilidad al estrés ácido (Clements & Foster, 1999). Otros ejemplos de protección cruzada se evidenciaron en *Campylobacter jejuni* y *Lactobacillus plantarum* ZDY2013, donde se observó que células expuestas previamente a estrés ácido presentaban un aumento en la resistencia al estrés oxidativo (Askoura *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2016).

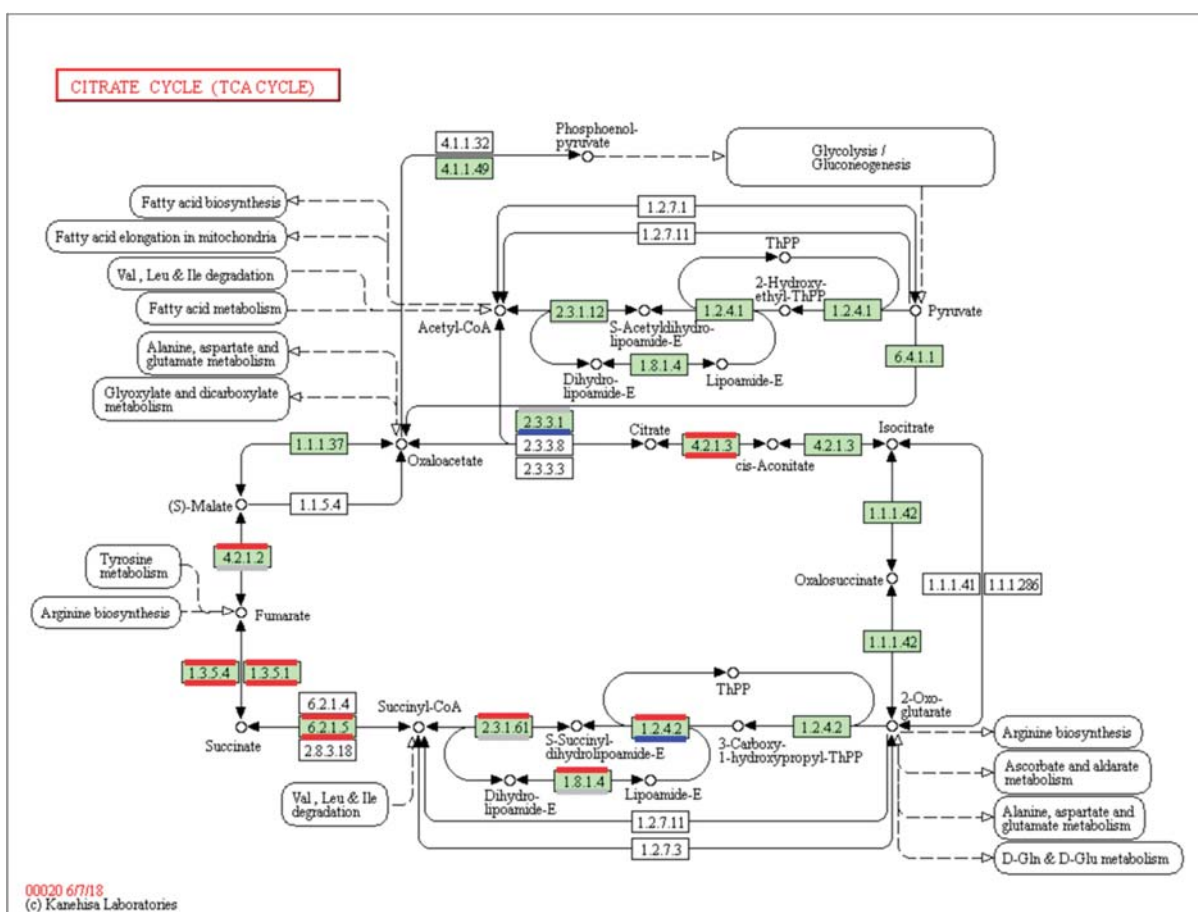


Figura VII.2. Esquema del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcritos como de las proteínas involucrados como respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El esquema fue realizado a través de la herramienta KEGG Mapper. La expresión a nivel de transcritos se representa en la parte superior de cada proteína, mientras que la expresión a nivel proteómico se representa en la parte inferior. El color rojo representa una mayor expresión en acidez. El color azul representa una menor expresión en acidez (mayor expresión en neutralidad). En verde se muestran las enzimas que están presentes en el genoma de *R. favelukesii* y en blanco las que se encuentran ausentes.

Más allá de la respuesta general al estrés ácido descrita hasta aquí, *R. favelukesii* también responde de manera específica al ambiente ácido. Ejemplo de este tipo de respuesta involucran, posiblemente, la producción de GABA, modificaciones en la envoltura celular y en el peptidoglicano, entre otras. En lo que respecta a la producción de GABA, la sobreexpresión de las enzimas responsables de su degradación, sin una posible vía de síntesis; sumado al consumo de protones que se obtendría por las reacciones inversas de dichas enzimas, permite hipotetizar que *R. favelukesii* podría estar produciendo GABA con el fin de aumentar el pH intracelular (Figura IV.8). Este mecanismo es bien conocido en *E. coli*, donde se produce GABA a través del sistema GAD frente a un estrés ácido (Capitani *et al.*, 2003). Por otro lado, en nódulos de *E. meliloti* se ha evidenciado un incremento de la concentración de GABA y los autores sugieren que dicho aumento está ligado a un control del pH citoplasmático cuando la célula se encuentra en microarebiosis o anaerobiosis (Miller, 1991, Vance, 1991). Apoyando la hipótesis de producción de GABA en condiciones de acidez por *R. favelukesii*, en el capítulo VI se ha demostrado que mutantes en genes involucrados en un sistema transportador del tipo ABC, involucrado en el transporte de GABA en *A. tumefaciens*, presentaron fenotipos sensibles bajo condiciones de estrés ácido. No obstante, para dilucidar lo que ocurre realmente con este sistema, se debe avanzar en la caracterización molecular de dicho mecanismo como respuesta a la tolerancia a la acidez.

Por otra parte, la función que cumple la envoltura celular es un factor crucial frente a los constantes cambios medioambientales y representa la principal barrera frente al estrés. En particular, muchas bacterias cambian su envoltura en respuesta a un ambiente ácido, como *Shewanella oneidensis*, *E. coli* y *A. tumefaciens* (Jordan *et al.*, 1999, Leaphart *et al.*, 2006, Yuan *et al.*, 2008). Para mantener la impermeabilidad de la membrana hacia los H^+ , es crítico controlar minuciosamente las aperturas de los canales y/u operaciones de los sistemas de transporte (Booth, 2002). En este sentido, un análisis transcriptómico de *A. tumefaciens*, evidenció que el 24 % de los genes inducidos frente al estrés ácido estaban relacionados con la envoltura celular. En *R. favelukesii*, los resultados ómicos revelaron que este rizobio presenta la habilidad de responder al estrés ácido a través de la síntesis de una envoltura celular modificada, al igual que sucede con las bacterias previamente nombradas. *R. favelukesii* podría estar modificando la estructura del peptidoglicano (Figura VII.3) ya que, tanto a través de proteómica y/o transcriptómica, se han encontrado determinantes que presentaron una expresión diferencial y concordante. Reforzando esto, en el Capítulo VI, se ha demostrado que efectivamente las células expuestas al estrés ácido presentan una menor permeabilidad en condiciones de acidez (Figura VI.2). Dichas modificaciones podrían otorgarle a *R. favelukesii* una mayor barrera contra la entrada de H^+ . Presumiblemente, otros componentes de la envoltura celular también podrían estar siendo alterados como el EPS (Figura VII.4) y el LPS. Sin embargo, en estos casos, no hay una tendencia tan clara como con el peptidoglicano.

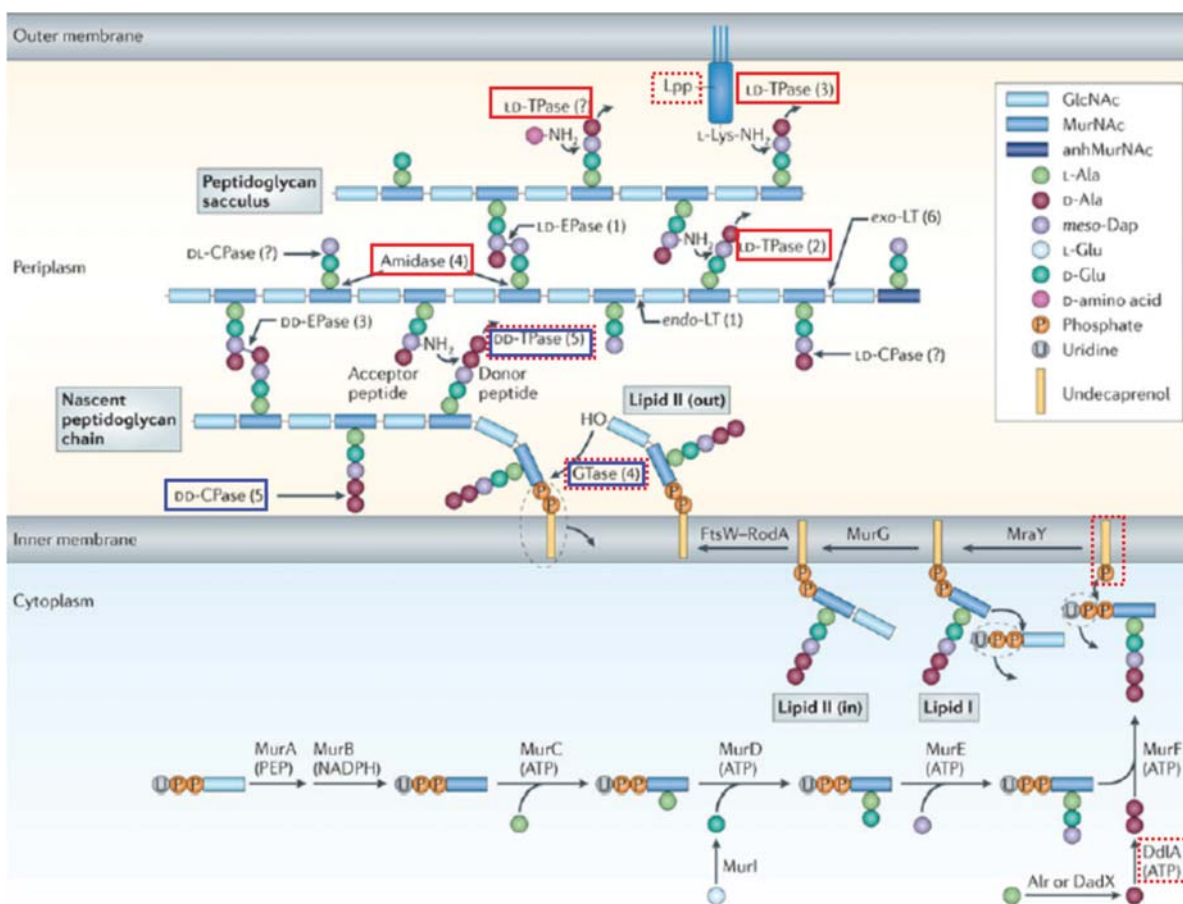


Figura VII.3. Esquema de la biosíntesis del peptidoglicano en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcritos como de las proteínas involucrados en la respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El esquema fue tomado y modificado de Typas, *et al.* (2011). La expresión a nivel de transcritos se representa en recuadros con línea punteada, mientras que la expresión a nivel proteómico se representa en recuadros continuos. El color rojo representa una mayor expresión en acidez. El color azul representa una menor expresión en acidez (mayor expresión en neutralidad).

Por otro lado, en la respuesta de *R. favelukesii* a la acidez participa, probablemente, el gen *lpiA* (*low pH-inducible*). Este gen ha sido descrito por ser inducido específicamente después de la exposición celular a medios ácidos, siendo el primer circuito regulador específico del pH detectado en *E. medicae* (Tiwari, *et al.*, 2004, Reeve, *et al.*, 2006). Sin embargo, su inactivación no resulta en un fenotipo sensible a la acidez (Reeve *et al.*, 1999, Reeve *et al.*, 2006). En este sentido, se ha demostrado en varios rizobios que *lpiA* es regulado positivamente cuando células, que se encuentran en vida libre, se exponen a condiciones ácidas (Vinuesa *et al.*, 2003, Hellweg *et al.*, 2009, de Lucena *et al.*, 2010). Además, el gen que se encuentra directamente corriente abajo de *lpiA*, *acvB* (*acid virulence gene B*), también presentó una mayor expresión en *R. favelukesii*. Este gen, también ha sido descrito por ser sobre-expresado en condiciones de acidez en *E. medicae* y en *R. tropici* CIAT899 (Vinuesa *et al.*, 2003, Reeve *et al.*, 2006). Sin embargo, el rol de estos genes en la tolerancia a la acidez sigue sin estar completamente dilucidado.

Por otro lado, la ATP sintasa (F₀F₁-ATPasa), es capaz de sintetizar ATP usando el flujo de protones a favor del gradiente electroquímico desde el exterior hacia el interior celular. Bajo condiciones ácidas, ha sido descrito que las bacterias ácido lácticas emplean la ATPasa como bomba exportadora de protones para mantener el pH intracelular (Papadimitriou *et al.*, 2016). Esta reacción requiere ATP, ya que la expulsión de

protones desde el citoplasma hacia el exterior ocurre en contra del gradiente electroquímico (Papadimitriou *et al.*, 2016).

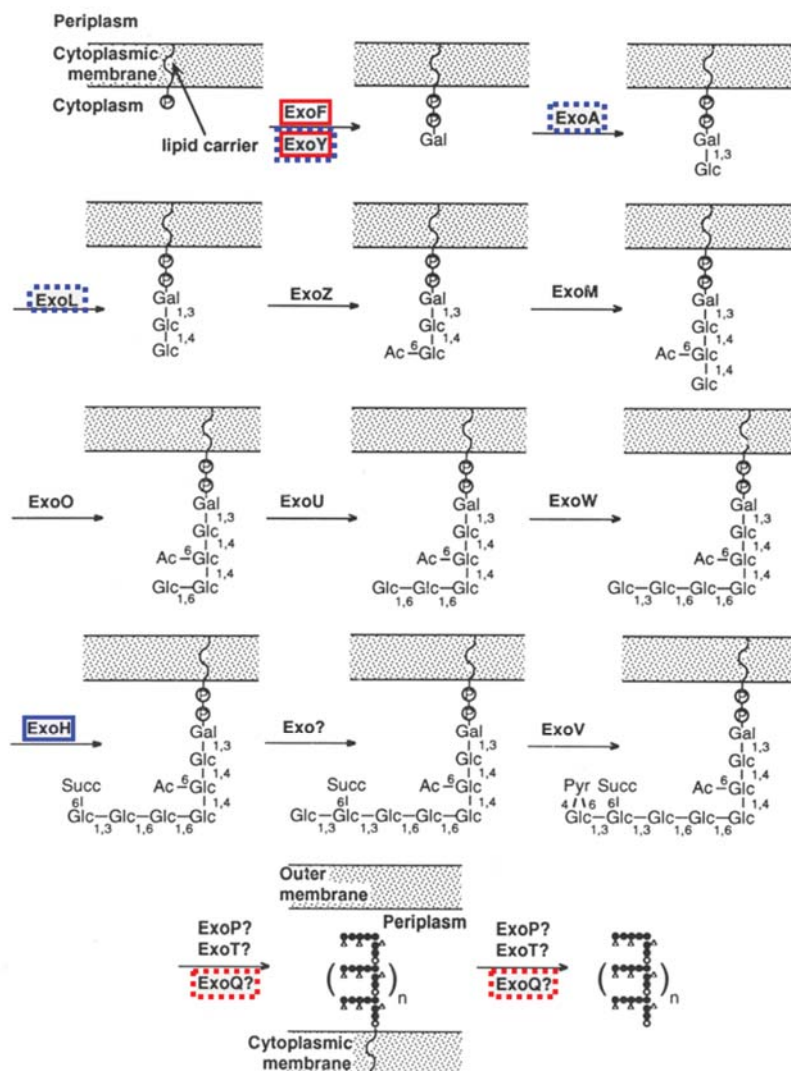


Figura VII.4. Esquema de la biosíntesis del exopolisacárido en el que se representa la expresión diferencial tanto de los transcritos como de las proteínas involucrados en la respuesta al estrés ácido en *R. favelukesii*. El esquema fue tomado y modificado de Reuber, *et al.* (1993). La expresión a nivel de transcritos se representa en recuadros con línea punteada, mientras que la expresión a nivel proteómico se representa en recuadros continuos. El color rojo representa una mayor expresión en acidez. El color azul representa una menor expresión en acidez (mayor expresión en neutralidad).

Por otra parte, a partir de la caracterización realizada en este trabajo, se pudo evidenciar que el plásmido simbiótico de *R. favelukesii* se encuentra vinculado de algún modo a tolerancia a la acidez, sin embargo, resulta difícil predecir cómo. En el análisis transcriptómico este plásmido presentó incluso más genes inhibidos que el cromosoma. Entre proteómica y transcriptómica, solamente un gen ubicado en dicho plásmido presentó una mayor expresión en condiciones de acidez. En contraposición con estos resultados, en *E. meliloti* ha sido descrito que varios genes del pSymA fueron sobre-expresados en acidez (Draghi *et al.*, 2016). Asimismo, el hecho de que una cepa de *R. favelukesii* curada de su plásmido simbiótico presente una

ventaja frente a las condiciones de estrés (Capítulo VI), induce a preguntarse qué aspectos hacen que la presencia del mismo perjudique su desempeño en estas condiciones. La primera hipótesis que surge, se relaciona con el *fitness* energético (Vogwill & MacLean, 2015, San Millan & MacLean, 2017). En esta dirección, como se ha discutido previamente en esta sección, *R. favelukesii* presenta una mayor demanda energética durante el estrés ácido. Por lo que esta hipótesis cobraría relevancia. Por otro lado, es difícil pensar que los plásmidos simbióticos de los rizobios representen un coste energético alto para la célula, ya que los mismos han evolucionado conjuntamente a través del tiempo en condiciones donde no existen presiones de selección para los mismos. Sin embargo, y en contraposición a lo previamente mencionado, el plásmido simbiótico de *R. favelukesii* LPU83 presenta evidencias de haber sido adquirido recientemente (Wibberg *et al.*, 2014), por lo que quizás la represión sistemática de este elevado número de genes en el plásmido simbiótico podría dar solidez a la hipótesis del *fitness* energético. Este interrogante queda abierto a futuras determinaciones. Igualmente, cabe destacar que una cepa de rizobio sin sus determinantes simbióticos no posee ninguna relevancia desde el punto de vista agronómico. Puesto que, a pesar de tener una mejor respuesta frente al estrés ácido, esta cepa es incapaz de participar en la simbiosis con sus plantas huésped.

Por último, como respuesta al estrés ácido se detectaron, a través de los análisis ómicos, un gran número de proteínas con dominios de reguladores transcripcionales (64), así como también, un gran número de proteínas hipotéticas (683). Dentro de ese gran número podrían encontrarse varias respuestas claves para la caracterización molecular de la tolerancia a la acidez. En consecuencia, es de vital importancia avanzar sobre el estudio bioquímico de estas proteínas y su relación con la tolerancia a la acidez.

VII.2 Conclusiones.

Los acercamientos “ómicos” que se realizaron en esta Tesis han permitido caracterizar los cambios bioquímicos a nivel de proteínas y ARN cuando las bacterias se cultivan en diferentes condiciones de pH extracelular. La observación conjunta de los cambios que operan en los rizobios al cambiar el pH externo, nos ha permitido obtener una imagen molecular más acabada del modo en que las células acomodan su actividad metabólica para hacer frente al desafío ácido. Por otro lado, los acercamientos “ómicos” nos han permitido observar la marcada diversidad de funciones implicadas en la tolerancia a la acidez. Estos resultados, además de proveer evidencia concreta sobre los cambios que operan a nivel molecular al cambiar el pH extracelular, destacan la complejidad de la respuesta bacteriana a un estrés abiótico, como es la acidez. Estos estudios ómicos han generado, además, nuevos interrogantes acerca del rol de los genes con función aún desconocida y cuyos estudios van a contribuir al avance de los conocimientos básicos de la naturaleza.

Las observaciones actuales sobre la caracterización de la tolerancia a la acidez de *R. favelukesii* LPU83 han demostrado que este rizobio presenta dos tipos de respuestas. Por un lado, presenta una respuesta global donde se observan grandes cambios en el metabolismo celular, incrementado así la respiración y la

biosíntesis celular; consecuencia en parte del deterioro celular producto de las altas concentraciones de protones. En paralelo, *R. favelukesii* disparara varios mecanismos para afrontar y contrarrestar el estrés ácido, descriptos en su mayoría en otros organismos tolerantes a la acidez, como el metabolismo de GABA, el aumento de la concentración de histidina, cambios en el peptidoglicano, entre otros.

El presente trabajo brinda información relevante sobre la tolerancia a la acidez en rizobios, que a pesar de ser ampliamente estudiada, presenta muchas incertidumbres sin resolver. Los conocimientos aquí volcados, brindan dianas para nuevos estudios que permitan conocer en profundidad otros mecanismos involucrados en la adaptación de las bacterias a los cambios de pH en el entorno.

VII.3 Perspectivas.

En las prácticas agrícolas intensivas, el aporte de nitrógeno al suelo a través de fertilizantes químicos, es una práctica que conlleva efectos no beneficiosos para el medio ambiente. Por tal razón, la agricultura sustentable toma un papel relevante, siendo de gran interés la FBN como alternativa a los fertilizantes nitrogenados químicos. En Argentina, ca. 4 millones de hectáreas son utilizadas para la producción de alfalfa, siendo la misma de gran relevancia para la alimentación animal (Peticari *et al.*, 1989, Hijano & Basigalup, 1995, <https://inta.gob.ar/noticias/segundo-congreso-mundial-de-alfalfa>). La limitación del cultivo de alfalfa en suelos ácidos está fuertemente determinada por su asociación simbiótica con la bacteria del suelo fijadora de nitrógeno, *E. meliloti*. El manejo de dicha simbiosis es un factor importante para maximizar su producción. Cabe destacar que usualmente los rizobios son más sensibles a los bajos pHs que las leguminosas. En este contexto, los resultados obtenidos en el presente trabajo abren la posibilidad de evaluar si la sobre-expresión en el simbiote eficiente de alfalfa de ciertos GED/PED detectados en *R. favelukesii*, permitiría obtener cepas que presenten una tolerancia a la acidez mayor que las cepas parentales, y que a su vez sean capaces de realizar una FBN eficiente en simbiosis con alfalfa. En este sentido, y desde un punto de vista molecular, la realización de análisis metabolómicos pueden permitir terminar de comprender los mecanismos que le otorgan a *R. favelukesii* una mayor tolerancia a la acidez. Asimismo, pero con el mismo objetivo, el estudio en mayor profundidad del rol de las proteínas predichas bioinformáticamente y que aún no poseen una función asignada, puede ser clave en la comprensión del fenotipo estudiado.

ANEXO

Tablas de los estudios ómicos.

En la Tabla A.1 se muestran las proteínas identificadas en el análisis proteómico con expresión diferencial (PED). Las proteínas se presentan agrupadas según su categoría funcional. Para cada proteína se muestra el nombre del gen que la codifica, la descripción, la categoría funcional asignada (COG) y el valor del $\log_2\text{foldchange}$ (M). La anotación de las proteínas se realizó a través del WebMGA.

En la Tabla A.2 se muestran los genes identificados en el análisis transcriptómico con expresión diferencial (GED) con función asignada a partir de la base de datos UNIPROT. Los genes se presentan ordenados según su *locus tag*. Para cada gen se muestran los mismos parámetros que en la Tabla anterior.

En la Tabla A.3 se muestran los genes que presentaron la misma tendencia de expresión a partir del análisis proteómico y transcriptómico. Se muestra para cada gen el *locus tag* y el valor M. Dichos genes se muestran ordenados según el nivel de expresión en el análisis proteómico, comenzando por las que presentaron una mayor expresión en condiciones de acidez.

Tabla A. 1. Lista de proteínas expresadas diferencialmente.

Locus tag	Gen	Descripción	COG	M
Energy production and conversion				
LPU83_0164	<i>gabDch</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase protein	C	1.19 (c)
LPU83_0570		K00064 D-threo-aldose 1-dehydrogenase	C	OFF (c)
LPU83_1011	<i>nuoC</i>	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	C	1.91 (m)
LPU83_1655		NADH dehydrogenase subunit C	C	1.77 (m)
LPU83_1658	<i>nuoE</i>	NADH dehydrogenase I subunit E	C	2.14 (m)
LPU83_1659	<i>nuoF</i>	NADH dehydrogenase I subunit F	C	1.19 (c)
LPU83_1661	<i>nuoG</i>	NADH dehydrogenase I subunit G	C	1.50 (c)
LPU83_1662	<i>nuoH</i>	NADH dehydrogenase subunit H	C	2.80 (m)
LPU83_2069	<i>ackA</i>	Acetate kinase	C	OFF (m)
LPU83_2206	<i>ssuD</i>	Alkanesulfonate monooxygenase	C	2.42 (m)
LPU83_2264	<i>fdx</i>	Electron transfer protein 1	C	2.63 (c)
LPU83_2417	<i>citA</i>	K01647 citrate synthase	C	OFF (m)
LPU83_2831	<i>cydA</i>	K00425 cytochrome bd-I oxidase subunit I	C	-1.15 (m)
LPU83_3023	<i>glpK</i>	Glycerol kinase	C	-1.39 (m)
LPU83_3917	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	C	-1.64 (m)
LPU83_3919	<i>sucC</i>	Succinyl-coa synthetase subunit beta	C	1.10 (m)
LPU83_3925	<i>sdhD</i>	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	C	ON (m)
LPU83_3943	<i>ppa</i>	Inorganic pyrophosphatase	C	2.80 (m)
LPU83_3973	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase 1	C	2.20 (m)
LPU83_pLPU83c_0226	<i>etfA</i>	Luciferase family protein	C	ON (c)
LPU83_pLPU83d_1305		Electron transfer flavoprotein subunit alpha	C	1.41 (m)
LPU83_1666		NADH dehydrogenase I subunit L	CP	1.45 (m)
LPU83_1284	<i>nuoL</i>	Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	CR	1.53 (m)
Amino acid transport and metabolism				
LPU83_0044	<i>hisH</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisH	E	1.08 (m)
LPU83_0163	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	E	1.51 (c)
LPU83_0256	<i>metZ</i>	Putative peptide Abtransporter	E	1.39 (m)
LPU83_0652		K10764 O-succinylhomoserine sulphydrylase	E	1.86 (m)
LPU83_0739	<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase	E	1.53 (m)
LPU83_0874	<i>dppA</i>	Periplasmic dipeptide transport protein	E	1.38 (m)
LPU83_1211	<i>ptrB</i>	K01354 oligopeptidase B	E	2.40 (m)
LPU83_1835	<i>cysB</i>	Cysteine synthase A	E	1.46 (m)
LPU83_2048	<i>sufS</i>	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	E	-2.60 (m)
LPU83_2339		K11717 cysteine desulfurase / selenocysteine lyase	E	1.17 (m)
LPU83_2462	<i>glnA</i>	K01915 glutamine synthetase	E	-2.13 (m)
LPU83_2967	<i>leuA</i>	K01649 2-isopropylmalate synthase	E	1.72 (m)
LPU83_3149	<i>hmuV</i>	Hemin importer ATP-binding subunit	E	-1.58 (m)
LPU83_3200	<i>livK</i>	Leu/Ile/Val-binding protein homolog 2	E	1.88 (m)
LPU83_3508	<i>ilvA</i>	K01754 threonine dehydratase	E	1.32 (m)
LPU83_3534	<i>pepF</i>	K08602 oligoendopeptidase F	E	1.40 (m)
LPU83_3949	<i>dcp</i>	Peptidyl-dipeptidase Dcp	E	2.09 (m)
LPU83_4171	<i>dppA</i>	ABC transporter	E	2.27 (m)
LPU83_pLPU83c_0248	<i>glnT</i>	Glutathione-binding protein gsib	E	ON (c)
LPU83_pLPU83c_0694		K01915 glutamine synthetase	E	1.21 (c)
LPU83_pLPU83d_0725	<i>occQ</i>	Putative oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	E	1.03 (c)
LPU83_pLPU83d_1493		Octopine transport system permease protein OccQ	E	OFF (m)
LPU83_pLPU83d_1781	<i>putA</i>	Bifunctional protein puta	E	2.33 (c)
LPU83_pLPU83d_1868	<i>cysD</i>	N-formylglutamate amidohydrolase	E	ON (c)
LPU83_1109		Sulfate adenylyltransferase subunit 2	EH	0.99 (m)
LPU83_2764	<i>ilvG</i>	Thiamine pyrophosphate protein	EH	OFF (m)
LPU83_0205	<i>dppB</i>	Putative peptide ABC transporter permease	EP	OFF (m)
LPU83_4172		ABC transporter	EP	1.79 (m)
LPU83_pLPU83b_0169	<i>dppB</i>	Putative peptide ABC transporter ATP-binding protein y4tr	EP	OFF (m)
LPU83_0565		Alcohol dehydrogenase GroES domain protein	ER	-1.79 (c)
LPU83_0722	<i>dppB</i>	Low affinity sodium-glucose cotransporter	ER	OFF (m)
LPU83_pLPU83d_0057		Putative D-xylulose reductase	ER	-1.20 (c)
LPU83_pLPU83c_0765	<i>dppB</i>	K02030 polar amino acid transport system substrate-binding protein	ET	-1.94 (c)
LPU83_pLPU83d_1338		Periplasmic component of amino acid ABC-type transporter/signal transduction system	ET	OFF (c)
LPU83_3420	<i>serA</i>	K00058 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	HE	-1.67 (c)
LPU83_3421	<i>serC</i>	K00831 phosphoserine aminotransferase	HE	-1.34 (c)
LPU83_0131	<i>deoB</i>	Putative ABC transporter; permease protein	G	OFF (m)
LPU83_0224		Phosphopentomutase	G	-1.20 (c)
LPU83_0515	<i>iolC</i>	Putative carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase protein	G	OFF (m)
LPU83_1317		K03338 5-dehydro-2-deoxygluconokinase	G	-3.07 (m)
LPU83_2242	<i>rpiA</i>	Ribose-5-phosphate isomerase A	G	1.14 (m)
LPU83_2822	<i>thuK</i>	Alpha-glucoside transport ATP-binding protein agik	G	OFF (m)
LPU83_3062	<i>sbpA</i>	Multiple sugar-binding periplasmic protein sbpA	G	1.03 (m)
LPU83_3228	<i>noeK</i>	Phosphomannomutase	G	1.89 (m)
LPU83_3468	<i>gap</i>	K00134 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	G	2.02 (m)
LPU83_3592	<i>glgB</i>	K00700 1,4-alpha-glucan branching enzyme	G	1.38 (m)
LPU83_3593	<i>glgC</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	G	-1.36 (m)
LPU83_3711	<i>mtlK</i>	Mannitol 2-dehydrogenase	G	-2.31 (c)
LPU83_3712	<i>smoK</i>	Sorbitol/mannitol ABC transporter	G	-2.20 (m)
LPU83_3713	<i>smoG</i>	Sorbitol/mannitol ABC transporter permease	G	OFF (m)
LPU83_3715	<i>smoE</i>	Sorbitol/mannitol ABC transporter	G	OFF (c)
LPU83_3741	<i>cscA</i>	Beta-fructofuranosidase	G	-1.25 (m)
LPU83_3742	<i>cscA</i>	Probable ABC transporter permease protein	G	OFF (m)
LPU83_3743		Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	OFF (m)
LPU83_3744	<i>cscA</i>	Family 1 extracellular solute-binding protein	G	-2.50 (c)
LPU83_pLPU83c_0143		Putative binding protein brua2_0484	G	OFF (c)
LPU83_pLPU83d_1549	<i>malK</i>	Rhamnose ABC transporter	G	-1.63 (c)
LPU83_pLPU83d_1809		ABC-type xylose transport system	G	-1.06 (c)
LPU83_pLPU83d_1826	<i>malK</i>	Maltose/maltodextrin import ATP-binding protein MalK	G	-1.02 (m)
LPU83_pLPU83d_1837		ABC-type sugar transport system	G	-1.36 (c)
LPU83_pLPU83d_1902	<i>malK</i>	ABC-type sugar transport system	G	-1.53 (c)
LPU83_4103		Putative transporter	GEPR	-1.80 (m)
LPU83_0466	<i>alsA</i>	Phospholipid/glycerol acyltransferase	I	OFF (m)
LPU83_0710	<i>acd</i>	Acyl-coa dehydrogenase domain-containing protein	I	OFF (m)
LPU83_1479	<i>fobH</i>	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III	I	1.07 (m)
LPU83_1788	<i>cpo1</i>	Non-heme chloroperoxidase	I	2.03 (m)
LPU83_2577	<i>uppS</i>	K00806 undecaprenyl pyrophosphate synthetase	I	1.21 (m)
LPU83_3597	<i>nodN</i>	Dehydratase nodulation protein	I	OFF (m)
LPU83_4195	<i>nodN</i>	Propionyl-coa synthetase	I	-1.66 (c)

Locus tag	Gen	Descripción	COG	M
LPU83_pLPU83d_0097		Phosphatidylserine/phosphatidylglycerophosphate/ cardiolipin synthase	I	-1.36 (m)
LPU83_pLPU83b_0279		FAD dependent oxidoreductase	IR	-1.06 (m)
Cell wall/ membrane/ envelop genesis				
LPU83_0327		Putative glycosyl transferase	M	-1.33 (m)
LPU83_0461	<i>Int</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase	M	-1.33 (m)
LPU83_1045	<i>dacF</i>	K07258 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	M	-1.13 (m)
LPU83_1291		Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	M	-1.92 (m)
LPU83_1492	<i>gumB</i>	Putative capsule polysaccharide export protein	M	1.29 (m)
LPU83_2574	<i>yaeT</i>	Outer membrane protein assembly factor yaeT	M	1.06 (m)
LPU83_3143		Myosin-IXb	M	-2.63 (m)
LPU83_3250	<i>exoF</i>	Exopolysaccharide production protein exoF	M	1.38 (m)
LPU83_3251	<i>exoY</i>	Undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase	M	1.70 (c)
LPU83_pLPU83b_0254		Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	M	OFF (m)
LPU83_pLPU83c_0495	<i>mrcB</i>	Penicillin-binding protein; 1A family	M	OFF (m)
LPU83_pLPU83c_0651	<i>rcdA</i>	K00694 cellulose synthase (UDP-forming)	M	OFF (m)
LPU83_pLPU83d_1124		Glycosyltransferase	M	-1.67 (m)
LPU83_pLPU83d_1435		Glycosyltransferase	M	OFF (m)
LPU83_pLPU83d_1815		Small-conductance mechanosensitive channel	M	-2.29 (m)
LPU83_2668		NAD-dependent epimerase/dehydratase	MG	OFF (m)
LPU83_3132	<i>nodT</i>	Nodulation protein T	MU	1.97 (m)
Cell motility				
LPU83_0818	<i>flgE</i>	Flagellar hook protein flgE	N	OFF (m)
LPU83_pLPU83b_0324		Putative replication protein A	N	-1.24 (m)
LPU83_0525	<i>mcpT</i>	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	NT	-3.48 (m)
LPU83_0775	<i>cheW</i>	Chemotaxis protein cheW	NT	OFF (m)
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones				
LPU83_0303	<i>dnaK</i>	molecular chaperone dnaK	O	1.41 (m)
LPU83_0650	<i>hslO</i>	33 kDa chaperonin	O	1.48 (m)
LPU83_1140	<i>ohr</i>	Organic hydroperoxide resistance protein-like	O	2.19 (m)
LPU83_1265	<i>dop</i>	Serine protease DO-like protease	O	1.36 (m)
LPU83_1330	<i>smgB</i>	Sra-binding protein	O	-3.07 (m)
LPU83_1458	<i>ate</i>	K00685 arginine-trna-protein transferase	O	-2.28 (m)
LPU83_1609	<i>degQ</i>	Serine protease	O	1.43 (m)
LPU83_2336	<i>sufB</i>	UPF0051 protein slr0074	O	1.79 (m)
LPU83_3135	<i>aspH</i>	O		1.03 (m)
LPU83_3176	<i>ureE</i>	Urease accessory protein ureE	O	-2.58 (m)
LPU83_3762	<i>clpB</i>	ATP-dependent chaperone ClpB	O	1.13 (m)
LPU83_3781	<i>grxC</i>	Glutaredoxin protein	O	OFF (m)
LPU83_3849	<i>dnaJ</i>	Molecular chaperone protein; DnaJ family	O	-2.54 (m)
LPU83_pLPU83d_0204	<i>msrA2</i>	O		ON (m)
LPU83_pLPU83d_0292		Glutathione S-transferase	O	ON (m)
LPU83_pLPU83d_0434		HSP20 family molecular chaperone	O	4.34 (m)
LPU83_3977	<i>cycY</i>	Thiol:disulfide interchange protein	OC	1.60 (m)
Inorganic ion transport and metabolism				
LPU83_0147	<i>irr</i>	Iron transcriptional regulator protein	P	-2.01 (m)
LPU83_0564	<i>cutC</i>	Copper homeostasis protein cutC homolog	P	OFF (c)
LPU83_1189	<i>sodB</i>	K04564 superoxide dismutase; Fe-Mn family	P	2.44 (m)
LPU83_1350	<i>sodC</i>	K04565 Cu/Zn superoxide dismutase	P	1.85 (c)
LPU83_1733	<i>terB</i>	Tellurite resistance protein	P	ON (m)
LPU83_2210		ABC transporter; membrane spanning protein	P	-2.79 (m)
LPU83_2211		ABC transporter; substrate binding protein	P	OFF (c)
LPU83_2212		ABC transporter; substrate binding protein (iron)	P	OFF (m)
LPU83_3146	<i>hmuS</i>	Hemin transport protein hmuS	P	-4.14 (m)
LPU83_3147	<i>hmuT</i>	Vitamin B12-binding protein	P	-3.39 (c)
LPU83_4040	<i>sfuA</i>	Iron(III) ABC transporter	P	-1.00 (c)
LPU83_4160	<i>kdpB</i>	Potassium-transporting atpase B chain protein	P	OFF (m)
LPU83_pLPU83a_0034		Putative heavy metal translocating P-type ATPase	P	OFF (c)
LPU83_pLPU83c_0380		P		OFF (m)
LPU83_pLPU83c_0449		Sodium; potassium; lithium and rubidium/H(+) antiporter	P	OFF (m)
LPU83_pLPU83c_0701		K00485 dimethylaniline monooxygenase (N-oxide forming)	P	1.39 (c)
LPU83_pLPU83d_0062	<i>sbp</i>	Sulfate-binding protein	P	1.65 (m)
LPU83_pLPU83d_0187	<i>cobG</i>	Precorrin-3B synthase	P	OFF (m)
LPU83_pLPU83d_1818		Alkylhydroperoxidase ahpD family core domain-containing protein	P	-2.02 (c)
LPU83_pLPU83d_1872	<i>tauA</i>	Taurine-binding periplasmic protein	P	1.79 (c)
LPU83_2209		Iron ABC transporter nucleotide binding/atpase protein	HP	OFF (c)
General function prediction only				
LPU83_3075		tRNA (cmo5u34)-methyltransferase	QR	2.92 (m)
LPU83_0323		Oxidoreductase protein	R	1.98 (m)
LPU83_0520	<i>engB</i>	Putative GTP-binding protein engB	R	1.12 (m)
LPU83_0567		K10441 ribose transport system ATP-binding protein	R	-2.31 (m)
LPU83_1441	<i>perM</i>	UPF0118 membrane protein yrrI	R	1.06 (m)
LPU83_1945		Putative acetyltransferase protein	R	OFF (m)
LPU83_2149		Putative oxidoreductase protein	R	-1.50 (c)
LPU83_2524		K00299 FmN reductase	R	2.12 (m)
LPU83_2651	<i>adh</i>	Alcohol dehydrogenase (NADP+) protein	R	4.12 (m)
LPU83_2824	<i>thuB</i>	Inositol 2-dehydrogenase/D-chiro-inositol 3-dehydrogenase	R	-1.92 (c)
LPU83_3710		Probable hydrolase phosphatase protein	R	-1.65 (c)
LPU83_3838	<i>gloB</i>	Hydroxyacylglutathione hydrolase	R	2.84 (m)
LPU83_pLPU83d_0203		Large extracellular alpha-helical protein	R	-2.78 (m)
LPU83_pLPU83d_0288		R		OFF (m)
LPU83_pLPU83d_1168		N-acetyltransferase GCN5	R	OFF (m)
LPU83_pLPU83d_1817		Putative nucleoside-diphosphate sugar epimerase	R	-1.22 (c)
LPU83_pLPU83d_1890		Putative dehydrogenase	R	-1.62 (c)
Function unknown				
LPU83_0909		K09761 ribosomal RNA small subunit methyltransferase E	S	1.65 (m)
LPU83_0961		Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit	S	3.22 (c)
LPU83_2903		Putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase yrvj	S	2.55 (c)
LPU83_3255	<i>exoH</i>	Succinoglycan biosynthesis protein exoh	S	-1.99 (m)
LPU83_3442		UPF0082 protein R02753	S	2.14 (m)
LPU83_pLPU83a_0096	<i>exoH</i>	Putative succinyltransferase protein	S	OFF (m)
Signal transduction mechanisms				
LPU83_0482		Histidine kinase	T	-1.06 (m)
LPU83_0760	<i>aphB</i>	multi-sensor signal transduction histidine kinase	T	-1.29 (m)
LPU83_0959	<i>etr1</i>	Ethylene receptor	T	-2.09 (m)
LPU83_1221	<i>ptsP</i>	Putative GAF sensor protein	T	OFF (m)
LPU83_3537		Cellulose synthesis regulatory protein	T	OFF (m)
LPU83_3770	<i>cyaD</i>	Adenylate cyclase protein	T	OFF (m)
LPU83_3826		Probable two-component response regulator protein	T	OFF (m)

Locus tag	Gen	Descripción	COG	M
LPU83_pLPU83d_1361		Two-component histidine kinase/response regulator motif-containing protein	T	-3.73 (m)
LPU83_0036	<i>chvI</i>	Probable transcriptional regulator protein	TK	1.43 (m)
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport				
LPU83_0218	<i>cpaB</i>	Pilus assembly protein	U	-1.66 (m)
LPU83_3429	<i>tolB</i>	Protein TolB	U	1.02 (m)
Defense mechanisms				
LPU83_2189	<i>hndJ</i>	V		OFF (m)
LPU83_2747		K01447 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	V	1.00 (c)
LPU83_3671	<i>rmrA</i>	multidrug resistance protein K	V	1.68 (m)
mobilome: prophages, transposons				
LPU83_2508		Transposase	X	OFF (m)

Tabla A. 2. Lista de genes expresadas diferencialmente por RNAseq.

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>hslV</i>	LPU83_0010	Protein VV1_1979	L	-1,50749525
	LPU83_0011	Putative HTH-type transcriptional regulatory protein	K	-1,7641536
	LPU83_0047	ATP-dependent protease subunit HslV (EC 3.4.25.2)	O	1,42049999
	LPU83_0050	Putative conserved protein	.	-1,87066648
	LPU83_0071	Transposase is4 family protein	.	-1,23290005
<i>occM</i>	LPU83_0074	Putative amino acid ABC transporter substrate-binding protein	ET	-1,95047401
	LPU83_0075	Putative polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit	E	-1,80743814
	LPU83_0076	Putative amino acid ABC transporter permease protein	E	-1,22963644
	LPU83_0079	Putative conserved protein	C	-1,02370931
	LPU83_0080	Putative proline racemase protein	E	-1,10592845
<i>oppF</i>	LPU83_0081	Oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.27)	Q	-1,45229699
	LPU83_0095	Putative LacI family transcription regulator	K	-1,09303051
	LPU83_0098	Putative hydrolase protein (EC 3.5.-.-)	R	1,50215761
	LPU83_0106	Putative sugar kinase protein (EC 2.7.7.-)	G	-1,03319412
	LPU83_0107	Uncharacterized protein	.	-1,66166895
	LPU83_0110	Putative cold shock protein Y4CH	K	-1,42013125
	LPU83_0111	Uncharacterized protein	.	-1,73865804
	LPU83_0124	Putative conserved protein	.	1,8598803
	LPU83_0142	Transposase IS4 family protein	.	-1,12691859
	LPU83_0143	Transposase is4 family protein	.	-1,3347711
	LPU83_0148	Putative conserved protein	S	-1,28679048
	LPU83_0149	Putative conserved protein	.	-2,18570148
	LPU83_0151	Putative conserved protein	S	-1,16600538
	LPU83_0152	Putative conserved protein	.	1,08605187
	LPU83_0163	4-aminobutyrate aminotransferase (EC 2.6.1.19)	E	1,04114263
<i>purU</i>	LPU83_0191	Putative conserved protein	.	1,99529868
	LPU83_0198	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10) (Formyl-FH(4) hydrolase)	F	-1,23481375
	LPU83_0203	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	E	-1,02532829
	LPU83_0204	Putative peptide ABC transporter permease	EP	-1,08444557
	LPU83_0221	Pilus subunit transmembrane protein	UW	-1,11925947
	LPU83_0230	Sugar ABC transporter periplasmic protein	G	1,22368959
	LPU83_0265	Putative transmembrane transport protein	.	-1,04162686
	LPU83_0269	Putative arsenate reductase (EC 1.20.4.1)	T	-1,69395974
	LPU83_0270	Putative ArsR family transcriptional regulator	K	-1,94132716
	LPU83_0271	Putative conserved protein	.	-1,07948693
<i>phnG</i>	LPU83_0272	Putative GntR family transcriptional regulator	K	1,39271246
	LPU83_0273	C-P (Carbon-phosphorus) lyase component protein	P	1,22836506
	LPU83_0274	Carbon-phosphorus lyase complex subunit	P	1,30479597
	LPU83_0275	C-P (Carbon-phosphorus) lyase component protein	P	1,18127376
	LPU83_0283	Phosphonates import ATP-binding protein PhnC (EC 3.6.3.28)	P	-2,01879583
<i>ftsK1</i>	LPU83_0292	Cell division protein	D	-1,28760064
	LPU83_0300	Putative conserved protein	S	-1,89997818
	LPU83_0301	Uncharacterized protein	.	-1,47753571
	LPU83_0302	Putative penicillin binding protein	M	-1,15425573
	LPU83_0307	Putative Cro/Ci family transcriptional regulator	K	1,0165237
<i>rpIT</i>	LPU83_0308	Putative conserved protein	P	-2,97707365
	LPU83_0313	50S ribosomal protein L20	J	-1,23648762
	LPU83_0315	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit (EC 6.1.1.20) (Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit) (PheRS)	J	-1,29327095
	LPU83_0316	Putative conserved protein	.	1,76830355
	LPU83_0324	Putative membrane protein	.	-1,05986116
	LPU83_0325	Uncharacterized protein	.	-1,28575006
	LPU83_0354	IS21 family insertion sequence ATP-binding protein (Putative insertion sequence ATP-binding protein y4pL)	L	1,04166007
	LPU83_0360	Uncharacterized protein	.	1,34805473
	LPU83_0362	Uncharacterized protein	.	1,59020513
	LPU83_0373	Putative iron-regulated protein	S	1,65549719
	LPU83_0377	Putative nucleoside-diphosphate-sugar epimerase protein	M	-1,27695728
	LPU83_0380	Undecaprenyl-diphosphatase (EC 3.6.1.27) (Bacitracin resistance protein) (Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase)	I	-1,49959343
<i>uppP</i>	LPU83_0381	Putative conserved protein	.	-1,6300801
	LPU83_0399	Ferritin Dps family protein (EC 1.16.-.-)	PV	2,00372627
	LPU83_0406	Putative conserved protein	J	-1,04519922
	LPU83_0409	Trehalose-6-phosphate synthase (EC 2.4.1.15) (Osmoregulatory trehalose synthesis protein A) (UDP-glucose-glucosephosphate glucosyltransferase)	G	2,55139304
	LPU83_0410	Trehalose 6-phosphate phosphatase (EC 3.1.3.12)	G	2,16980055
<i>otsA</i>	LPU83_0411	Putative carboxypeptidase-related protein (EC 3.4.16.-)	E	-1,89566704
	LPU83_0412	Putative cyanate transport protein	P	-1,55396739
	LPU83_0416	Putative glutamine amidotransferase protein (EC 2.6.1.16)	R	-1,353674
	LPU83_0442	Ferric hydroxamate uptake periplasmic protein	P	3,65820671
	LPU83_0443	Ferric iron reductase	P	4,2351376
<i>fhuF</i>	LPU83_0444	Ferrichrome-iron transporter, receptor protein	P	3,97116288
	LPU83_0448	Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase-like protein (EC 1.3.99.-)	H	-1,01585636
	LPU83_0449	dITP/XTP pyrophosphatase (EC 3.6.1.66) (Non-canonical purine NTP pyrophosphatase) (Non-standard purine NTP pyrophosphatase) (Nucleoside-triphosphate diphosphatase) (Nucleoside-triphosphate pyrophosphatase) (NTPase)	F	-1,08052204
	LPU83_0450	Lactoylglutathione lyase (EC 2.5.1.-)	Q	-1,37301948
	LPU83_0451	Ribonuclease PH (RNase PH) (EC 2.7.7.56) (tRNA nucleotidyltransferase)	J	-1,28990439
<i>grpE</i>	LPU83_0454	Protein GrpE (HSP-70 cofactor)	O	1,00441495
	LPU83_0455	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (EC 3.2.2.1)	F	-1,33964765
	LPU83_0456	Molecular chaperone small heat shock protein	O	1,92730021
	LPU83_0466	Phospholipid/glycerol acyltransferase (EC 2.3.1.51)	I	-1,30792269
	LPU83_0468	Ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.128)	J	-1,12422545
<i>rimI</i>	LPU83_0473	Tryptophan--tRNA ligase (EC 6.1.1.2) (Tryptophanyl-tRNA synthetase) (TrpRS)	J	-1,27084136
	LPU83_0478	Uncharacterized protein	.	-1,03426188
	LPU83_0498	Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,23265979
	LPU83_0501	Robable methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,39328148
	LPU83_0507	Putative conserved protein	.	-1,74315462
<i>dapE</i>	LPU83_0508	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase (SDAP desuccinylase) (EC 3.5.1.18) (N-succinyl-L-2,6-diaminoheptanedioate amidohydrolase)	E	-1,1815317
	LPU83_0511	Putative conserved protein	.	-1,38834655
	LPU83_0513	Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase subunit protein	.	-2,55495583
	LPU83_0521	Transposase is4 family protein	.	-1,2082334
	LPU83_0528	Succinylglutamate desuccinylase/aspartoacylase	R	2,0439947
	LPU83_0530	Putative isochorismatase-family hydrolase	HR	2,60718423
	LPU83_0532	Putative conserved protein	.	-1,69834401

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>frcB</i>	LPU83_0533	Putative conserved protein	.	-2,1947496
	LPU83_0537	HTH-type transcriptional repressor purR Purine nucleotide synthesis repressor	G	-1,07231204
	LPU83_0547	Uncharacterized protein	S	-1,25265029
	LPU83_0548	Prestalk A differentiation protein A	R	-1,02885342
	LPU83_0557	Beta-mannosidase (EC 3.2.1.25)	G	-1,06183603
	LPU83_0576	Uncharacterized protein	K	1,29663946
	LPU83_0623	Uncharacterized protein	.	1,81489471
	LPU83_0625	DNA polymerase LigD, ligase domain protein (EC 6.5.1.1)	L	1,30342783
	LPU83_0631	Uncharacterized protein	.	-1,79614937
	LPU83_0636	Uncharacterized protein	R	2,28476946
<i>pstS</i>	LPU83_0640	Phosphate-binding protein pstS PBP	P	-1,58276493
	LPU83_0646	Transposase insG for insertion sequence element IS4	.	-1,13583711
	LPU83_0661	Arylsulfatase (EC 3.1.6.1)	P	1,4565041
<i>ARSH</i>	LPU83_0663	Uncharacterized protein	.	1,69563176
	LPU83_0664	Uncharacterized protein	.	1,37224428
	LPU83_0671	Chemoreceptor mcpA Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,4435076
<i>mcpA1</i>	LPU83_0678	Uncharacterized protein	.	1,677128
	LPU83_0686	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD (EC 1.11.1.15)	P	1,25224121
	LPU83_0687	HTH-type transcriptional repressor nsrR	K	1,50559906
	LPU83_0689	D-amino-acid dehydrogenase (EC 1.4.99.1)	E	-1,1321618
	LPU83_0693	Uncharacterized protein	S	-1,02040619
	LPU83_0700	Uncharacterized protein	.	-1,06410703
	LPU83_0701	Probable membrane transporter protein	S	-1,43866689
	LPU83_0703	UPF0053 protein	P	-1,51543582
	LPU83_0709	Acetyl-CoA C-acetyltransferase (EC 2.3.1.9)	I	1,5384563
	LPU83_0710	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	I	2,17623542
<i>fadA</i>	LPU83_0711	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	R	1,26113934
	LPU83_0728	Uncharacterized protein	.	1,69686692
	LPU83_0730	Uncharacterized protein	.	1,18571824
<i>acd</i>	LPU83_0734	Putative glycosyltransferase C2F3.01 (EC 2.4.-.-)	M	-1,13645636
	LPU83_0771	Putative chemoreceptor mcpE	NT	-1,75833204
	LPU83_0772	Chemotaxis protein CheX	T	-1,4210074
	LPU83_0773	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein phoB	T	-1,53085088
	LPU83_0774	Two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA (EC 2.7.13.3)	NT	-1,56982009
	LPU83_0775	Chemotaxis protein cheW	NT	-1,77789282
	LPU83_0776	Chemotaxis protein methyltransferase (EC 2.1.1.80)	NT	-2,17582626
	LPU83_0777	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase (EC 3.1.1.61)	NT	-1,44316684
	LPU83_0778	Putative transcriptional regulator ycf27 OmpR-like protein	T	-1,4687989
	LPU83_0779	Probable chemoreceptor glutamine deamidase CheD (EC 3.5.1.44)	NT	-1,70228677
<i>mcpE</i>	LPU83_0780	Uncharacterized protein	.	-1,5428514
	LPU83_0781	Flagellar M-ring protein	NU	-2,7001184
	LPU83_0782	Flagellar M-ring protein	NU	-2,71219853
	LPU83_0785	Uncharacterized protein	.	-1,69080788
	LPU83_0788	Flagellar motor switch protein FliN	NU	-1,03417043
	LPU83_0789	Flagellar motor switch protein FliM	N	-2,49325125
	LPU83_0790	Chemotaxis protein motA Motility protein A	N	-2,48688455
	LPU83_0791	Flagellar basal-body rod protein FlgF	N	-2,3173738
	LPU83_0792	Flagellum-specific ATP synthase (EC 3.6.3.14)	NU	-2,13207719
	LPU83_0793	Uncharacterized protein	.	-1,79692406
<i>flgB</i>	LPU83_0794	Flagellar basal body rod protein FlgB	N	-2,0311154
	LPU83_0795	Flagellar basal-body rod protein FlgC	N	-1,76419052
	LPU83_0796	Flagellar hook-basal body complex protein FlIE	N	-1,86104977
	LPU83_0797	Flagellar basal-body rod protein FlgG (Distal rod protein)	N	-2,01139133
	LPU83_0798	Flagella basal body P-ring formation protein FlgA	N	-2,26847302
	LPU83_0799	Flagellar P-ring protein (Basal body P-ring protein)	N	-2,46716317
	LPU83_0800	Uncharacterized protein	N	-2,03980029
	LPU83_0801	Flagellar L-ring protein (Basal body L-ring protein)	N	-2,01580847
	LPU83_0802	Flagellar protein FliI	.	-2,20175788
	LPU83_0803	Flagellar biosynthetic protein FlIP	N	-1,13825405
<i>flgC</i>	LPU83_0806	Uncharacterized protein	.	-1,47502693
	LPU83_0807	Putative UDP-N-acetylglucosamine-peptide N-acetylglucosaminyltransferase SEC (EC 2.4.1.1-)	O	-2,10072359
	LPU83_0809	Flagellin	N	-1,48672681
	LPU83_0811	Flagellin	N	-1,90245577
	LPU83_0812	Uncharacterized protein	.	-2,34454151
	LPU83_0813	Uncharacterized protein	N	-1,90215361
	LPU83_0814	Chemotaxis protein motC Motility protein C	.	-2,05613173
	LPU83_0815	Chemotaxis protein motD Motility protein D	.	-1,77737842
	LPU83_0816	Uncharacterized protein	M	-1,90169434
	LPU83_0818	Flagellar hook protein FlgE	N	-1,03635802
<i>flgD</i>	LPU83_0820	Flagellin	N	-1,04388714
	LPU83_0823	Basal-body rod modification protein flgD	N	-1,06077014
	LPU83_0824	Flagellar biosynthetic protein FliQ	N	-1,53947445
	LPU83_0825	Flagellar biosynthesis protein FlhA	N	-2,29325974
	LPU83_0828	Uncharacterized protein	.	-2,3773654
	LPU83_0829	Uncharacterized protein	.	-2,73544693
	LPU83_0830	Uncharacterized protein	.	-2,51611404
	LPU83_0840	Uncharacterized protein	.	-1,88223498
	LPU83_0847	Putative chemoreceptor y4fA Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,41121645
	LPU83_0848	Putative chemoreceptor y4fA Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,66923212
<i>flgE</i>	LPU83_0850	Uncharacterized protein	.	1,56770829
	LPU83_0851	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)	C	1,83746598
	LPU83_0852	Putative HTH-type transcriptional regulatory protein PF1851	K	1,56255457
	LPU83_0867	Uncharacterized protein	.	-1,75897727
	LPU83_0868	Coiled-coil domain-containing protein 80	.	-1,58371808
	LPU83_0882	Chalcone synthase (EC 2.3.1.74)	Q	1,10491956
	LPU83_0886	Selenium-binding protein 1 Selenium-binding protein 2	.	1,32072598
	LPU83_0896	Putative multidrug resistance protein mdtD	G	-1,37461358
	LPU83_0902	Carboxymethylglutaminylase (EC 3.1.1.45)	Q	-1,34472814
	LPU83_0904	Putative HTH-type transcriptional regulator in lacX 3' region ORF3	K	-1,32320981
<i>qor3</i>	LPU83_0914	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein (EC 1.6.5.5)	CR	-1,09182913
	LPU83_0920	Uncharacterized protein	.	-1,06062423
	LPU83_0923	DNA-3-methyladenine glycosylase I (EC 3.2.2.20)	L	-1,05399805
	LPU83_0929	Uncharacterized protein	Q	1,25894621
	LPU83_0934	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	E	-1,31040234
	LPU83_0935	ATP phosphoribosyltransferase (ATP-PRT) (ATP-PRTase) (EC 2.4.2.17)	E	-1,39614296
	LPU83_0938	Uncharacterized protein	.	-1,67989949
	LPU83_0940	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)	O	-1,36151251

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
atpF	LPU83_0959	Ethylene receptor (EC 2.7.13.3)	T	-1,18839415
	LPU83_0960	Putative signaling protein CC_0091	T	-1,02179652
	LPU83_0961	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF2	.	1,01760722
	LPU83_0971	Spore cortex-lytic enzyme SCLF	DM	-1,20844312
	LPU83_0976	ATP synthase subunit b (ATP synthase F(0) sector subunit b) (ATPase subunit I) (F-type ATPase subunit b) (F-ATPase subunit b)	C	-1,07575415
mntH1	LPU83_0978	Uncharacterized protein	.	-1,5705606
	LPU83_0989	Divalent metal cation transporter MntH	P	1,4355271
	LPU83_1002	Uncharacterized protein	S	-1,27588197
tex	LPU83_1004	Protein yhgF	K	-1,33564479
	LPU83_1013	Uncharacterized protein	.	-1,46523523
	LPU83_1016	Lectin-like protein BA14k	.	-1,75895663
POX4	LPU83_1018	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	I	2,04927868
	LPU83_1019	Enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)	I	1,32246043
	LPU83_1022	RNA methyltransferase, TrmA family (EC 2.1.1.-)	J	-1,57177423
mcpU	LPU83_1025	Putative chemoreceptor y4sl Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,74446562
	LPU83_1038	Uncharacterized protein	.	-1,43632387
	LPU83_1039	Phosphoglycerate mutase	G	-1,68791192
gpmB3	LPU83_1040	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (EC 1.3.1.9)	I	-1,31066623
	LPU83_1042	Uncharacterized protein	.	-1,06356188
	LPU83_1050	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1)	C	-1,22924151
ctaD	LPU83_1051	Cytochrome c oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1)	C	-1,45130967
ctaB	LPU83_1052	Protoheme IX farnesyltransferase (EC 2.5.1.-) (Heme B farnesyltransferase) (Heme O synthase)	HI	-1,34874501
	LPU83_1053	Uncharacterized protein	.	-1,4045685
	LPU83_1054	Cytochrome c oxidase assembly protein CtaG	CO	-1,76496524
ctaE	LPU83_1055	Cytochrome c oxidase subunit III (EC 1.9.3.1)	C	-1,99641592
rmhA	LPU83_1061	Ribonuclease H (RNase H) (EC 3.1.26.4)	L	-1,16119327
	LPU83_1062	Putative conserved protein	R	-1,07953609
	LPU83_1065	Putative zinc ABC transporter	P	-1,83820534
	LPU83_1066	Putative zinc ABC transporter, permease protein	P	-1,66072859
	LPU83_1067	Putative zinc ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.-)	P	-2,64350801
	LPU83_1068	Transposase is4 family protein	.	-1,05966338
	LPU83_1070	Putative conserved protein	OC	-1,19979037
	LPU83_1072	Putative conserved protein	S	1,45813238
	LPU83_1085	Methyltransferase (EC 2.1.1.-)	L	-1,25414654
ccrM	LPU83_1086	Uncharacterized protein	.	-1,33652942
	LPU83_1087	Uncharacterized protein	.	-2,24494344
	LPU83_1088	2-haloacid dehalogenase (EC 3.8.1.2)	H	-2,50676797
mutY	LPU83_1089	A/G-specific adenine glycosylase (EC 3.2.2.-)	L	-1,00512009
	LPU83_1091	Na(+)/H(+) antiporter nhaA 1 Sodium/proton antiporter nhaA 1	O	-1,66503711
	LPU83_1093	Pyruvate, phosphate dikinase (EC 2.7.9.1)	G	-1,00522616
ppdK	LPU83_1094	Uncharacterized protein	.	-1,12768726
	LPU83_1095	Uncharacterized protein	.	1,21043587
	LPU83_1101	Uncharacterized protein	.	-1,11508852
ina	LPU83_1104	Aggrecan core protein Cartilage-specific proteoglycan core protein	.	-1,31609771
	LPU83_1105	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain ALS	.	-1,46267611
	LPU83_1111	HTH-type transcriptional repressor nsrR	K	-1,28302495
	LPU83_1119	Uncharacterized protein	K	1,1235178
	LPU83_1133	DNA ligase (ATP) (EC 6.5.1.1)	L	1,16139263
	LPU83_1134	Dipeptidyl peptidase 8 (EC 3.4.14.5)	E	-1,38024437
	LPU83_1135	Protein erfK/srfK	M	-1,9812025
	LPU83_1145	Uncharacterized protein	.	1,67463449
	LPU83_1146	27 kDa antigen Cfp30B	R	1,3411003
rtxD	LPU83_1150	Leukotoxin translocation ATP-binding protein lktB (EC 3.6.3.43)	V	-1,24822974
	LPU83_1151	Leukotoxin secretion protein D	V	-1,30224685
	LPU83_1160	Uncharacterized protein	.	1,06123175
	LPU83_1169	Uncharacterized protein	.	-2,25936414
	LPU83_1171	Uncharacterized protein	.	1,13642544
	LPU83_1179	Auxin-binding protein 1 ABP	R	1,16927922
	LPU83_1191	Uncharacterized protein	R	1,47562721
	LPU83_1192	HTH-type transcriptional activator rhaS L-rhamnose operon regulatory protein rhaS	K	1,08927315
	LPU83_1193	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR (EC 1.1.1.100)	IQR	1,17615255
cycF	LPU83_1196	Cytochrome c-556 Cytochrome c556	C	-4,37181632
	LPU83_1197	Diheme cytochrome-C-type signal peptide protein (EC 1.1.99.3)	C	-1,55337764
	LPU83_1202	Zinc transporter 5 ZnT-5	P	1,24066832
gcd	LPU83_1204	Uncharacterized protein	.	-1,7251578
	LPU83_1205	Glucose dehydrogenase (EC 1.1.5.2)	G	1,37134158
	LPU83_1206	UPF0061 protein LPU83_1206	S	1,58328966
ynaF	LPU83_1216	Uncharacterized protein	Q	-1,16657852
	LPU83_1217	Putative universal stress protein SAS1637	T	1,5688555
	LPU83_1218	DnaK suppressor protein homolog	J	1,76869605
dskA	LPU83_1224	Phosphothioric acetyltransferase (EC 2.3.1.183)	E	-1,25637668
	LPU83_1226	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB (EC 1.8.4.12) (Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase)	O	1,17347563
	LPU83_1230	Multicomponent Na ⁺ :H ⁺ antiporter subunit D (EC 1.6.99.5)	CP	-1,1631434
mnhG	LPU83_1233	UPF0091 protein	P	-1,04090798
	LPU83_1237	Two-component system, cell cycle sensor histidine kinase DivJ (EC 2.7.13.3)	T	-1,06909432
	LPU83_1256	Uncharacterized protein	.	-1,15225275
rcaC	LPU83_1257	Protein rcaC	TK	-1,20210593
	LPU83_1258	Signal transduction histidine-protein kinase arlS (EC 2.7.13.3)	T	-1,08606976
	LPU83_1262	Cytochrome c-type biogenesis protein cycK	CO	-1,38456193
cycK	LPU83_1271	S-adenosylmethionine uptake transporter	GER	-1,42017883
	LPU83_1275	Chaperone protein dnaK Heat shock protein 70	O	-1,54304286
	LPU83_1276	Multidrug resistance protein mdtB Multidrug transporter mdtB	V	-3,41274279
yegO	LPU83_1277	Multidrug resistance protein mdtA Multidrug transporter mdtA	MV	-3,31205006
	LPU83_1280	Acetyltransferase	R	-1,51715981
	LPU83_1287	Putative lipid kinase yegS-like (EC 2.7.1.-)	IR	1,3052853
	LPU83_1290	Uncharacterized protein	M	-1,2399676
	LPU83_1297	Uncharacterized protein	.	-1,51072134
	LPU83_1299	Uncharacterized protein	.	-1,43455866
	LPU83_1301	Uncharacterized protein	S	1,28752039
	LPU83_1303	Uncharacterized protein	T	-1,0514272
	LPU83_1305	Uncharacterized protein	.	1,0430197
ltrA	LPU83_1307	Putative HTH-type transcriptional regulator ltrA	K	1,57114876
	LPU83_1326	Porin	.	-1,13665554
	LPU83_1346	Uncharacterized protein	T	-1,67306071
ropA1	LPU83_1363	Lysine exporter protein	E	-1,59693068
	LPU83_1371	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase (EC 2.1.1.77)	O	1,05983908

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>rplI</i>	LPU83_1392	50S ribosomal protein L9	J	-1,45094839
<i>rpsR</i>	LPU83_1394	30S ribosomal protein S18	J	-1,50101808
<i>rpsF</i>	LPU83_1395	30S ribosomal protein S6	J	-1,25293855
	LPU83_1411	Phosphatase protein (EC 3.1.3.-)	.	-1,44724033
	LPU83_1416	Chitooligosaccharide deacetylase (EC 3.5.1.-)	GM	-1,24862514
<i>ndk</i>	LPU83_1420	Nucleoside diphosphate kinase (NDK) (NDP kinase) (EC 2.7.4.6) (Nucleoside-2-P kinase)	F	-1,3374084
	LPU83_1421	Uncharacterized protein	.	1,11455094
	LPU83_1422	Uncharacterized protein	R	1,04069545
<i>fabG5</i>	LPU83_1428	Short chain dehydrogenase (EC 1.1.1.100)	IQR	1,19308998
<i>ropB</i>	LPU83_1429	Outer membrane protein A Outer membrane protein II	M	-1,94563178
	LPU83_1430	Transposase IS4 family protein (Transposase for insertion sequence element IS1106)	.	-1,62470889
	LPU83_1435	Molybdopterine oxidoreductase (EC 1.2.1.2)	C	-1,00092542
<i>nudF3</i>	LPU83_1436	NUDIX hydrolase (EC 3.6.1.13)	V	-1,42434902
<i>vapC</i>	LPU83_1437	Ribonuclease VapC (RNase VapC) (EC 3.1.-.-) (Toxin VapC)	R	-1,24915606
<i>perM</i>	LPU83_1441	UPF0118 membrane protein	R	-1,02231606
<i>aspS</i>	LPU83_1453	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase (EC 6.1.1.23) (Aspartyl-tRNA synthetase) (AspRS) (Non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase) (ND-AspRS)	J	-1,16526794
	LPU83_1456	Activator of HSP90 ATPase 1 family protein	S	1,82925012
	LPU83_1459	Uncharacterized protein	S	1,57517598
	LPU83_1471	Uncharacterized protein	.	-1,87933842
	LPU83_1484	Uncharacterized protein	.	2,52986997
	LPU83_1491	Glycogen synthase (EC 2.4.1.21)	M	-1,00216254
<i>gumB</i>	LPU83_1492	Putative capsule polysaccharide export protein ORF4	M	-1,21280044
<i>ctaA</i>	LPU83_1496	Heme A synthase (HAS) (EC 1.3.-.-) (Cytochrome aa3-controlling protein)	H	-1,44134236
	LPU83_1508	Uncharacterized protein	.	1,06511015
	LPU83_1526	Uncharacterized protein	.	1,17537649
	LPU83_1546	Uncharacterized protein	.	2,69277637
	LPU83_1547	DNA polymerase LigD, ligase domain protein (EC 6.5.1.1)	L	1,81109212
	LPU83_1552	Uncharacterized protein	.	1,84535811
<i>tufB</i>	LPU83_1560	Elongation factor Tu (EF-Tu)	J	-1,26425392
<i>rplK</i>	LPU83_1565	50S ribosomal protein L11	J	-1,01049783
<i>rplA</i>	LPU83_1566	50S ribosomal protein L1	J	-1,22821276
<i>rplJ</i>	LPU83_1567	50S ribosomal protein L10	J	-1,52318023
<i>rplL</i>	LPU83_1568	50S ribosomal protein L7/L12	J	-1,82871373
<i>tufB</i>	LPU83_1576	Elongation factor Tu (EF-Tu)	J	-1,09720065
<i>rplD</i>	LPU83_1579	50S ribosomal protein L4	J	-1,39724311
<i>rplW</i>	LPU83_1580	50S ribosomal protein L23	J	-1,35336565
<i>rplV</i>	LPU83_1583	50S ribosomal protein L22	J	-1,09283263
<i>rpsC</i>	LPU83_1584	30S ribosomal protein S3	J	-1,17149332
<i>rplP</i>	LPU83_1585	50S ribosomal protein L16	J	-1,14228061
<i>rpmC</i>	LPU83_1586	50S ribosomal protein L29	J	-1,22210095
<i>rpsQ</i>	LPU83_1587	30S ribosomal protein S17	J	-1,3598292
<i>rplX</i>	LPU83_1589	50S ribosomal protein L24	J	-1,18111202
<i>rplE</i>	LPU83_1590	50S ribosomal protein L5	J	-1,0337863
<i>rpsN</i>	LPU83_1591	30S ribosomal protein S14	J	-1,13948917
<i>rpsH</i>	LPU83_1592	30S ribosomal protein S8	J	-1,20522008
<i>rplF</i>	LPU83_1593	50S ribosomal protein L6	J	-1,26292047
<i>rplR</i>	LPU83_1594	50S ribosomal protein L18	J	-1,05384062
<i>rpsE</i>	LPU83_1595	30S ribosomal protein S5	J	-1,19037852
<i>rpmD</i>	LPU83_1596	50S ribosomal protein L30	J	-1,02055562
<i>rplO</i>	LPU83_1597	50S ribosomal protein L15	J	-1,31097126
<i>rplQ</i>	LPU83_1603	50S ribosomal protein L17	J	-1,08573748
	LPU83_1608	Putative lipoprotein lprI	S	2,22190615
<i>degQ</i>	LPU83_1609	Periplasmic serine endoprotease DegP-like (EC 3.4.21.107)	O	-1,10305563
	LPU83_1611	Putative conserved protein	.	-1,26881317
<i>rpsI</i>	LPU83_1622	30S ribosomal protein S9	J	-1,40604784
<i>rplM</i>	LPU83_1623	50S ribosomal protein L13	J	-1,09452155
	LPU83_1626	Putative conserved protein	GER	-1,09034008
	LPU83_1628	CoA-binding protein (EC 6.2.1.4)	R	1,35735767
	LPU83_1633	Uncharacterized protein	.	-1,27481468
<i>dctD</i>	LPU83_1635	C4-dicarboxylate transport transcriptional regulatory protein	T	1,08531639
<i>dctA</i>	LPU83_1637	C4-dicarboxylate transport protein	C	-2,02177301
	LPU83_1639	Putative conserved protein	T	-1,08417003
<i>nuoC</i>	LPU83_1655	NADH-quinone oxidoreductase subunit C (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit C) (NDH-1 subunit C)	C	-1,41101027
<i>nuoD</i>	LPU83_1656	NADH-quinone oxidoreductase subunit D (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit D) (NDH-1 subunit D)	C	-1,6461818
	LPU83_1657	Putative conserved protein	.	-1,53435498
<i>nuoE</i>	LPU83_1658	NADH dehydrogenase I subunit E (EC 1.6.5.3)	C	-1,6559424
<i>nuoF</i>	LPU83_1659	NADH-quinone oxidoreductase subunit F (EC 1.6.5.11)	C	-1,70452254
	LPU83_1660	Putative conserved protein (EC 1.6.5.3)	L	-1,30520785
<i>nuoG</i>	LPU83_1661	NADH-quinone oxidoreductase (EC 1.6.5.11)	C	-2,20547575
<i>nuoH</i>	LPU83_1662	NADH-quinone oxidoreductase subunit H (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit H) (NDH-1 subunit H)	C	-2,45222957
<i>nuoI</i>	LPU83_1663	NADH-quinone oxidoreductase subunit I (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit I) (NDH-1 subunit I)	C	-2,23354046
<i>nuoJ</i>	LPU83_1664	NADH dehydrogenase subunit J (EC 1.6.5.3)	C	-2,74703377
<i>nuoK</i>	LPU83_1665	NADH-quinone oxidoreductase subunit K (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit K) (NDH-1 subunit K)	C	-2,90182122
<i>nuoL</i>	LPU83_1666	NADH dehydrogenase I subunit L (EC 1.6.5.3)	CP	-2,74771296
<i>nuoM</i>	LPU83_1667	NADH dehydrogenase subunit M (EC 1.6.5.3)	C	-2,93685146
<i>nuoN</i>	LPU83_1668	NADH-quinone oxidoreductase subunit N (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit N) (NDH-1 subunit N)	C	-3,02743683
<i>birA</i>	LPU83_1669	Biotin transcriptional regulator bifunctional protein (EC 6.3.4.15)	H	-2,34776424
	LPU83_1670	Ribonuclease J 1 (EC 3.1.-.-)	J	-1,4111575
<i>gloA1</i>	LPU83_1671	Methylmalonyl-CoA epimerase (EC 5.1.99.1)	Q	-1,22204123
	LPU83_1689	Putative conserved protein	S	1,56805725
	LPU83_1722	ATP-dependent Clp protease	R	-1,32774888
	LPU83_1726	Uncharacterized protein	.	-2,39083672
	LPU83_1727	Uncharacterized protein	.	-1,40315267
	LPU83_1728	Uncharacterized protein	.	-3,55855729
	LPU83_1729	Uncharacterized protein	.	-3,79104788
	LPU83_1730	Uncharacterized protein	.	-4,09170054
	LPU83_1731	Uncharacterized protein	.	-3,32952095
	LPU83_1732	Uncharacterized protein	.	-2,21535802
<i>terB</i>	LPU83_1733	Tellurite resistance protein	P	-1,73347638
	LPU83_1734	Uncharacterized protein	.	-1,97679821
	LPU83_1741	Putative conserved protein	.	-1,60463281

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>acpD</i> , <i>azoR</i>	LPU83_1742	Uncharacterized protein	.	-2,46240644
	LPU83_1743	Putative conserved protein	.	-3,83876007
	LPU83_1744	Uncharacterized protein	.	-4,5622539
	LPU83_1745	Uncharacterized protein	.	-4,1936753
	LPU83_1746	DNA polymerase bacteriophage-type (EC 2.7.7.7)	L	-3,23174165
	LPU83_1776	DSBA oxidoreductase	O	-1,38038625
	LPU83_1780	Putative conserved protein	.	1,45588264
	LPU83_1783	Putative conserved protein	.	1,08633993
	LPU83_1784	Uncharacterized protein	.	-1,78477664
	LPU83_1793	Putative substrate-binding component of ABC transporter	E	-1,35323667
	LPU83_1795	Glycine betaine transport system permease protein opuAB	E	-1,06564539
	LPU83_1818	Putative conserved protein	.	-1,33997508
	LPU83_1824	FMN-dependent NADH-azoreductase (EC 1.7.-.-) (Azo-dye reductase) (FMN-dependent NADH-azo compound oxidoreductase)	C	-1,58657288
	LPU83_1841	Uncharacterized protein	.	1,94561407
	LPU83_1843	Putative conserved protein	F	1,13768089
	LPU83_1860	Uncharacterized protein	.	1,00486668
	LPU83_1861	Uncharacterized protein	.	-1,60100266
	LPU83_1881	<i>Lipoprotein nlpD</i>	M	-1,01636248
<i>lppB</i>	LPU83_1887	Putative conserved protein	.	-1,35054468
	LPU83_1890	Zn-dependent hydrolase (EC 3.1.2.6)	P	1,33674902
	LPU83_1891	Methyltransferase type 11 (EC 2.1.1.-)	H	-1,14269697
	LPU83_1896	Uncharacterized protein	.	2,67357388
	LPU83_1897	Putative conserved protein	S	1,99818556
	LPU83_1899	Putative DNA-binding protein	.	1,29293137
	LPU83_1900	Insertion sequence transposase protein	.	1,3151118
	LPU83_1907	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (EC 1.6.1.1)	C	-1,13117085
	LPU83_1908	Putative conserved protein	T	-3,18892207
	LPU83_1911	6-aminohexanoate-dimer hydrolase (EC 3.5.1.46)	V	1,2894695
	LPU83_1936	<i>Glycosyl transferase family 2e (EC 2.4.1.41)</i>	M	-2,15627896
	LPU83_1940	Putative conserved protein	S	-1,19780108
	LPU83_1949	Putative conserved protein	M	-1,50011603
	LPU83_1977	Uncharacterized protein	.	-2,18581472
	LPU83_1992	Uncharacterized protein	.	-1,83892737
	LPU83_1993	Uncharacterized protein	.	-1,29043478
	LPU83_2001	Uncharacterized protein	.	1,02071699
	LPU83_2007	Putative mannose-sensitive agglutinin	.	-1,43906504
	LPU83_2008	Putative conserved protein	.	-2,21253265
<i>glpD</i> <i>potA1</i>	LPU83_2009	Putative terminase small subunit protein	.	-1,61875094
	LPU83_2010	Putative terminase large subunit protein	X	-1,17786951
	LPU83_2011	Putative conserved protein	.	-1,13935634
	LPU83_2012	Uncharacterized protein	.	-1,95255821
	LPU83_2014	Putative conserved protein	.	-2,20619588
	LPU83_2015	Putative conserved protein	.	-2,92017579
	LPU83_2016	Putative phage major head protein	.	-2,66339528
	LPU83_2017	Uncharacterized protein	.	-2,62855649
	LPU83_2018	Putative conserved protein	.	-2,15002258
	LPU83_2019	Putative conserved protein	.	-2,03459655
	LPU83_2022	Putative conserved protein	.	-2,03717419
	LPU83_2023	Putative conserved protein	.	-1,49398291
	LPU83_2033	Uncharacterized protein	.	1,12622063
	LPU83_2036	Putative conserved protein	.	-1,23110599
	LPU83_2053	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.5.3)	C	4,36762025
	LPU83_2054	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein (EC 3.6.3.31)	G	2,16397338
	LPU83_2061	<i>Inner membrane protein yhjW</i>	M	-3,73108646
	LPU83_2062	Two-component response regulator protein	TK	-3,05266637
	LPU83_2063	Uncharacterized protein	.	-2,62017629
<i>kefA</i>	LPU83_2066	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein (EC 5.1.2.2)	MR	1,00318883
	LPU83_2070	Major facilitator superfamily MFS_1	G	-1,12886571
	LPU83_2072	Putative mscS family protein	M	-1,20584423
	LPU83_2073	Putative conserved protein	.	-2,45349199
	LPU83_2074	Dimethylglycine dehydrogenase (EC 1.5.8.4)	E	-1,40120528
	LPU83_2075	Peroxide stress-activated histidine kinase mak1 (EC 2.7.13.3)	TK	-1,29686961
	LPU83_2078	Uncharacterized protein	.	1,16081968
	LPU83_2098	Transposase IS4 family protein (Transposase for insertion sequence element IS1106)	X	2,56989393
	LPU83_2116	Chloride channel protein	P	-2,9448305
	LPU83_2117	Uncharacterized protein	.	-3,65487167
	LPU83_2122	Probable membrane transporter protein	S	-1,38789716
	LPU83_2124	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (EC 3.2.2.-)	F	-1,02728045
	LPU83_2128	Cobalamin biosynthesis protein CobD	H	-1,48543281
	LPU83_2134	<i>Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase (EC 2.3.1.-)</i>	I	-1,86121915
	LPU83_2137	Uncharacterized protein	.	1,49123317
	LPU83_2152	Uncharacterized protein	P	-4,64696227
	LPU83_2153	Cobalamin biosynthesis protein	R	-1,24337244
	LPU83_2160	Uncharacterized protein	.	-1,34413994
	LPU83_2178	Uncharacterized protein	.	-1,66986667
<i>dgkA</i> <i>ssuA</i> <i>ssuD</i>	LPU83_2194	Diacylglycerol kinase (EC 2.7.1.107)	I	-1,3695192
	LPU83_2199	Sugar ABC transporter, permease (EC 3.6.3.17)	G	1,20890188
	LPU83_2205	Putative aliphatic sulfonate substrate binding component of ABC transporter (EC 3.6.3.-)	P	2,5815781
	LPU83_2206	Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5) (FMNH2-dependent aliphatic sulfonate monooxygenase)	HR	2,24921875
	LPU83_2207	Putative aliphatic sulphonate ABC transporter	P	2,54827845
	LPU83_2208	Aliphatic sulfonates import ATP-binding protein SsuB (EC 3.6.3.-)	P	2,29407522
	LPU83_2209	Iron ABC transporter nucleotide binding/ATPase protein (EC 3.6.3.34)	PH	1,54695349
	LPU83_2210	ABC transporter, membrane spanning protein	P	1,64389265
	LPU83_2211	ABC transporter, substrate binding protein	P	2,5184002
	LPU83_2212	ABC transporter, substrate binding protein (Iron)	P	2,85333436
	LPU83_2213	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE (EC 2.1.1.-)	H	1,2015853
	LPU83_2219	Uncharacterized protein	S	1,03242001
	LPU83_2220	Putative phosphoribosylanthranilate isomerase subunit Usg protein	S	2,70823181
	LPU83_2221	Amino acid ABC transporter, permease protein	E	-2,07241561
	LPU83_2222	Amino acid ABC transporter permease	E	-1,62820923
	LPU83_2238	Fumarate hydratase class I (EC 4.2.1.2)	C	-1,41076602
	LPU83_2249	Putative cyclic beta-1,2-glucan modification protein	M	-1,86539299
	LPU83_2255	Putative 3-phenylpropionic acid transporter	.	-1,02680214
	LPU83_2264	Electron transfer protein 1, mitochondrial	C	-1,45105711
<i>fdx</i> <i>folK</i>	LPU83_2268	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase (EC 2.7.6.3)	H	1,03344147
	LPU83_2269	Uncharacterized protein	.	-1,59836643

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>rpsD</i>	LPU83_2271	Uncharacterized protein	R	1,28743843
	LPU83_2290	DNA translocase ftsK	L	-1,00502936
	LPU83_2291	30S ribosomal protein S4	J	-1,47904194
	LPU83_2292	Glutaminase (EC 3.5.1.2)	E	-1,3722427
	LPU83_2296	Bicyclomycin resistance protein Sulfonamide resistance protein	G	-1,3071247
<i>glsA</i>	LPU83_2299	Uncharacterized protein	.	-2,48147231
	LPU83_2320	Uncharacterized protein	S	1,09201266
	LPU83_2335	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7)	E	-1,80120672
	LPU83_2338	UPF0051 protein	O	-1,48957176
	LPU83_2339	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7)	E	-1,34474673
<i>sufD</i>	LPU83_2357	Quaternary ammonium compound-resistance protein sugE	V	-1,07339996
<i>sufS</i>	LPU83_2365	Transmembrane protein 22	GER	-1,04805683
<i>sugE</i>	LPU83_2367	Hydroxyacylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.6)	R	-1,40577179
<i>lipB</i>	LPU83_2377	Octanoyltransferase (EC 2.3.1.181) (Lipoate-protein ligase B) (Lipoyl/octanoyl transferase)	H	1,01078619
		(Octanoyl-[acyl-carrier-protein]-protein N-octanoyltransferase)		
	LPU83_2378	Uncharacterized protein	.	-1,87962238
<i>dacF3</i>	LPU83_2381	HTH-type transcriptional regulator hmR Copper efflux regulator	K	1,15201052
	LPU83_2382	Uncharacterized protein	S	-1,54330918
	LPU83_2387	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (EC 3.4.16.4)	D	-1,15593324
	LPU83_2388	Uncharacterized protein	.	-1,22910216
<i>folE</i>	LPU83_2397	GTP cyclohydrolase 1 (EC 3.5.4.16) (GTP cyclohydrolase I) (GTP-CH-I)	H	1,07162408
	LPU83_2398	Iron sulfur cluster assembly protein 1, mitochondrial Iron sulfur cluster scaffold protein 1	O	1,08521835
	LPU83_2402	Uncharacterized protein	.	-1,11026779
	LPU83_2415	Activator of HSP90 ATPase 1 family protein	.	-2,14099606
	LPU83_2423	Uncharacterized protein	R	-1,06698363
	LPU83_2430	Uncharacterized protein	R	1,60865678
	LPU83_2432	Uncharacterized protein	.	-1,93140778
	LPU83_2435	Putative macrolide-specific efflux protein macA	MV	-2,06487727
	LPU83_2436	Uncharacterized protein	M	-1,80856789
	LPU83_2437	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein potA (EC 3.6.3.31)	M	-1,93176858
<i>glmS1</i>	LPU83_2444	Uncharacterized protein	R	-1,1428401
	LPU83_2453	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] (EC 2.6.1.16) (D-fructose-6-phosphate amidotransferase) (GfAT) (Glucosamine-6-phosphate synthase) (Hexosephosphate aminotransferase) (L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase)	M	-1,30131701
		Transcription-repair-coupling factor (TRCF) (EC 3.6.4.-)	LK	-1,06718586
<i>mfd</i>	LPU83_2457	Invasion protein B Invasion-associated locus protein B	R	-1,00641509
<i>nnrE</i> , <i>nnrD</i>	LPU83_2460	Heat shock protein hspQ	O	1,29571902
	LPU83_2461	Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme (Nicotinamide nucleotide repair protein) [Includes: ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase (EC 4.2.1.136) (ADP-dependent NAD(P)HX dehydratase); NAD(P)H-hydrate epimerase (EC 5.1.99.6)]	F	2,03165257
	LPU83_2464			
<i>queA</i>	LPU83_2472	Uncharacterized protein	.	-2,88713788
	LPU83_2473	Uncharacterized protein	.	-2,28986352
	LPU83_2474	Uncharacterized protein	.	-2,28863422
	LPU83_2478	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase (EC 2.4.99.17) (Queuosine biosynthesis protein QueA)	J	-1,01215807
<i>tgt</i>	LPU83_2479	Queuine tRNA-ribosyltransferase (EC 2.4.2.29) (Guanine insertion enzyme) (tRNA-guanine transglycosylase)	J	-1,05339934
<i>ccsA</i>	LPU83_2480	Uncharacterized protein	.	1,96362286
	LPU83_2481	Putative transposase y4bF	.	1,13732525
	LPU83_2495	Gene 10 protein Gp10	R	1,46754887
	LPU83_2496	Uncharacterized protein	.	2,24932356
	LPU83_2511	Uncharacterized protein	.	-1,43746055
	LPU83_2521	Uncharacterized protein	R	1,4988573
	LPU83_2523	Uncharacterized protein	.	1,03871651
	LPU83_2524	FMN reductase	C	1,12865965
	LPU83_2527	Uncharacterized protein	.	-1,08547699
	LPU83_2528	Thiol:disulfide interchange protein dsbD (EC 1.8.1.8)	CO	-1,898448
<i>mdcF</i>	LPU83_2529	Malonate transport protein (Malonate transporter protein)	R	-1,77499599
	LPU83_2554	Uncharacterized protein	.	1,11543155
	LPU83_2561	Uncharacterized protein	D	-1,15776938
<i>lpxB</i>	LPU83_2569	<i>Lipid-A-disaccharide synthase (EC 2.4.1.182)</i>	M	-1,17084628
	LPU83_2570	Uncharacterized protein	S	-1,08877199
<i>lpxA</i>	LPU83_2571	<i>Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase (UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase) (EC 2.3.1.129)</i>	M	-1,24095311
<i>clpS1</i>	LPU83_2588	Uncharacterized protein	.	-1,32299663
	LPU83_2589	Transposase insG for insertion sequence element IS4 (Transposase is4 family protein) (Transposase is4 family protein)	.	-1,2511107
<i>cysE</i>	LPU83_2591	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS	O	1,15488442
	LPU83_2593	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 Lbc's second cousin	.	1,91286438
<i>aapQ</i>	LPU83_2595	Serine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.30)	E	1,19592471
<i>aapM</i>	LPU83_2601	General L-amino acid transport system permease protein aapQ	E	-1,24734905
<i>aapP</i>	LPU83_2602	Inner membrane amino-acid ABC transporter permease protein yhdY	E	-1,37596871
<i>afuA</i>	LPU83_2603	General L-amino acid transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.-)	E	-1,01409881
	LPU83_2628	DNA (Cytosine-5-)-methyltransferase (EC 2.1.1.37)	L	1,90678223
	LPU83_2633	tRNA-Lys	.	-1,52700402
<i>ymgE</i>	LPU83_2640	Uncharacterized protein	P	-1,3285743
	LPU83_2643	Uncharacterized protein	S	2,37457959
	LPU83_2644	Transglycosylase-associated protein	R	1,27410081
<i>adh</i>	LPU83_2649	Putative HTH-type transcriptional regulator yqhC	K	1,16533898
	LPU83_2651	Alcohol dehydrogenase (NADP+) protein (EC 1.1.1.2)	G	-1,43372801
	LPU83_2652	NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3)	C	1,17190879
<i>ndh</i>	LPU83_2656	Putative HTH-type transcriptional regulator ycfQ	K	1,9613825
	LPU83_2657	Putative MFS-type transporter ydeR	G	1,50602186
	LPU83_2661	HTH-type transcriptional regulator cueR Copper efflux regulator	K	1,47084139
<i>ompA1</i>	LPU83_2663	Uncharacterized protein	S	4,3665736
	LPU83_2664	<i>RNA polymerase sigma factor sigW Sigma-W factor</i>	K	2,59075768
	LPU83_2665	<i>Putative transmembrane anti-sigma factor</i>	K	1,89164709
<i>senC</i>	LPU83_2670	Cysteine/O-acetylserine efflux protein	E	-1,21663985
	LPU83_2696	Inner membrane lipoprotein yiaD	M	-1,02250985
	LPU83_2704	Uncharacterized protein	T	-1,50348031
<i>creA</i>	LPU83_2714	Protein SCO2, mitochondrial	O	-1,09042375
	LPU83_2717	Glutathione-dependent formaldehyde-activating, GFA	S	-1,19686835
	LPU83_2718	Protein creA	T	1,37846875
<i>lpxC</i>	LPU83_2724	<i>UDP-3-O-acetyl-N-acetylglucosamine deacetylase (UDP-3-O-acetyl-GlcNAc deacetylase) (EC 3.5.1.108)</i>	M	-1,68322721
<i>ddl</i>		<i>(UDP-3-O-[R-3-hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase)</i>		
	LPU83_2728	<i>D-alanine-D-alanine ligase (EC 6.3.2.4) (D-Ala-D-Ala ligase) (D-alanylalanine synthetase)</i>	MR	-1,33000213
	LPU83_2730	Inner membrane metabolite transport protein yhjE	GEPR	-1,76456896
	LPU83_2731	Uncharacterized protein	U	1,15322631

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>ftsW</i>	LPU83_2735	Cell division protein ftsW	D	-1,12769433
	LPU83_2744	Uncharacterized protein	.	1,01352233
<i>slt</i>	LPU83_2746	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	M	-2,11767542
<i>mltB3</i>	LPU83_2756	Membrane-bound lytic murein transglycosylase B	M	-1,26968649
<i>metF</i>	LPU83_2757	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)	E	1,08844434
	LPU83_2774	N-formylglutamate amidohydrolase	E	1,6193205
	LPU83_2776	Uncharacterized protein	P	-1,32848236
	LPU83_2784	Inner membrane ABC transporter permease protein ycjP	G	-1,18441279
	LPU83_2785	Putative ABC transporter permease protein yurN	G	-1,16822437
	LPU83_2786	Putative ABC transporter extracellular-binding protein yurO	G	-1,0210936
	LPU83_2795	Uncharacterized protein	.	1,40935026
	LPU83_2796	Uncharacterized protein	S	-1,12428443
<i>yggE</i>	LPU83_2797	tRNA-Met	.	-1,57999214
	LPU83_2798	Tyrosine recombinase xerC	LX	1,368476
	LPU83_2799	Uncharacterized protein	.	2,18424939
<i>traA</i>	LPU83_2800	Mobilisation protein	.	1,41053111
	LPU83_2801	Chromosome partitioning protein (Protein virC1)	N	1,6813955
<i>parA3</i>	LPU83_2802	Uncharacterized protein	L	-1,49288055
	LPU83_2803	DNA-binding protein HU-beta (Integration host factor subunit beta IHF-beta)	L	-1,1085597
<i>hupT</i>	LPU83_2808	Golgi apparatus protein 1 Golgi sialoglycoprotein MG-160	.	2,29592194
<i>acrF1</i>	LPU83_2809	Efflux pump membrane transporter	V	1,79932058
<i>hlyD1</i>	LPU83_2810	Putative efflux pump periplasmic linker protein sepA	MV	1,5386947
	LPU83_2812	Uncharacterized protein	L	1,22714603
<i>thuE</i>	LPU83_2819	Putative ABC transporter-binding protein DR_1438	G	2,01827468
<i>thuF</i>	LPU83_2820	Putative ABC transporter permease protein yurN	G	2,31553146
<i>thuG</i>	LPU83_2821	Putative ABC transporter permease protein yesQ	G	2,44176861
<i>thuK</i>	LPU83_2822	Alpha-glucoside transport ATP-binding protein aglK	G	2,65429469
<i>thuA</i>	LPU83_2823	Uncharacterized protein	G	2,10160151
<i>thuB</i>	LPU83_2824	Inositol 2-dehydrogenase/D-chiro-inositol 3-dehydrogenase (EC 1.1.1.18)	R	1,26376894
	LPU83_2834	Uncharacterized protein	.	2,63883245
	LPU83_2835	Uncharacterized protein	.	2,68856813
	LPU83_2836	RNA pyrophosphohydrolase (EC 3.6.1.-)	FR	3,08028648
	LPU83_2838	Uncharacterized protein	.	-1,14253677
	LPU83_2839	Uncharacterized protein	.	-2,2721904
	LPU83_2840	UPF0047 protein	H	1,45575238
	LPU83_2841	Uncharacterized protein	S	1,54760354
	LPU83_2845	Uncharacterized protein	S	1,8154937
	LPU83_2848	Uncharacterized protein	.	-1,36233269
	LPU83_2868	Aldo/keto reductase (EC 1.1.1.65)	R	1,31767447
	LPU83_2869	Uncharacterized protein	R	1,12261833
	LPU83_2886	Uncharacterized protein	S	1,04564601
	LPU83_2888	Uncharacterized protein	.	1,39886138
	LPU83_2889	Uncharacterized protein	.	1,42725745
	LPU83_2891	Uncharacterized protein	.	2,14928257
<i>aatA</i>	LPU83_2893	Aminotransferase (EC 2.6.1.-)	E	-1,2083419
	LPU83_2895	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 Inter-alpha-inhibitor heavy chain 3	S	-2,56611874
	LPU83_2896	Uncharacterized protein	M	-1,95196795
	LPU83_2897	Uncharacterized protein	G	-2,39938794
	LPU83_2899	Putative transporter ywfM	GER	-1,19316139
	LPU83_2901	Uncharacterized protein	.	-1,48782995
	LPU83_2904	Uncharacterized protein	.	1,16334671
	LPU83_2925	50S ribosomal protein L25 (General stress protein CTC)	J	-1,28257522
<i>rchY, ctc</i>	LPU83_2932	Ribosome-binding ATPase YchF	J	-1,17654593
<i>ychF</i>	LPU83_2937	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit (EC 1.10.2.2)	C	-2,00924293
<i>fbzC</i>	LPU83_2938	Cytochrome b	C	-1,79265517
<i>fbzB</i>	LPU83_2939	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit (EC 1.10.2.2)	C	-1,11975979
<i>fbzF</i>	LPU83_2940	Endonuclease/exonuclease/phosphatase	R	-1,28740143
	LPU83_2946	Uncharacterized protein	.	1,30149786
	LPU83_2979	Uncharacterized protein	.	-1,0084523
<i>hmuR</i>	LPU83_2981	TonB-dependent heme receptor A	P	5,34783792
	LPU83_2982	Uncharacterized protein	S	1,68713497
<i>luxR5</i>	LPU83_2985	Transcriptional activator protein luxR	K	1,00845056
<i>tdk</i>	LPU83_2988	Thymidine kinase (EC 2.7.1.21)	F	-1,2635553
	LPU83_3006	Putative nitrate reductase protein	S	-1,98689269
	LPU83_3007	Uncharacterized protein	.	-1,07263631
	LPU83_3010	Uncharacterized protein	K	1,28031269
	LPU83_3014	Uncharacterized protein	S	1,58053685
	LPU83_3018	Uncharacterized protein	.	-1,78660964
<i>xdhB</i>	LPU83_3026	Xanthine dehydrogenase large subunit (EC 1.1.7.1.4)	F	-1,47066104
	LPU83_3034	Cupin 2 conserved barrel domain protein	R	1,84807125
<i>tnp3</i>	LPU83_3035	Transposase for insertion sequence element IS1328	X	1,40254547
<i>lldD</i>	LPU83_3039	L-lactate dehydrogenase (Cytochrome) (EC 1.1.2.3)	CIR	-1,17432439
	LPU83_3047	Uncharacterized protein	.	-1,1705448
	LPU83_3048	Oxidoreductase (EC 1.4.3.19)	E	-1,05564136
<i>gox8</i>	LPU83_3051	Uncharacterized protein	.	1,06421851
	LPU83_3054	Putative amino-acid metabolite efflux pump	GER	-1,33949539
	LPU83_3060	Xylose transport system permease protein xylH	G	-1,0325136
<i>gguB</i>	LPU83_3062	Multiple sugar-binding periplasmic protein sbpA Sugar-binding protein A	G	-1,1105761
<i>sbpA</i>	LPU83_3064	Uncharacterized protein	.	-1,61538115
<i>xylR3</i>	LPU83_3067	Xylose repressor	KG	-2,01965941
<i>xylF</i>	LPU83_3068	D-xylose transport system substrate-binding protein (EC 3.6.3.17)	G	-1,98139881
<i>xylH</i>	LPU83_3069	Xylose transport system permease protein xylH	G	-2,16882872
<i>xylG</i>	LPU83_3070	D-xylose transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.17)	G	-1,69029188
	LPU83_3071	tRNA-Arg	.	-2,08924889
<i>icmt2</i>	LPU83_3074	Methyltransferase (EC 2.1.1.100)	O	-1,71042834
<i>cmoA</i>	LPU83_3075	Carboxy-S-adenosyl-L-methionine synthase (Cx-SAM synthase) (EC 2.1.3.-)	H	-1,35993977
	LPU83_3076	Transcriptional regulatory protein resD	TK	-2,4789458
	LPU83_3077	UPF0141 inner membrane protein	M	-3,08838685
	LPU83_3079	Uncharacterized protein	S	-2,54152962
<i>mntH3</i>	LPU83_3080	Uncharacterized protein	.	-2,30006264
	LPU83_3111	Uncharacterized protein	.	1,02234194
	LPU83_3112	Uncharacterized protein	S	1,96861368
	LPU83_3113	Probable phosphoketolase (EC 4.1.2.-)	G	2,03830931
	LPU83_3114	Putative ATP-binding cassette transporter	R	1,19517314
	LPU83_3119	Uncharacterized protein	.	1,84604203
	LPU83_3120	Sulfatase-modifying factor 1 (EC 1.8.99.-)	O	2,22006831
	LPU83_3121	Nonspecific acid phosphatase	.	1,86307714
	LPU83_3122	Uncharacterized protein	S	2,01998508

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
	LPU83_3123	Uncharacterized protein	.	1,59970461
	LPU83_3124	Uncharacterized protein	.	1,13978212
	LPU83_3125	Uncharacterized protein	.	2,20645994
	LPU83_3140	Heme-degrading monooxygenase isdG (EC 1.14.99.3)	H	3,9135942
	LPU83_3141	Uncharacterized protein	.	3,86157206
	LPU83_3142	Uncharacterized protein	.	4,13530048
	LPU83_3143	Myosin-IXb Unconventional myosin-9b	M	2,85179245
	LPU83_3144	Uncharacterized protein	.	2,17569641
<i>hmuP</i>	LPU83_3145	Hemin transport system, hemin uptake protein	H	2,07934379
<i>hmuS</i>	LPU83_3146	Hemin transport protein hmuS	P	2,73844077
<i>hmuT</i>	LPU83_3147	Vitamin B12-binding protein	P	2,77037759
<i>hmuU</i>	LPU83_3148	Putative ABC transporter permease protein MJ0087	P	2,66793304
<i>hmuV</i>	LPU83_3149	Hemin import ATP-binding protein HmuV (EC 3.6.3.-)	P	2,88621357
	LPU83_3150	Uncharacterized protein	J	1,31799904
	LPU83_3151	Uncharacterized protein	.	1,41670799
	LPU83_3167	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein potA (EC 3.6.3.31)	P	-1,23920188
	LPU83_3168	Bicarbonate transport system permease protein cmpB	P	-1,66287616
	LPU83_3171	Multidrug resistance protein mdtA Multidrug transporter mdtA	MV	1,22607999
<i>sinR</i>	LPU83_3173	Electron transport regulator A	T	-2,78216288
	LPU83_3181	Uncharacterized protein	.	2,87432324
	LPU83_3184	MscS family inner membrane protein ynaI	M	1,01684963
	LPU83_3185	Uncharacterized protein	.	3,24315636
	LPU83_3186	Uncharacterized protein	.	4,31854935
<i>ompA3</i>	LPU83_3187	Outer membrane protein A Outer membrane protein II	M	4,37437269
	LPU83_3188	Golgi apparatus protein 1 homolog	.	4,43529082
	LPU83_3189	Uncharacterized protein	.	2,76945526
<i>cya3-2</i>	LPU83_3190	Uncharacterized protein	CO	1,53816464
	LPU83_3191	Uncharacterized protein	X	4,33093208
<i>livK</i>	LPU83_3200	Leu/Ile/Val-binding protein homolog 2	E	-3,00860058
	LPU83_3201	Uncharacterized protein	.	-2,98517161
<i>braG</i>	LPU83_3202	Phosphate import ATP-binding protein pstB (EC 3.6.3.27)	E	-2,93815832
<i>braF</i>	LPU83_3203	Phosphate import ATP-binding protein pstB (EC 3.6.3.27)	E	-3,26618129
<i>livM</i>	LPU83_3204	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein braE	E	-3,20151169
<i>braD</i>	LPU83_3205	Galactoside transport system permease protein mgIC homolog	E	-2,85178511
	LPU83_3210	Uncharacterized protein	.	-1,46927432
<i>cheY5</i>	LPU83_3212	Chemotaxis protein cheY	T	-1,09434331
	LPU83_3214	Uncharacterized protein	S	-1,09670566
	LPU83_3243	Multidrug resistance protein B	G	-1,50142026
<i>ropA5</i>	LPU83_3271	Porin	.	-2,24465381
<i>APIC</i>	LPU83_3276	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	O	1,32652901
	LPU83_3288	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR (EC 1.1.1.-)	IQR	-1,77416857
	LPU83_3291	Uncharacterized protein	.	-1,19884986
	LPU83_3300	Uncharacterized protein	C	1,24622831
<i>msrB3</i>	LPU83_3303	Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase (EC 1.8.4.12)	O	-1,11123173
<i>ohr3</i>	LPU83_3305	Uncharacterized protein	V	-1,25928821
	LPU83_3308	Uncharacterized protein	.	1,41720535
<i>rpsU1</i>	LPU83_3309	30S ribosomal protein S21	J	1,27286752
	LPU83_3310	Uncharacterized protein	.	1,11255973
	LPU83_3311	Uncharacterized protein	.	3,39084231
	LPU83_3312	17 kDa surface antigen	.	1,07678057
<i>cyaO</i>	LPU83_3314	Adenylate/guanylate cyclase (EC 4.6.1.1)	T	1,5182215
	LPU83_3315	Putative acrEF/envCD operon repressor	K	-1,37600405
	LPU83_3323	Aldo-keto reductase family 1 member C1 homolog (EC 1.1.1.149)	R	1,23911882
	LPU83_3325	Probable membrane transporter protein	P	1,60422557
	LPU83_3326	Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase transcriptional activator	K	1,47523503
<i>appD</i>	LPU83_3333	Dipeptide transport ATP-binding protein dppD	EP	-1,20647956
	LPU83_3342	Lipid A export ATP-binding/permease protein msbA (EC 3.6.3.-)	V	-1,03735786
	LPU83_3343	Putative N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (EC 2.4.1.-)	G	-1,31876098
	LPU83_3346	Uncharacterized protein	.	1,49548186
	LPU83_3356	tRNA-Met	.	-1,39556105
	LPU83_3358	23S ribosomal RNA	.	-1,33976
	LPU83_3359	tRNA-Ala	.	-1,63943362
	LPU83_3360	tRNA-Ile	.	-1,51326542
	LPU83_3361	Uncharacterized protein	.	2,05873727
<i>acrA</i>	LPU83_3368	Multidrug resistance protein mdtE	MV	-1,27919621
<i>acrF5</i>	LPU83_3369	Efflux pump membrane transporter	V	-1,59897536
<i>potC</i>	LPU83_3374	Spermidine/putrescine transport system permease protein potC	E	-1,07056145
<i>ade3</i>	LPU83_3377	Adenine deaminase (Adenase) (Adenine aminase) (EC 3.5.4.2)	F	-1,08399431
	LPU83_3382	Uncharacterized protein	.	-1,06528446
	LPU83_3385	Putative signaling protein CC_0091	T	-1,64717767
<i>omp1</i>	LPU83_3386	25 kDa outer-membrane immunogenic protein	M	-1,14399883
	LPU83_3390	Uncharacterized protein	.	1,22859057
	LPU83_3398	Uncharacterized protein	.	-1,15731586
	LPU83_3402	Site-specific DNA recombinase	.	2,17575078
	LPU83_3407	Putative MFS-type transporter MJ1317	G	-3,17520184
<i>mae1</i>	LPU83_3411	Malic acid transport protein Malate permease	V	-1,0610685
	LPU83_3413	Signaling protein ykoW	T	-2,76546376
	LPU83_3414	Uncharacterized protein	T	-2,49257658
	LPU83_3415	Putative HTH-type transcriptional regulator PA4778	K	1,55922789
	LPU83_3422	Uncharacterized protein	M	-1,13128104
	LPU83_3423	Putative adhesin A11_01215	M	-1,22619257
<i>mesI, tiiS</i>	LPU83_3426	tRNA(Ile)-lysine synthase (EC 6.3.4.19) (tRNA(Ile)-2-lysyl-cytidine synthase) (tRNA(Ile)-lysidine synthetase)	J	-1,34851335
<i>ygbF, cpoB</i>	LPU83_3427	Cell division coordinator CpoB	R	-1,04590324
<i>pal</i>	LPU83_3428	Peptidoglycan-associated protein	M	-1,11291608
<i>tolB3</i>	LPU83_3429	Tol-Pal system protein TolB	U	-1,25223061
	LPU83_3437	L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase (EC 2.9.1.1)	.	-1,29493681
	LPU83_3438	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase (EC 6.3.3.2)	H	-1,10622578
	LPU83_3440	Uncharacterized protein	G	-2,0241308
	LPU83_3445	Uncharacterized protein	R	-2,30502839
<i>coxP</i>	LPU83_3448	Cytochrome c oxidase subunit III (EC 1.9.3.1)	C	1,20915084
<i>coxO</i>	LPU83_3449	Cytochrome c oxidase subunit III (EC 1.9.3.1)	C	1,16906307
<i>coxN</i>	LPU83_3450	Cytochrome c oxidase subunit I (EC 1.9.3.1)	C	1,17522229
<i>mcpA7</i>	LPU83_3454	Putative chemoreceptor y4sI Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	-1,12150978
<i>ruvC</i>	LPU83_3455	Crossover junction endonuclease RuvC (EC 3.1.22.4) (Holliday junction nuclease RuvC) (Holliday junction resolvase RuvC)	L	-1,26305981
<i>acvB</i>	LPU83_3461	Virulence factor family protein	U	-1,01614179

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>lpiA</i>	LPU83_3462	Uncharacterized protein	S	-1,17794563
<i>phzF</i>	LPU83_3475	Diaminopimelate epimerase DAP epimerase (EC 5.1.1.7)	R	-1,10210979
	LPU83_3482	Uncharacterized protein	.	-1,03368051
	LPU83_3498	Uncharacterized protein	S	1,17744076
<i>purK</i>	LPU83_3501	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase (N5-CAIR synthase) (EC 6.3.4.18) (5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthetase)	F	-1,0135155
<i>ggt</i>	LPU83_3505	Gamma-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	E	1,6087705
	LPU83_3510	HTH-type transcriptional regulator glxA	K	-1,00705454
	LPU83_3520	UPF0335 protein LPU83_3520	S	-1,36646113
	LPU83_3521	Uncharacterized protein	HR	4,136195
	LPU83_3527	Nitrate reductase catalytic subunit (EC 1.7.99.4)	C	-1,20600647
<i>exoN</i>	LPU83_3553	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9) (UDP-glucose pyrophosphorylase)	M	-1,24267376
<i>gltD</i>	LPU83_3558	Glutamate synthase subunit beta (EC 1.4.1.14)	ER	-1,44128102
	LPU83_3572	Uncharacterized protein	.	1,41178494
	LPU83_3573	Uncharacterized protein	.	1,03713304
	LPU83_3574	Uncharacterized protein	.	-1,09293489
<i>yci</i>	LPU83_3575	Uncharacterized protein	L	-1,23887523
	LPU83_3576	Uncharacterized protein	.	1,26059889
	LPU83_3577	Uncharacterized protein	S	1,68289937
	LPU83_3578	Uncharacterized protein	.	2,03497144
	LPU83_3579	Putative 52,8 kDa protein in TAR-I ttuC' 3'region ORF22	R	1,1153689
	LPU83_3580	Putative tricarboxylic transport membrane protein	S	1,62702169
	LPU83_3581	UPF0065 protein	C	1,88950039
	LPU83_3589	Uncharacterized protein	O	-1,46545441
	LPU83_3598	Alcohol dehydrogenase class-3	R	1,05542076
<i>soxG</i>	LPU83_3600	Sarcosine oxidase, subunit gamma (EC 1.5.3.1)	E	-1,6038255
<i>soxA</i>	LPU83_3601	Sarcosine oxidase, subunit alpha (EC 1.5.3.1)	E	-1,69764111
<i>soxB</i>	LPU83_3603	Sarcosine oxidase, subunit beta (EC 1.5.3.1)	E	-1,39563142
	LPU83_3619	Uncharacterized protein	Q	-1,33272891
	LPU83_3620	Putative TRAP transporter large permease protein HI0050	Q	-1,6327923
	LPU83_3634	Beta-lactamase (EC 3.5.1.46)	V	-1,45959099
	LPU83_3636	Uncharacterized protein	.	1,99953128
	LPU83_3640	Uncharacterized protein	R	-1,22330411
	LPU83_3641	Nickel/cobalt efflux system	P	-1,06537042
	LPU83_3644	Inner membrane protein yebE	S	1,16262376
	LPU83_3650	Putative signaling protein CC_0091	T	-1,16961246
<i>xyIA</i>	LPU83_3667	Xylose isomerase (EC 5.3.1.5)	G	-1,34373651
<i>xyIB</i>	LPU83_3668	Xylulose kinase (Xylulokinase) (EC 2.7.1.17)	G	-1,01413952
	LPU83_3674	UPF0053 inner membrane protein	P	1,39778192
	LPU83_3675	Phytanoyl-CoA dioxygenase (EC 1.14.11.18)	Q	-1,42844795
<i>rmrB</i>	LPU83_3677	Multidrug resistance protein B homolog	G	-3,84948409
<i>rmrA3</i>	LPU83_3678	Multidrug efflux transporter protein	V	-3,29103862
<i>rmrR</i>	LPU83_3679	Putative TetR family transcriptional regulator	K	-1,27005624
	LPU83_3682	Uncharacterized protein	.	-1,20755477
	LPU83_3685	Putative Di-and tricarboxylate transporter protein	G	1,05681632
<i>gltX1</i>	LPU83_3686	Glutamate--tRNA ligase (EC 6.1.1.17) (Glutamyl-tRNA synthetase) (GluRS)	J	-1,09437363
<i>lysS</i>	LPU83_3687	Lysine--tRNA ligase (EC 6.1.1.6) (Lysyl-tRNA synthetase) (LysRS)	J	-1,16713899
	LPU83_3688	Uncharacterized protein	.	-1,24754607
	LPU83_3695	Uncharacterized protein	.	-1,19571947
	LPU83_3697	Putative adenylate/guanylate cyclase (EC 4.6.1.2)	T	1,34278147
	LPU83_3705	Uncharacterized protein	S	-1,00709204
	LPU83_3707	Uncharacterized protein	E	1,853865
	LPU83_3710	Putative hydrolase phosphatase protein (EC 3.1.3.18)	GR	2,4629741
<i>mtlK</i>	LPU83_3711	Mannitol 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.67)	G	4,9665219
<i>snoK</i>	LPU83_3712	Sorbitol/mannitol ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.20)	G	5,01661558
<i>snoG</i>	LPU83_3713	Sorbitol/mannitol ABC transporter permease	G	5,05486021
<i>snoF</i>	LPU83_3714	Sorbitol/mannitol ABC transporter permease	G	4,60577652
<i>snoE</i>	LPU83_3715	Sorbitol/mannitol ABC transporter, substrate-binding protein	G	3,64768002
	LPU83_3720	Uncharacterized protein	.	1,09615952
	LPU83_3727	Uncharacterized protein	Q	1,09074992
	LPU83_3731	Uncharacterized protein	.	1,64286245
	LPU83_3732	Uncharacterized protein	M	1,6479338
	LPU83_3733	Glycine betaine-binding periplasmic protein	E	1,14343371
	LPU83_3738	Efflux transporter, RND family, MFP subunit	MV	1,06760153
	LPU83_3739	Uncharacterized protein	.	1,15713467
	LPU83_3740	Putative sugar ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.27)	G	2,39965974
<i>cscA</i>	LPU83_3741	Beta-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26)	G	4,10812783
	LPU83_3742	Putative ABC transporter permease protein	G	4,08818022
	LPU83_3743	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	4,1418828
	LPU83_3744	Family 1 extracellular solute-binding protein	G	3,51432375
<i>cscR</i>	LPU83_3745	LacI family transcriptional regulator	K	1,69644388
	LPU83_3746	Uncharacterized protein	R	1,08750411
	LPU83_3747	Uncharacterized protein	.	1,24306053
	LPU83_3750	Uncharacterized protein	.	1,13470208
	LPU83_3758	23S ribosomal RNA	.	-1,33200376
	LPU83_3759	tRNA-Ala	.	-1,58344603
	LPU83_3760	tRNA-Ile	.	-1,48175803
	LPU83_3769	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase (EC 1.6.99.1)	C	1,23597028
	LPU83_3776	Putative lipoprotein	.	1,4522515
<i>mutT</i>	LPU83_3785	NTP pyrophosphohydrolase protein (EC 3.6.1.-)	V	-1,02416907
	LPU83_3790	Putative polysaccharide biosynthesis associated protein	M	-1,13970207
	LPU83_3818	Uncharacterized protein	.	1,55562615
	LPU83_3824	Uncharacterized protein	.	-1,79475668
	LPU83_3826	Putative two-component response regulator protein	T	-1,31838043
	LPU83_3828	Putative conserved protein	.	-1,08414322
	LPU83_3834	Putative conserved protein	S	-1,03407958
<i>tyrC</i>	LPU83_3835	Cyclohexadienyl dehydrogenase (EC 1.3.1.12)	E	-1,06018238
<i>gloB</i>	LPU83_3838	Hydroxyacylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.6) (Glyoxalase II) (Glx II)	R	1,20780061
	LPU83_3843	Probable queuosine precursor transporter (Q precursor transporter)	S	-1,27020787
	LPU83_3844	Putative conserved protein	.	-2,32242439
	LPU83_3872	Putative conserved protein	M	-1,83260344
	LPU83_3874	Uncharacterized protein	.	-1,414778
<i>hemA</i>	LPU83_3877	5-aminolevulinic acid synthase (EC 2.3.1.37) (5-aminolevulinic acid synthase) (Delta-ALA synthase) (Delta-aminolevulinic acid synthase)	H	-1,6186223
	LPU83_3878	Carbon-monoxide dehydrogenase medium subunit (EC 1.2.99.2)	C	-1,59458534
	LPU83_3881	Putative conserved protein	.	-1,63551375
<i>cheW5</i>	LPU83_3887	Chemotaxis protein	NT	-1,27039673
	LPU83_3888	Transposase is4 family protein	.	-1,27085118

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>fdsD</i>	LPU83_3889	Formate dehydrogenase, delta subunit (EC 1.2.1.2)	.	-1,9797696
<i>fdsC</i>	LPU83_3890	Sulfur carrier protein FdhD	C	-2,00159278
<i>fdhD</i>				
<i>fdsA</i>	LPU83_3891	Formate dehydrogenase, alpha subunit (EC 1.2.1.2)	R	-2,17426029
<i>fdsG</i>	LPU83_3893	Formate dehydrogenase subunit gamma (EC 1.2.1.2)	C	-1,50522588
<i>atpC</i>	LPU83_3898	ATP synthase epsilon chain (ATP synthase F1 sector epsilon subunit) (F-ATPase epsilon subunit)	C	-1,07583689
	LPU83_3910	Putative cytochrome b561 protein	C	-2,18088584
<i>lpdA</i>	LPU83_3911	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	C	-1,07860167
	LPU83_3914	Putative conserved protein	.	-1,12455432
<i>sucB</i>	LPU83_3915	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.61) (2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E2)	C	-1,4996319
<i>sucA</i>	LPU83_3917	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.2)	C	-1,14167442
<i>sucD</i>	LPU83_3918	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase subunit alpha) (SCS-alpha)	C	-1,19919721
<i>sdhB</i>	LPU83_3923	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit (EC 1.3.5.1)	C	-2,10835433
<i>sdhA</i>	LPU83_3924	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.5.1)	C	-1,47125047
<i>sdhD</i>	LPU83_3925	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein (EC 1.3.99.1)	C	-1,67470952
<i>sdhC</i>	LPU83_3926	Succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit (EC 1.3.99.1)	C	-1,34820434
<i>hemD</i>	LPU83_3934	Uroporphyrinogen-III synthase (EC 4.2.1.75)	H	-1,19167815
	LPU83_3946	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D (EC 3.1.4.1)	P	1,66871751
	LPU83_3957	ATP-binding component of ABC transporter (EC 3.6.3.31)	R	-1,23577596
	LPU83_3958	Putative transport system permease ABC transporter protein	R	-1,24207213
	LPU83_3961	Putative conserved protein	.	-1,04327699
	LPU83_3963	Putative conserved protein	S	1,15955291
<i>tesA</i>	LPU83_3966	Acyl-CoA thioesterase protein (EC 3.1.2.-)	E	1,26288979
	LPU83_3967	Putative ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.31)	Q	1,23421851
	LPU83_3972	Putative conserved protein	S	-1,16689669
<i>acnA</i>	LPU83_3973	Aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3)	C	-1,39455144
<i>ccmC</i>	LPU83_3976	Heme exporter protein C (Cytochrome c-type biogenesis protein)	O	-1,57270533
<i>cycY</i>	LPU83_3977	Thiol:disulfide interchange protein	O	-1,17982281
	LPU83_3978	UPF0314 protein LPU83_3978	.	-1,04809722
<i>ispZ</i>	LPU83_3979	Probable intracellular septation protein A	D	-1,03220469
<i>ftsY</i>	LPU83_3980	Signal recognition particle receptor FtsY (SRP receptor)	U	-1,19911987
<i>fusA</i>	LPU83_3983	Elongation factor G (EC 3.6.5.3)	J	1,51935874
<i>tyrA</i>	LPU83_3986	Chorismate mutase (EC 5.4.99.5)	E	-1,0485064
<i>rpsP</i>	LPU83_3987	30S ribosomal protein S16	J	-1,58506546
	LPU83_3990	Putative nucleotide permease protein	FH	1,85452494
	LPU83_3996	Putative phosphohistidine phosphatase (EC 3.1.3.-)	T	-1,01049352
	LPU83_4002	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	M	-1,12895538
<i>amtB</i>	LPU83_4004	Ammonium transporter	P	-2,2147778
<i>glnK</i>	LPU83_4005	Nitrogen regulatory protein P-II	TE	-1,81498323
<i>lonD</i>	LPU83_4009	ATP-dependent protease LA 2 protein (EC 3.4.21.53)	S	1,01847679
	LPU83_4011	Putative conserved protein	S	-1,06873987
	LPU83_4012	tRNA-Gly	.	-1,24284722
	LPU83_4017	Glycerol uptake facilitator or related permease	G	1,24895378
	LPU83_4033	Uncharacterized protein	E	-1,03635052
	LPU83_4050	Putative conserved protein	IQ	-1,02572041
<i>fdxA</i>	LPU83_4061	Ferredoxin	F	-1,45551493
	LPU83_4062	Putative CarD family transcriptional regulator	K	1,22604533
	LPU83_4071	ABC transporter ATP-binding protein	R	-1,10053211
	LPU83_4072	Putative conserved protein	.	-1,95949936
	LPU83_4080	Uncharacterized protein	.	-1,68381641
	LPU83_4081	Uncharacterized protein	.	-2,32960794
<i>ispA</i>	LPU83_4090	Geranyltransferase (EC 2.5.1.10)	H	-1,42096001
	LPU83_4091	Threonine efflux protein	E	-1,70946854
	LPU83_4095	Putative amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	ET	1,33122334
<i>ndvA</i>	LPU83_4101	Beta-(1->2)glucan export ATP-binding/permease protein NdvA (EC 3.6.3.42)	V	-1,78986124
<i>leuB</i>	LPU83_4105	3-isopropylmalate dehydrogenase (EC 1.1.1.85) (3-IPM-DH) (Beta-IPM dehydrogenase) (IMDH)	CE	-1,06288993
	LPU83_4110	Putative conserved protein	.	1,34643194
	LPU83_4113	Putative conserved protein	O	1,1444416
<i>nadD</i>	LPU83_4129	Probable nicotinate-nucleotide adenyllyltransferase (EC 2.7.7.18) (Deamido-NAD(+)) diphosphorylase (Deamido-NAD(+)) pyrophosphorylase (Nicotinate mononucleotide adenyllyltransferase) (NaMN adenyllyltransferase)	H	-1,17480981
	LPU83_4139	Putative insertion sequence transposase protein	.	1,09426827
	LPU83_4143	Putative conserved protein	S	-1,40871525
	LPU83_4145	Putative conserved protein	.	1,29481088
	LPU83_4152	Putative conserved protein	.	-1,92714969
	LPU83_4157	Uncharacterized protein	.	1,13846363
	LPU83_4164	Putative conserved protein	.	1,26988717
<i>dppA3</i>	LPU83_4171	ABC transporter	E	-1,24079731
<i>dppB3</i>	LPU83_4172	ABC transporter	EP	-1,59218901
<i>dppC3</i>	LPU83_4173	ABC transporter	EP	-1,45220721
<i>dppD3</i>	LPU83_4174	ABC transporter (EC 3.6.3.-)	EP	-1,44584445
<i>dppF3</i>	LPU83_4175	ABC transporter	EP	-1,41178425
	LPU83_4176	Putative conserved protein	.	1,6178821
	LPU83_4177	Putative conserved protein	.	1,35838291
	LPU83_4178	UPF0391 membrane protein LPU83_4178	S	1,35003675
<i>ndvB</i>	LPU83_4179	Cyclic beta-1,2-glucan synthetase (EC 2.4.1.-)	G	-1,23347146
	LPU83_4194	Putative conserved protein	S	-1,01469874
	LPU83_4196	Pyridoxal phosphate homeostasis protein (PLP homeostasis protein)	R	-1,03153352
<i>leuS</i>	LPU83_4197	Leucine-tRNA ligase (EC 6.1.1.4) (Leucyl-tRNA synthetase) (LeuRS)	J	-1,36501748
	LPU83_4198	Hypothetical conserved protein	S	-1,03853473
	LPU83_4206	UPF0093 membrane protein	S	-1,66987129
<i>hemE</i>	LPU83_4207	Uroporphyrinogen decarboxylase (UPD) (URO-D) (EC 4.1.1.37)	H	-1,1886879
	LPU83_pLPU83a_0004	Uncharacterized protein	.	1,03500107
	LPU83_pLPU83a_0017	Uncharacterized protein	.	-1,40816555
	LPU83_pLPU83a_0018	Multicopper oxidase (EC 1.10.3.2)	DPM	1,39771318
	LPU83_pLPU83a_0021	Uncharacterized protein	.	-4,52789008
	LPU83_pLPU83a_0027	Uncharacterized protein	.	1,91304941
<i>cumA</i>	LPU83_pLPU83a_0028	Putative multicopper oxidase protein (EC 1.10.3.2)	DPM	3,28643382
	LPU83_pLPU83a_0029	Uncharacterized protein	S	2,98177797
<i>tlpA</i>	LPU83_pLPU83a_0030	Putative thioredoxin, thioldisulfide interchange protein	O	2,51147819
	LPU83_pLPU83a_0031	Cytochrome c oxidase Cu(A) center assembly protein	O	2,03102089
	LPU83_pLPU83a_0033	Putative transcriptional regulator, MerR family	K	1,16686017
	LPU83_pLPU83a_0039	Transposase	X	1,43728979
	LPU83_pLPU83a_0040	Transposase	X	1,18046967
	LPU83_pLPU83a_0041	Putative transposase	.	1,63628132
	LPU83_pLPU83a_0042	Transposase	.	1,32189855

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>tnpA1</i>	LPU83_pLPU83a_0051	Acyl-homoserine-lactone synthase (EC 2.3.1.184) (Autoinducer synthesis protein)	T	-1,43538285
	LPU83_pLPU83a_0059	Putative transposase protein	.	-1,39528914
	LPU83_pLPU83a_0079	Uncharacterized protein	.	2,18918922
	LPU83_pLPU83a_0086	Uncharacterized protein	.	1,19982585
<i>exoK</i>	LPU83_pLPU83a_0091	Putative transposase-related protein	X	1,67885413
	LPU83_pLPU83a_0097	Putative glycanase (EC 3.2.1.-)	G	1,56609754
<i>exoL</i>	LPU83_pLPU83a_0098	Putative glucosyltransferase protein (EC 2.-.-.-)	.	1,59049126
<i>exoA</i>	LPU83_pLPU83a_0099	Putative glycosyl transferase (EC 2.-.-.-)	G	1,19940535
	LPU83_pLPU83a_0113	DNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.7)	L	1,09883738
	LPU83_pLPU83a_0119	Uncharacterized protein	.	2,29697227
	LPU83_pLPU83a_0123	Uncharacterized protein	.	1,0219157
	LPU83_pLPU83a_0133	Uncharacterized protein	.	-1,26851228
	LPU83_pLPU83a_0134	Uncharacterized protein	.	-1,18647978
	LPU83_pLPU83a_0151	Putative conjugal transfer protein trbI (TrbI)	U	2,52534429
	LPU83_pLPU83a_0152	Putative conjugal transfer protein trbH (TrbH)	.	2,54036609
	LPU83_pLPU83a_0153	Conjugal transfer protein trbG (TrbG)	U	3,14756846
	LPU83_pLPU83a_0154	Conjugal transfer protein trbF (TrbF)	U	3,06123592
	LPU83_pLPU83a_0155	Putative conjugal transfer protein trbL (TrbL)	U	2,9159699
<i>trbK</i>	LPU83_pLPU83a_0156	Putative conjugal transfer protein TrbK	.	3,12748399
<i>trbJ</i>	LPU83_pLPU83a_0157	Putative conjugal transfer protein trbJ (TrbJ)	X	3,2473527
<i>trbE</i>	LPU83_pLPU83a_0158	Conjugal transfer protein TrbE	U	3,13868436
<i>trbD</i>	LPU83_pLPU83a_0159	Conjugal transfer protein trbD (TrbD)	U	3,33525282
<i>trbC</i>	LPU83_pLPU83a_0160	Putative conjugal transfer protein trbC (TrbC)	U	3,37835976
<i>trbB</i>	LPU83_pLPU83a_0161	Putative conjugal transfer protein trbB	UW	3,53754322
	LPU83_pLPU83b_0001	Peptide synthetase	Q	1,92202241
	LPU83_pLPU83b_0004	Resolvase domain-containing protein	L	1,55398594
	LPU83_pLPU83b_0009	Uncharacterized protein	K	-1,32303184
	LPU83_pLPU83b_0010	Transposase-related protein	X	-1,00497572
	LPU83_pLPU83b_0013	Uncharacterized protein	R	1,21520994
	LPU83_pLPU83b_0015	Uncharacterized protein	JM	1,0667426
	LPU83_pLPU83b_0018	Acetoacetyl-CoA synthetase	.	1,01442881
	LPU83_pLPU83b_0019	Uncharacterized protein	.	1,46676118
	LPU83_pLPU83b_0020	Putative transposase y4bF	.	2,32832802
	LPU83_pLPU83b_0025	Uncharacterized protein	M	1,55076546
	LPU83_pLPU83b_0030	Uncharacterized protein	.	2,0525522
	LPU83_pLPU83b_0031	Uncharacterized protein	.	1,84345339
	LPU83_pLPU83b_0034	Putative membrane protein	P	1,16428324
	LPU83_pLPU83b_0035	Nitrogen fixation protein FixI (EC 3.6.3.-)	P	1,21592471
	LPU83_pLPU83b_0038	Uncharacterized protein	.	2,08647707
	LPU83_pLPU83b_0039	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	C	1,52823339
	LPU83_pLPU83b_0040	Uncharacterized protein	C	1,31822583
	LPU83_pLPU83b_0041	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	C	1,60621886
	LPU83_pLPU83b_0043	cAMP-binding protein	T	1,32330921
	LPU83_pLPU83b_0049	Uncharacterized protein	.	1,39183563
	LPU83_pLPU83b_0051	Putative membrane protein	.	1,10370512
	LPU83_pLPU83b_0052	Uncharacterized protein	P	1,34592261
	LPU83_pLPU83b_0053	Uncharacterized protein	T	1,50669804
	LPU83_pLPU83b_0054	Peptidase S46 family protein	.	1,38860757
	LPU83_pLPU83b_0056	ROK family protein	KG	1,69742504
	LPU83_pLPU83b_0057	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase	M	1,61941314
	LPU83_pLPU83b_0059	FMN-binding negative transcriptional regulator	T	2,11378359
	LPU83_pLPU83b_0060	Uncharacterized protein	.	2,73827526
	LPU83_pLPU83b_0061	GCN5-like N-acetyltransferase	J	2,1758494
	LPU83_pLPU83b_0062	GntR family transcriptional regulator	K	1,62961335
	LPU83_pLPU83b_0063	Uncharacterized protein	.	3,47006286
	LPU83_pLPU83b_0064	Uncharacterized protein	.	3,51007932
	LPU83_pLPU83b_0065	Phosphoenolpyruvate phosphomutase	G	2,51947058
	LPU83_pLPU83b_0066	Uncharacterized protein	R	1,82386969
	LPU83_pLPU83b_0067	Uncharacterized protein	F	1,02087153
	LPU83_pLPU83b_0068	Uncharacterized protein	J	1,03175548
	LPU83_pLPU83b_0069	Uncharacterized protein	.	1,35006247
	LPU83_pLPU83b_0070	Uncharacterized protein	K	2,07172027
	LPU83_pLPU83b_0071	Uncharacterized protein	.	2,52635186
	LPU83_pLPU83b_0072	Uncharacterized protein	.	1,00852593
	LPU83_pLPU83b_0074	Putative transposase y4rJ	X	1,85147183
	LPU83_pLPU83b_0075	Putative integrase/recombinase y4qK	L	2,38390104
	LPU83_pLPU83b_0076	Putative transposase y4qJ	.	2,10442366
	LPU83_pLPU83b_0078	Uncharacterized protein	K	1,11109557
	LPU83_pLPU83b_0081	Aspartate 1-decarboxylase (EC 4.1.1.11) (Aspartate alpha-decarboxylase) [Cleaved into: Aspartate 1-decarboxylase alpha chain; Aspartate 1-decarboxylase beta chain]	H	1,65575804
	LPU83_pLPU83b_0082	Uncharacterized protein	.	1,56323656
	LPU83_pLPU83b_0085	Uncharacterized protein	.	1,19212415
	LPU83_pLPU83b_0087	Uncharacterized protein	E	1,68797658
	LPU83_pLPU83b_0098	Ti-type conjugative transfer relaxase TraA	L	1,99654158
	LPU83_pLPU83b_0099	Ti-type conjugative transfer relaxase TraA	L	3,08122122
	LPU83_pLPU83b_0100	Uncharacterized protein	L	2,47014955
	LPU83_pLPU83b_0101	TraA	.	2,29764616
	LPU83_pLPU83b_0102	Uncharacterized protein	L	1,91601256
	LPU83_pLPU83b_0103	Putative Haloacetal dehalogenase-like hydrolase (EC 3.-.-.-)	GR	1,16059229
	LPU83_pLPU83b_0104	3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA (3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase) (cAMP phosphodiesterase) (EC 3.1.4.53)	T	1,06963391
	LPU83_pLPU83b_0108	Solute-binding component of ABC transporter	G	1,32458708
	LPU83_pLPU83b_0109	Uncharacterized protein	K	1,27220049
	LPU83_pLPU83b_0110	Uncharacterized protein	.	1,69220549
	LPU83_pLPU83b_0119	Putative insertion sequence ATP-binding protein y4pL	L	1,0505828
	LPU83_pLPU83b_0121	Uncharacterized protein	.	1,44675215
	LPU83_pLPU83b_0122	Integrase catalytic subunit	.	1,76295317
	LPU83_pLPU83b_0123	DNA recombinase	.	2,61023217
	LPU83_pLPU83b_0124	Site-specific recombinase, DNA invertase Pin	L	1,62541772
	LPU83_pLPU83b_0125	Uncharacterized protein	.	2,01512234
	LPU83_pLPU83b_0126	Uncharacterized protein	.	1,63870771
<i>lpsI</i>	LPU83_pLPU83b_0127	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)	I	1,65437975
	LPU83_pLPU83b_0128	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)	I	1,59182577
<i>lpsI</i>	LPU83_pLPU83b_0129	Putative aldehyde-dehydrogenase-like protein y4uC (EC 1.2.1.-)	C	2,13281548
	LPU83_pLPU83b_0130	Putative aminotransferase y4uB (EC 2.6.1.-)	H	1,64981748
	LPU83_pLPU83b_0131	Uncharacterized protein	.	1,64623783
	LPU83_pLPU83b_0132	Putative family 20 transposase	X	1,4743126
	LPU83_pLPU83b_0138	Uncharacterized protein	.	1,03814638

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>nylB</i>	LPU83_pLPU83b_0139	Uncharacterized protein	.	1,63682702
	LPU83_pLPU83b_0140	Transposase	L	1,48605032
	LPU83_pLPU83b_0141	Uncharacterized protein	.	1,00588149
	LPU83_pLPU83b_0142	Transposase	.	1,13154885
	LPU83_pLPU83b_0143	Uncharacterized protein	.	1,26770552
	LPU83_pLPU83b_0150	Uncharacterized protein	.	2,02393403
	LPU83_pLPU83b_0151	Uncharacterized protein	R	2,01584502
	LPU83_pLPU83b_0153	Uncharacterized protein	.	2,30227467
	LPU83_pLPU83b_0154	Uncharacterized protein	.	2,01180418
	LPU83_pLPU83b_0155	6-aminohexanoate-dimer hydrolase	V	1,24031525
	LPU83_pLPU83b_0156	Putative peptide ABC transporter periplasmic-binding protein y4tO	E	1,57668878
	LPU83_pLPU83b_0157	Insertion sequence transposase	X	1,822142
	LPU83_pLPU83b_0159	Putative insertion sequence ATP-binding protein y4uH	L	1,29507646
	LPU83_pLPU83b_0162	Uncharacterized protein	.	2,22919576
	LPU83_pLPU83b_0165	Putative transposase y4rJ	X	1,49110561
	LPU83_pLPU83b_0166	Uncharacterized protein	E	1,65427127
	LPU83_pLPU83b_0167	Uncharacterized protein	M	1,55031492
	LPU83_pLPU83b_0168	Putative peptide ABC transporter ATP-binding protein y4tS	E	1,67630384
	LPU83_pLPU83b_0169	Putative peptide ABC transporter ATP-binding protein y4tR	EP	1,42338798
	LPU83_pLPU83b_0173	Putative hydrolase y4tI (EC 3.-.-.-)	R	1,08475989
	LPU83_pLPU83b_0178	Transposase	X	2,05390675
	LPU83_pLPU83b_0179	Uncharacterized protein	I	1,07168453
	LPU83_pLPU83b_0180	Uncharacterized protein	.	2,84770198
	LPU83_pLPU83b_0181	Uncharacterized protein	I	1,79458065
	LPU83_pLPU83b_0182	Uncharacterized protein	.	2,62009939
	LPU83_pLPU83b_0184	Transposase	X	2,31508831
	LPU83_pLPU83b_0185	Transposase	.	1,41699608
	LPU83_pLPU83b_0186	Uncharacterized protein	.	2,29643635
	LPU83_pLPU83b_0187	Uncharacterized protein	X	2,5658564
	LPU83_pLPU83b_0188	Uncharacterized protein	.	2,25350586
	LPU83_pLPU83b_0189	Uncharacterized protein	.	1,46711636
	LPU83_pLPU83b_0190	Resolvase domain-containing protein	.	1,59754627
	LPU83_pLPU83b_0192	Uncharacterized protein	I	1,52079938
	LPU83_pLPU83b_0193	Uncharacterized protein	.	2,45215683
	LPU83_pLPU83b_0195	Putative MFS-type transporter y4rN	.	1,35260814
	LPU83_pLPU83b_0197	Putative transposase y4qJ	.	1,35224708
	LPU83_pLPU83b_0198	Putative integrase/recombinase y4qK	L	2,65245211
	LPU83_pLPU83b_0199	Uncharacterized protein	E	1,11983428
	LPU83_pLPU83b_0200	RpiR family transcriptional regulator	K	1,19618427
	LPU83_pLPU83b_0201	Uncharacterized protein	.	1,21066173
	LPU83_pLPU83b_0204	Orf_Bo003	.	1,11604384
	LPU83_pLPU83b_0206	Diaminobutrate--2-oxoglutarate transaminase (EC 2.6.1.76) (DABA aminotransferase)	E	2,09201165
	LPU83_pLPU83b_0207	Putative peptidase y4nA (EC 3.4.21.-)	E	1,22462852
<i>hemN</i>	LPU83_pLPU83b_0209	Coproporphyrinogen-III oxidase (EC 1.3.98.3)	H	2,43897659
	LPU83_pLPU83b_0210	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase	Q	1,2293782
	LPU83_pLPU83b_0212	Uncharacterized protein	.	1,40598696
	LPU83_pLPU83b_0213	Uncharacterized protein	.	1,20673986
	LPU83_pLPU83b_0214	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase	H	1,74137726
	LPU83_pLPU83b_0215	Uncharacterized protein	K	2,4409766
	LPU83_pLPU83b_0216	Uncharacterized protein	.	2,36637578
	LPU83_pLPU83b_0217	Carbonate dehydratase (EC 4.2.1.1)	P	1,96590632
	LPU83_pLPU83b_0224	Nodulation protein D 2	K	1,44536399
	LPU83_pLPU83b_0225	Sulfatase	P	1,9713967
<i>nodD2</i>	LPU83_pLPU83b_0226	Uncharacterized protein	GR	3,13187646
	LPU83_pLPU83b_0227	Uncharacterized protein	T	3,23596998
	LPU83_pLPU83b_0228	Uncharacterized protein	.	4,54580856
	LPU83_pLPU83b_0229	Putative dioxigenase Mb3440 (EC 1.-.-.-)	Q	3,67640598
	LPU83_pLPU83b_0230	Nitrate/sulfonate/bicarbonate ABC transporter periplasmic components-like protein	P	3,69852635
	LPU83_pLPU83b_0231	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	P	3,25257698
	LPU83_pLPU83b_0232	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	P	2,88504569
	LPU83_pLPU83b_0233	Putative ABC transporter ATP-binding protein MJ0412	P	3,3154692
	LPU83_pLPU83b_0234	Uncharacterized protein	.	2,97634834
	LPU83_pLPU83b_0235	Putative transposase y4qE	X	1,35742059
	LPU83_pLPU83b_0237	Uncharacterized protein	Q	1,53286064
	LPU83_pLPU83b_0238	RNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.49)	X	1,53026966
	LPU83_pLPU83b_0239	Transposase for insertion sequence element IS1081	X	2,79153583
	LPU83_pLPU83b_0241	Phage integrase family protein	L	2,29597277
	LPU83_pLPU83b_0246	Integrase family protein	L	2,68482633
	LPU83_pLPU83b_0247	Uncharacterized protein	.	1,40717634
	LPU83_pLPU83b_0248	Uncharacterized protein	X	1,81026632
	LPU83_pLPU83b_0250	Uncharacterized protein	.	1,09528978
	LPU83_pLPU83b_0251	Uncharacterized protein	.	1,17427146
	LPU83_pLPU83b_0252	Uncharacterized protein	V	1,59540931
<i>nodM, glmS</i>	LPU83_pLPU83b_0254	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] (EC 2.6.1.16) (D-fructose-6-phosphate amidotransferase) (GFAT) (Glucosamine-6-phosphate synthase) (Hexosephosphate aminotransferase) (L-glutamine--D-fructose-6-phosphate amidotransferase)	M	1,88402537
<i>noIF</i>	LPU83_pLPU83b_0255	Nodulation protein NoIF	MV	1,75423629
<i>noIG</i>	LPU83_pLPU83b_0256	Nodulation protein NoIG	V	1,88898209
<i>nodN</i>	LPU83_pLPU83b_0257	Nodulation protein N	I	1,5613399
	LPU83_pLPU83b_0258	Uncharacterized protein	.	1,7007185
	LPU83_pLPU83b_0259	Uncharacterized protein	.	1,92754819
	LPU83_pLPU83b_0260	Uncharacterized protein	.	1,63796486
	LPU83_pLPU83b_0261	Putative IS4 family transposase	X	2,43470084
	LPU83_pLPU83b_0264	Resolvase domain protein	.	1,3858969
	LPU83_pLPU83b_0268	Uncharacterized protein	X	1,60336527
	LPU83_pLPU83b_0269	Uncharacterized protein	.	1,93082688
	LPU83_pLPU83b_0270	Putative transposase	.	1,60098428
	LPU83_pLPU83b_0271	Uncharacterized protein	F	1,56249415
	LPU83_pLPU83b_0272	Uncharacterized protein	.	1,63978144
	LPU83_pLPU83b_0273	LuxR family transcriptional regulator	K	2,03215259
	LPU83_pLPU83b_0274	Acyl-homoserine-lactone synthase (EC 2.3.1.184) (Autoinducer synthesis protein)	T	1,41904477
	LPU83_pLPU83b_0275	Uncharacterized protein	.	1,5484302
	LPU83_pLPU83b_0276	Uncharacterized protein	.	2,40300037
	LPU83_pLPU83b_0277	Glucan 1,4-alpha-glucosidase (EC 3.2.1.3)	G	1,57685885
	LPU83_pLPU83b_0278	Uncharacterized protein	.	1,25616198
	LPU83_pLPU83b_0279	FAD dependent oxidoreductase	IR	1,42520925
	LPU83_pLPU83b_0281	Uncharacterized protein	L	2,06588878
	LPU83_pLPU83b_0282	Plasmid pRI4b ORF-3-like protein	.	1,94988249

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>dnaE2-3</i> <i>dnaE2-2</i>	LPU83_pLPU83b_0284	Uncharacterized protein	.	1,97571868
	LPU83_pLPU83b_0285	Uncharacterized protein	.	1,61156819
	LPU83_pLPU83b_0286	DNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.7)	L	1,86608546
	LPU83_pLPU83b_0287	DNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.7)	L	2,0228488
<i>ligD</i>	LPU83_pLPU83b_0288	Putative nucleotidyltransferase protein	L	3,41340036
	LPU83_pLPU83b_0290	ATP-dependent DNA ligase	L	2,62818111
<i>ligD</i>	LPU83_pLPU83b_0292	ATP-dependent DNA ligase	L	2,04953337
	LPU83_pLPU83b_0293	Uncharacterized protein	.	1,51327856
<i>hspAT1</i>	LPU83_pLPU83b_0294	Uncharacterized protein	.	1,63624998
	LPU83_pLPU83b_0295	Small heat shock protein	O	1,62724135
	LPU83_pLPU83b_0296	ATP-dependent DNA ligase	L	2,42445528
	LPU83_pLPU83b_0297	Uncharacterized protein	L	2,49725196
	LPU83_pLPU83b_0298	Uncharacterized protein	L	1,29964511
	LPU83_pLPU83b_0299	Putative DNA repair protein RSKD131_1858	L	1,95755419
	LPU83_pLPU83b_0302	Exodeoxyribonuclease III	L	1,16315304
	LPU83_pLPU83b_0303	Uncharacterized protein	.	2,26603999
	LPU83_pLPU83b_0304	Uncharacterized protein	.	2,20808356
	LPU83_pLPU83b_0305	Uncharacterized protein	.	2,13177755
	LPU83_pLPU83b_0306	Uncharacterized protein	.	1,32689544
	LPU83_pLPU83b_0312	Restriction endonuclease	V	1,23097985
	LPU83_pLPU83b_0317	Uncharacterized protein	.	1,13980156
	LPU83_pLPU83b_0319	Uncharacterized protein	.	2,15874439
	LPU83_pLPU83b_0320	TniB	.	1,85764095
	LPU83_pLPU83b_0323	Replication protein B	D	1,67009746
<i>tral</i> <i>trbB</i> <i>trbC</i> <i>trbE</i> <i>trbJ</i> <i>trbL</i> <i>trbF</i> <i>trbG</i> <i>riorf121</i> <i>trbI</i> <i>traR</i> <i>traB</i> <i>traF</i> <i>traA</i> <i>traG</i>	LPU83_pLPU83b_0324	Putative replication protein A	N	1,58282912
	LPU83_pLPU83b_0325	Acyl-homoserine-lactone synthase (EC 2.3.1.184) (Autoinducer synthesis protein)	T	5,95075269
	LPU83_pLPU83b_0326	Putative conjugal transfer protein TrbB	UW	8,0259707
	LPU83_pLPU83b_0327	Conjugal transfer protein TrbC	U	10,1002628
	LPU83_pLPU83b_0328	Conjugal transfer protein TrbD	U	7,2021687
	LPU83_pLPU83b_0329	Conjugal transfer protein TrbE	U	6,55103709
	LPU83_pLPU83b_0330	Putative conjugal transfer protein TrbJ	X	6,84004147
	LPU83_pLPU83b_0331	Uncharacterized protein	.	6,27269088
	LPU83_pLPU83b_0332	Putative conjugal transfer protein TrbL	U	6,21265257
	LPU83_pLPU83b_0333	Putative conjugal transfer protein TrbF	U	7,76519556
	LPU83_pLPU83b_0334	Putative conjugal transfer protein TrbG	U	7,4607586
	LPU83_pLPU83b_0335	Conjugal transfer protein TrbH	.	8,80375035
	LPU83_pLPU83b_0336	Putative conjugal transfer protein TrbI	U	7,43200592
	LPU83_pLPU83b_0337	Putative transcriptional activator protein TraR	K	2,50686864
	LPU83_pLPU83b_0339	Uncharacterized protein	J	1,92588455
	LPU83_pLPU83b_0340	Uncharacterized protein	.	1,62168162
<i>traB</i> <i>traF</i> <i>traA</i> <i>traG</i>	LPU83_pLPU83b_0341	Uncharacterized protein	.	6,81669838
	LPU83_pLPU83b_0342	Putative conjugal transfer protein TraB	R	4,88918984
	LPU83_pLPU83b_0343	Putative conjugal transfer protein TraF	OU	6,62315676
	LPU83_pLPU83b_0344	Putative conjugal transfer protein TraA	L	6,73154353
	LPU83_pLPU83b_0345	Uncharacterized protein	.	7,43239481
	LPU83_pLPU83b_0346	Uncharacterized protein	.	7,19225705
	LPU83_pLPU83b_0347	Putative conjugal transfer protein TraG	U	6,63688928
	LPU83_pLPU83b_0348	Rcorf73	L	6,56793138
	LPU83_pLPU83b_0349	Uncharacterized protein	K	5,16239658
	LPU83_pLPU83b_0351	Uncharacterized protein	.	2,63669768
	LPU83_pLPU83b_0352	Uncharacterized protein	.	2,68400334
	LPU83_pLPU83b_0353	Uncharacterized protein	S	2,99292454
	LPU83_pLPU83b_0354	Site-specific recombinase XerD	L	1,60836823
	LPU83_pLPU83b_0355	Site-specific recombinase XerD	L	1,00078996
	LPU83_pLPU83b_0356	Putative integrase/recombinase y4rA	L	2,17491882
	LPU83_pLPU83b_0357	Uncharacterized protein	.	1,6705633
<i>sugC</i>	LPU83_pLPU83b_0358	Uncharacterized protein	KL	1,30156563
	LPU83_pLPU83b_0359	Uncharacterized protein	KL	1,09444632
	LPU83_pLPU83b_0361	Uncharacterized protein	V	1,96090661
	LPU83_pLPU83b_0362	Uncharacterized protein	.	1,56746389
	LPU83_pLPU83b_0363	Uncharacterized protein	.	2,07072665
	LPU83_pLPU83b_0364	Putative integrase/recombinase	L	1,59500073
	LPU83_pLPU83b_0365	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	G	1,08108458
	LPU83_pLPU83b_0366	Rcorf59	.	8,66250814
	LPU83_pLPU83b_0367	Uncharacterized protein	.	1,25801665
	LPU83_pLPU83b_0368	Uncharacterized protein	G	1,250475
	LPU83_pLPU83b_0369	Uncharacterized protein	G	2,51625825
	LPU83_pLPU83b_0370	Uncharacterized protein	M	2,54276517
	LPU83_pLPU83b_0371	Transcriptional regulator	K	2,37876079
	LPU83_pLPU83b_0372	Uncharacterized protein	G	2,35179874
	LPU83_pLPU83b_0373	ROK family protein	K	1,49302906
	LPU83_pLPU83b_0374	Family 1 extracellular solute-binding protein	G	1,0064972
<i>degT</i> <i>ectB</i> <i>acdS</i>	LPU83_pLPU83b_0375	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	1,36783511
	LPU83_pLPU83b_0377	Oxidoreductase domain-containing protein	R	1,06407592
	LPU83_pLPU83b_0378	Trehalose import ATP-binding protein SugC (EC 3.6.3.-)	G	1,34115876
	LPU83_pLPU83b_0380	ATPase central domain-containing protein	MDT	1,04144283
	LPU83_pLPU83b_0381	Uncharacterized protein	.	1,91217582
	LPU83_pLPU83b_0383	Uncharacterized protein	K	2,87331549
	LPU83_pLPU83b_0386	Uncharacterized protein	I	2,04536673
	LPU83_pLPU83b_0387	Putative membrane protein	.	1,97845784
	LPU83_pLPU83b_0388	Uncharacterized protein	R	1,24127001
	LPU83_pLPU83b_0389	Oxidoreductase domain-containing protein	R	1,26803113
	LPU83_pLPU83b_0390	Uncharacterized protein	C	1,08430913
	LPU83_pLPU83b_0393	Uncharacterized protein	M	1,27550243
	LPU83_pLPU83b_0394	Pleiotropic regulatory protein	M	1,3586509
	LPU83_pLPU83b_0395	Uncharacterized protein	R	1,04805372
	LPU83_pLPU83b_0396	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase (EC 2.6.1.76) (DABA aminotransferase)	E	1,41106
	LPU83_pLPU83b_0397	Cell filamentation protein	.	1,28541423
<i>acdS</i>	LPU83_pLPU83b_0398	Putative cell filamentation protein	T	1,34008048
	LPU83_pLPU83b_0401	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) (ACCD) (EC 3.5.99.7)	E	3,08917851
	LPU83_pLPU83b_0404	Uncharacterized protein	R	1,48868933
	LPU83_pLPU83b_0409	Antirestriction protein	L	2,16735955
	LPU83_pLPU83b_0411	Uncharacterized protein	X	1,83857671
	LPU83_pLPU83b_0412	Uncharacterized protein	.	1,903663
	LPU83_pLPU83b_0413	Uncharacterized protein	.	1,0649197
	LPU83_pLPU83b_0414	Uncharacterized protein	.	1,29153238
	LPU83_pLPU83b_0415	GntR family transcriptional regulator	K	1,04995829
	LPU83_pLPU83b_0417	Hydrolase	HR	1,08441828

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
aldA	LPU83_pLPU83b_0418	Flavin monooxygenase/reductase	C	1,21178499
	LPU83_pLPU83b_0419	Monooxygenase	HR	1,21122524
	LPU83_pLPU83b_0420	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	C	1,18505478
	LPU83_pLPU83b_0421	Uncharacterized protein	.	1,22831194
	LPU83_pLPU83b_0423	Polyamine ABC transporter permease	E	1,14733751
gabD	LPU83_pLPU83b_0425	ABC transporter protein	E	1,02494541
	LPU83_pLPU83b_0426	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD (EC 1.2.1.79)	C	1,20864178
	LPU83_pLPU83b_0428	Uncharacterized protein	.	1,88748514
	LPU83_pLPU83b_0434	Uncharacterized protein	K	1,11007466
	LPU83_pLPU83b_0435	Transcriptional regulator (Activator) protein, AsnC/GntR family	K	1,03120449
	LPU83_pLPU83b_0439	Uncharacterized protein	.	1,22382431
	LPU83_pLPU83b_0441	Aliphatic nitrilase (EC 3.5.5.7)	R	1,62125997
	LPU83_pLPU83b_0442	Endoribonuclease L-PSF	V	1,8801356
	LPU83_pLPU83b_0443	LysR family transcriptional regulator	K	1,56501625
	LPU83_pLPU83b_0444	Cysteine desulfurase	E	3,13859537
	LPU83_pLPU83b_0445	Uncharacterized protein	.	1,22512607
	LPU83_pLPU83b_0447	Cytochrome P450-family protein	QV	1,84121269
	LPU83_pLPU83b_0451	Uncharacterized protein	.	1,9490608
	LPU83_pLPU83b_0452	Uncharacterized protein	.	2,04148441
	LPU83_pLPU83b_0454	Uncharacterized protein	.	1,8161793
cyp117A2	LPU83_pLPU83b_0455	Uncharacterized protein	.	1,26012337
	LPU83_pLPU83b_0456	Putative farnesyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.10)	H	1,80980981
	LPU83_pLPU83b_0457	Cytochrome P450 BJ-4 homolog (EC 1.14.14.-)	QV	3,30547871
	LPU83_pLPU83b_0458	Putative short-chain type dehydrogenase/reductase blr2146 (EC 1.-.-.-)	IQR	3,87971336
	LPU83_pLPU83b_0459	Cytochrome P450 BJ-3 homolog (EC 1.14.14.-)	C	3,31650442
cyp112A2	LPU83_pLPU83b_0460	Cytochrome P450 BJ-1 homolog (EC 1.14.14.-)	QV	4,00461262
	LPU83_pLPU83b_0465	Efflux transporter, RND family, MFP subunit	MV	1,50345063
	LPU83_pLPU83b_0466	RND efflux system outer membrane lipoprotein	M	1,54958217
	LPU83_pLPU83b_0467	Uncharacterized protein	.	1,53912777
	LPU83_pLPU83b_0468	Uncharacterized protein	.	1,94516254
cyp127A1	LPU83_pLPU83b_0473	Uncharacterized protein	.	1,6072406
	LPU83_pLPU83b_0474	Putative sugar ABC transporter, sugar-binding protein	G	1,3190184
	LPU83_pLPU83b_0475	Uncharacterized protein	X	1,30150519
	LPU83_pLPU83b_0476	Putative cytochrome P450 127A1 (EC 1.14.14.-)	QV	1,65514665
	LPU83_pLPU83b_0477	Uncharacterized protein	.	4,18452922
	LPU83_pLPU83b_0480	C4-dicarboxylate transport protein	C	1,60481364
	LPU83_pLPU83b_0481	Protein NifQ homolog	.	1,09931492
	LPU83_pLPU83b_0484	Cysteine desulfurase [EC 2.8.1.7] (Nitrogenase metallocusters biosynthesis protein NifS)	E	1,01744179
	LPU83_pLPU83b_0485	Uncharacterized protein	.	1,43729577
	LPU83_pLPU83b_0486	Nitrogenase-stabilizing/protective protein NifW	.	1,25581175
nifQ	LPU83_pLPU83b_0491	Nif-specific regulatory protein	KT	1,47741586
nifS	LPU83_pLPU83b_0492	FeMo cofactor biosynthesis protein NifB	R	1,20984001
nifW	LPU83_pLPU83b_0493	Uncharacterized protein	C	1,26489283
nifA	LPU83_pLPU83b_0495	Uncharacterized protein	Q	1,16795549
nifB	LPU83_pLPU83b_0497	Nodulation protein A (EC 2.3.1.-)	.	1,75368165
nodA	LPU83_pLPU83b_0498	Chitoooligosaccharide deacetylase (EC 3.5.1.-) (NodB)	GM	1,56957456
nodB	LPU83_pLPU83b_0500	Nod factor export ATP-binding protein I (EC 3.6.3.-) (Nodulation ATP-binding protein I)	V	1,21365929
nodI	LPU83_pLPU83b_0502	Multifunctional fusion protein [Includes: Sulfate adenyllyltransferase subunit 1 (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurylase large subunit) (Sulfate adenylate transferase) (SAT); Adenyllyl-sulfate kinase (EC 2.7.1.25) (APS kinase) (ATP adenosine-5'-phosphosulfate 3'-phosphotransferase) (Adenosine-5'-phosphosulfate kinase)]	P	1,91943762
nodQ				
cysC				
nodP	LPU83_pLPU83b_0503	Sulfate adenyllyltransferase subunit 2 (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurylase small subunit) (Sulfate adenylate transferase) (SAT)	EH	2,5453386
cysD				
nodG	LPU83_pLPU83b_0504	NodG	.	3,87523712
nodE	LPU83_pLPU83b_0505	NodE (Nodulation protein E) (EC 2.3.1.-)	IQ	1,73051839
nodF	LPU83_pLPU83b_0506	NodF	IQ	1,74272047
	LPU83_pLPU83b_0507	Uncharacterized protein	.	1,26760647
	LPU83_pLPU83b_0509	Uncharacterized protein	.	1,19268763
	LPU83_pLPU83b_0511	Putative insertion sequence ATP-binding protein y4bM/y4kl/y4tA	L	2,83894058
	LPU83_pLPU83b_0512	Putative transposase y4bL/y4kl/y4tB	X	1,84771922
	LPU83_pLPU83b_0513	Putative transposase y4bL/y4kl/y4tB	K	2,14328525
	LPU83_pLPU83b_0514	Transposase IS116/IS110/IS902 family protein	X	1,86765852
	LPU83_pLPU83b_0518	Uncharacterized protein	.	1,45515368
	LPU83_pLPU83b_0519	IstB domain-containing protein ATP-binding protein	L	1,51481555
	LPU83_pLPU83b_0522	Putative outer-membrane protein y4mB	M	2,04725816
	LPU83_pLPU83b_0523	Uncharacterized protein	Q	1,1187488
	LPU83_pLPU83b_0524	Transposase	.	2,7909045
	LPU83_pLPU83b_0525	Uncharacterized protein	.	2,56228836
	LPU83_pLPU83b_0526	Uncharacterized protein	.	3,73612455
	LPU83_pLPU83b_0527	Uncharacterized protein	X	2,34719736
	LPU83_pLPU83b_0528	Uncharacterized protein	HR	3,72903814
	LPU83_pLPU83b_0529	Flavin reductase domain-containing FMN-binding protein	C	3,88893345
	LPU83_pLPU83b_0530	Transposase IS3/IS911 family protein	X	4,27348877
	LPU83_pLPU83b_0531	Transposase IS3/IS911 family protein	.	4,09072865
noeB	LPU83_pLPU83b_0532	Nodulation protein NoeB	.	1,54200758
noeA	LPU83_pLPU83b_0533	Nodulation protein NoeA	J	1,38127946
	LPU83_pLPU83b_0534	Putative membrane protein	.	1,51795328
	LPU83_pLPU83b_0536	Flavin reductase domain-containing protein	C	1,27411691
	LPU83_pLPU83b_0537	Uncharacterized protein	.	1,76600733
	LPU83_pLPU83b_0539	Putative zinc protease y4wA (EC 3.4.24.-)	R	1,44691589
	LPU83_pLPU83b_0540	Putative zinc protease-like protein y4wB	R	1,78518355
	LPU83_pLPU83b_0543	Uncharacterized protein	X	1,50976648
	LPU83_pLPU83b_0544	IS66 Orf2 family protein	X	1,8900366
	LPU83_pLPU83b_0546	Uncharacterized protein	.	1,69931784
	LPU83_pLPU83b_0547	Uncharacterized protein	H	2,17347644
	LPU83_pLPU83b_0548	MATE efflux family protein	V	2,52105484
	LPU83_pLPU83b_0549	Amino acid adenylation protein	Q	1,42865838
	LPU83_pLPU83b_0550	Putative membrane protein	.	1,26424355
nifE	LPU83_pLPU83b_0556	Nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifE	P	1,19881811
nifD1	LPU83_pLPU83b_0558	Nitrogenase protein alpha chain (EC 1.18.6.1)	P	1,5107103
	LPU83_pLPU83b_0560	Uncharacterized protein	HR	1,92424337
	LPU83_pLPU83b_0561	Uncharacterized protein	.	1,27873824
	LPU83_pLPU83b_0562	Transposase	X	1,48518948
	LPU83_pLPU83b_0563	Uncharacterized protein	.	1,61391137
	LPU83_pLPU83b_0565	Peptide synthetase	Q	1,13864559
	LPU83_pLPU83b_0566	Uncharacterized protein	L	1,51713227
	LPU83_pLPU83b_0567	Putative integrase/recombinase y4rB	L	1,6767137
	LPU83_pLPU83b_0568	Uncharacterized protein	.	1,79051142

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>cspA1</i>	LPU83_pLPU83b_0569	Uncharacterized protein	.	1,5183756
	LPU83_pLPU83b_0570	Putative SOS response-associated peptidase (EC 3.4.-.-)	O	2,10656586
	LPU83_pLPU83b_0571	Uncharacterized protein	.	1,39625996
	LPU83_pLPU83b_0572	Uncharacterized protein	E	2,27674516
	LPU83_pLPU83b_0573	Type 11 methyltransferase	QR	1,02565594
	LPU83_pLPU83b_0576	Glyoxalase family protein	ER	2,45821467
	LPU83_pLPU83b_0578	Uncharacterized protein	.	2,35313707
	LPU83_pLPU83b_0580	GntR family transcriptional regulator	KE	1,74710051
	LPU83_pLPU83b_0581	Uncharacterized protein	.	2,63146127
	LPU83_pLPU83b_0582	Uncharacterized protein	.	2,03093498
<i>fabF</i>	LPU83_pLPU83c_0006	Putative cold shock protein y4cH	K	-1,16675701
	LPU83_pLPU83c_0013	Putative oxidoreductase yusZ (EC 1.-.-.-)	R	1,05481375
	LPU83_pLPU83c_0025	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 (EC 2.3.1.179)	IQ	-1,07691014
	LPU83_pLPU83c_0034	Uncharacterized protein	.	1,55818289
	LPU83_pLPU83c_0035	Uncharacterized protein	C	1,36069233
	LPU83_pLPU83c_0056	Uncharacterized protein	.	-1,81097911
	LPU83_pLPU83c_0061	Uncharacterized protein	S	-2,28880369
	LPU83_pLPU83c_0062	UPF0276 protein LPU83_pLPU83c_0062	S	-1,05762663
	LPU83_pLPU83c_0063	Uncharacterized protein	.	-1,06233767
	LPU83_pLPU83c_0064	Uncharacterized protein	S	-1,03201037
<i>opgC</i>	LPU83_pLPU83c_0065	Uncharacterized protein	S	-1,18180277
	LPU83_pLPU83c_0070	Uncharacterized protein	.	-2,40740495
	LPU83_pLPU83c_0071	46 kDa membrane protein	P	-1,47423907
	LPU83_pLPU83c_0072	Uncharacterized protein	.	1,77230413
	LPU83_pLPU83c_0087	Uncharacterized protein	.	1,54894376
	LPU83_pLPU83c_0100	Uncharacterized protein	C	1,24080977
	LPU83_pLPU83c_0127	Protein tyrosine phosphatase	R	-1,33224959
	LPU83_pLPU83c_0133	Uncharacterized protein	GER	-1,56945122
	LPU83_pLPU83c_0135	Sulfonate/nitrate/taurine transport system substrate-binding protein	P	-2,83641925
	LPU83_pLPU83c_0136	Putative ABC transporter ATP-binding protein MJ0412	P	-2,76618843
<i>soxA1</i>	LPU83_pLPU83c_0137	Putative ABC transporter permease protein ytlD	P	-1,70776439
	LPU83_pLPU83c_0150	Uncharacterized protein	.	-2,53357285
	LPU83_pLPU83c_0154	OpgC protein	S	-2,42595474
	LPU83_pLPU83c_0155	Uncharacterized protein	.	-1,18773296
	LPU83_pLPU83c_0158	Uncharacterized protein	.	-1,42963696
	LPU83_pLPU83c_0161	Uncharacterized protein	G	-1,62653073
	LPU83_pLPU83c_0165	Uncharacterized protein	HR	1,00059954
	LPU83_pLPU83c_0166	Simple sugar transport system permease protein (EC 3.6.3.17)	G	1,2569708
	LPU83_pLPU83c_0167	Ribose transport system permease protein rbsC	G	1,71331648
	LPU83_pLPU83c_0168	Simple sugar transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.17)	G	1,47336374
<i>potG</i>	LPU83_pLPU83c_0169	Simple sugar transport system substrate-binding protein	G	1,6427232
	LPU83_pLPU83c_0173	Dibenzothiophene desulfurization enzyme C DBT sulfur dioxygenase	I	1,71871094
	LPU83_pLPU83c_0174	FMNH2-dependent monooxygenase protein (EC 1.1.-.-)	I	1,33879001
	LPU83_pLPU83c_0180	Uncharacterized protein	R	-1,04086308
	LPU83_pLPU83c_0181	Putrescine transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.31)	E	-1,85363648
	LPU83_pLPU83c_0182	Spermidine/putrescine transport system permease protein potC	E	-2,3224085
	LPU83_pLPU83c_0183	Putrescine transport system permease protein poH	E	-2,61385832
	LPU83_pLPU83c_0184	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein 2 SPBP	E	-2,17170699
	LPU83_pLPU83c_0208	Putative ABC transporter permease protein y4oQ	G	1,11078666
	LPU83_pLPU83c_0209	Multiple sugar transport system substrate-binding protein	G	2,23197926
<i>potC</i>	LPU83_pLPU83c_0210	Uncharacterized protein	.	1,86485417
	LPU83_pLPU83c_0213	Putative ABC transporter permease protein yufP	R	-1,38066329
	LPU83_pLPU83c_0219	Arylsulfatase (EC 3.1.6.1)	P	1,16423958
	LPU83_pLPU83c_0220	Uncharacterized protein	.	1,36309458
	LPU83_pLPU83c_0221	Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5)	HR	1,54552966
	LPU83_pLPU83c_0222	Uncharacterized protein	.	-1,18890755
	LPU83_pLPU83c_0224	Acyl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	I	1,01442635
	LPU83_pLPU83c_0226	Luciferase family protein (EC 1.14.-.-)	HR	1,17318944
	LPU83_pLPU83c_0227	Putative ABC transporter peptide-binding protein BRA0409	E	1,65840794
	LPU83_pLPU83c_0228	Putative peptide transport system permease protein BMEI0209	EP	1,29255628
<i>oppD</i>	LPU83_pLPU83c_0229	Oligopeptide transport system permease protein appC	EP	1,58679538
	LPU83_pLPU83c_0230	Putative peptide import ATP-binding protein BRA1094 (EC 3.6.3.-)	EP	1,37581501
	LPU83_pLPU83c_0231	Aldo/keto reductase (EC 1.-.-.-)	R	1,07279893
	LPU83_pLPU83c_0232	Dibenzothiophene desulfurization enzyme C DBT sulfur dioxygenase	I	1,41453333
	LPU83_pLPU83c_0244	Sulfonate/nitrate/taurine transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.25)	P	1,35407389
	LPU83_pLPU83c_0246	Putative aliphatic sulfonates transport permease protein ssuC	P	1,00576825
	LPU83_pLPU83c_0249	Uncharacterized protein	.	1,63193668
	LPU83_pLPU83c_0250	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR (EC 1.1.-.-)	IQR	1,59763137
	LPU83_pLPU83c_0263	Uncharacterized protein	.	1,01194404
	LPU83_pLPU83c_0266	Uncharacterized protein	J	1,21260418
<i>acd1</i>	LPU83_pLPU83c_0270	Bicyclomycin resistance protein Sulfonamide resistance protein	G	1,91012964
	LPU83_pLPU83c_0271	Aldo/keto reductase (EC 1.1.1.-)	R	3,66153825
	LPU83_pLPU83c_0289	Uncharacterized protein	.	1,93869991
	LPU83_pLPU83c_0290	Uncharacterized protein	.	1,68927923
	LPU83_pLPU83c_0293	Arylsulfatase (EC 3.1.6.1)	P	3,17146391
	LPU83_pLPU83c_0294	Uncharacterized protein	.	2,27647022
	LPU83_pLPU83c_0295	Uncharacterized protein	.	1,75515252
	LPU83_pLPU83c_0296	Uncharacterized protein	M	1,63210963
	LPU83_pLPU83c_0297	Uncharacterized protein	.	1,38913971
	LPU83_pLPU83c_0300	Uncharacterized protein	.	1,89255695
<i>arsA2</i>	LPU83_pLPU83c_0301	NapD-like protein	E	1,78070905
	LPU83_pLPU83c_0302	Sulfatase (EC 3.1.6.8)	P	2,53135017
	LPU83_pLPU83c_0303	Sensor protein fixL (EC 2.7.13.3)	T	1,12659901
	LPU83_pLPU83c_0304	Transcriptional regulatory protein fixJ	TK	1,43031541
	LPU83_pLPU83c_0305	Transcriptional regulatory protein fixJ	TK	1,65689087
	LPU83_pLPU83c_0306	Uncharacterized protein	.	2,23187936
	LPU83_pLPU83c_0314	Aldo/keto reductase	R	1,62963837
	LPU83_pLPU83c_0315	Putative oxidoreductase SSP0419	C	1,30279307
	LPU83_pLPU83c_0320	Putative plasmid stability protein y4jI	V	-1,53893121
	LPU83_pLPU83c_0322	Uncharacterized protein	.	1,108882
<i>ssuA3</i>	LPU83_pLPU83c_0324	Putative transposase	X	-1,57782296
	LPU83_pLPU83c_0332	Uncharacterized protein	S	-1,91311925
	LPU83_pLPU83c_0333	Uncharacterized protein	S	-1,97450818
	LPU83_pLPU83c_0335	Putative aliphatic sulfonates-binding protein	P	1,92443723
	LPU83_pLPU83c_0347	Uncharacterized protein	.	1,3023219
	LPU83_pLPU83c_0348	Uncharacterized protein	R	2,08098437
	LPU83_pLPU83c_0349	Uncharacterized protein	S	2,79433851
	LPU83_pLPU83c_0372	Uncharacterized protein	C	1,83278979

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
	LPU83_pLPU83c_0373	Uncharacterized protein	NW	1,69067499
	LPU83_pLPU83c_0374	Uncharacterized protein	.	1,41924567
	LPU83_pLPU83c_0376	Uncharacterized protein	.	1,95125174
	LPU83_pLPU83c_0377	Uncharacterized protein	.	1,87434155
	LPU83_pLPU83c_0378	Uncharacterized protein	.	2,19573517
	LPU83_pLPU83c_0379	Uncharacterized protein	R	2,31312742
	LPU83_pLPU83c_0380	Sulphate transporter	P	1,63639593
	LPU83_pLPU83c_0382	Putative mscS family protein ybiO	M	2,68926422
	LPU83_pLPU83c_0384	Uncharacterized protein	.	4,441867
	LPU83_pLPU83c_0385	Inner membrane protein yiaV	V	4,03316626
	LPU83_pLPU83c_0386	Ion transport 2 domain protein	.	2,98295015
	LPU83_pLPU83c_0387	Ca(2+)/H(+) antiporter	P	2,89721735
	LPU83_pLPU83c_0397	Lectin-like protein BA14k	.	-1,41181308
	LPU83_pLPU83c_0403	Uncharacterized protein	.	1,88397731
	LPU83_pLPU83c_0404	Uncharacterized protein	.	1,4491454
<i>livG</i>	LPU83_pLPU83c_0412	Branched-chain amino acid transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.30)	E	-1,51665495
<i>livF</i>	LPU83_pLPU83c_0413	Branched-chain amino acid transport system ATP-binding protein (EC 3.6.3.-)	E	-1,24250485
	LPU83_pLPU83c_0414	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein braD	E	-1,52458349
<i>braE</i>	LPU83_pLPU83c_0415	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein braE	E	-1,31597578
<i>gpuA</i>	LPU83_pLPU83c_0428	Agmatinase (EC 3.5.3.11)	E	1,27678553
<i>dsdC</i>	LPU83_pLPU83c_0440	Glycine cleavage system transcriptional activator Gcv operon activator	K	1,01865595
	LPU83_pLPU83c_0444	Polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit	E	-1,07582615
	LPU83_pLPU83c_0445	Putative amino-acid ABC transporter permease protein yckA	E	-1,27219882
	LPU83_pLPU83c_0483	Uncharacterized protein	F	1,63572222
<i>pvdP</i>	LPU83_pLPU83c_0484	Uncharacterized protein	.	1,32058138
	LPU83_pLPU83c_0486	Uncharacterized protein	.	1,55011453
	LPU83_pLPU83c_0490	Uncharacterized protein	S	1,439876
	LPU83_pLPU83c_0493	Uncharacterized protein	.	1,20954066
<i>mctP</i>	LPU83_pLPU83c_0502	Solute:Na+ symporter, SSS family	E	-2,29922269
	LPU83_pLPU83c_0503	Uncharacterized protein	.	-2,41410304
<i>dppB</i>	LPU83_pLPU83c_0509	Putative D,D-dipeptide transport system permease protein dppB	EP	-1,03989916
<i>kdgD</i>	LPU83_pLPU83c_0513	Probable 5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase (EC 4.2.1.41) (5-keto-4-deoxy-glucarate dehydratase) (KGDH)	EM	-1,39587761
	LPU83_pLPU83c_0519	Uncharacterized protein	.	1,41258379
	LPU83_pLPU83c_0538	Uncharacterized protein	S	-1,12536646
	LPU83_pLPU83c_0547	Putative short-chain type dehydrogenase/reductase vdcI (EC 1.-.-.-)	R	-1,39450108
	LPU83_pLPU83c_0555	Uncharacterized protein	.	1,64475058
	LPU83_pLPU83c_0556	Uncharacterized protein	.	2,36887332
	LPU83_pLPU83c_0565	Uncharacterized protein	.	2,06800187
	LPU83_pLPU83c_0567	Uncharacterized protein	.	1,15799639
<i>cyaH5</i>	LPU83_pLPU83c_0568	Adenylate/guanylate cyclase (EC 4.6.1.1)	T	1,35932328
	LPU83_pLPU83c_0570	Uncharacterized protein	.	1,32325081
	LPU83_pLPU83c_0571	DNA polymerase LigD, ligase domain protein (EC 6.5.1.1)	L	1,53390097
	LPU83_pLPU83c_0572	Uncharacterized protein	.	1,21808327
	LPU83_pLPU83c_0574	Uncharacterized protein	.	1,20348138
	LPU83_pLPU83c_0584	Uncharacterized protein	.	1,50185449
	LPU83_pLPU83c_0595	Uncharacterized protein	.	1,41131098
	LPU83_pLPU83c_0597	Uncharacterized protein	S	1,32494783
	LPU83_pLPU83c_0598	Uncharacterized protein	.	1,45973877
	LPU83_pLPU83c_0605	Uncharacterized protein	K	-1,81259424
<i>parA</i>	LPU83_pLPU83c_0606	Chromosome partitioning protein (Protein virC1)	N	1,30380359
<i>traA</i>	LPU83_pLPU83c_0607	Uncharacterized protein	.	1,6835053
	LPU83_pLPU83c_0624	Glycoside hydrolase 15-related	G	1,98461452
	LPU83_pLPU83c_0626	Micrococcal nuclease (Thermonuclease)	.	1,00714536
	LPU83_pLPU83c_0627	Uncharacterized protein	.	2,92283986
	LPU83_pLPU83c_0629	Putative HTH-type transcriptional regulator Smed_0045	K	1,36191194
	LPU83_pLPU83c_0631	Autoinducer synthesis protein	T	2,36795108
	LPU83_pLPU83c_0634	Uncharacterized protein	.	1,36179008
	LPU83_pLPU83c_0636	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	P	1,49827542
<i>adi</i>	LPU83_pLPU83c_0639	Arginine decarboxylase (EC 4.1.1.19)	E	1,24687015
	LPU83_pLPU83c_0640	Putative transporter blt3476	R	1,07990096
	LPU83_pLPU83c_0643	Uncharacterized protein	.	1,47835707
<i>cspA5</i>	LPU83_pLPU83c_0645	Cold shock protein	K	1,14292858
<i>rcdB</i>	LPU83_pLPU83c_0650	Uncharacterized protein	V	1,5998288
<i>rcdA</i>	LPU83_pLPU83c_0651	Cellulose synthase (UDP-forming) (EC 2.4.1.12)	N	1,22152579
<i>TRM5</i>	LPU83_pLPU83c_0652	Transposase for insertion sequence element ISRM5	X	1,89430921
	LPU83_pLPU83c_0653	Uncharacterized protein	R	1,20043788
	LPU83_pLPU83c_0660	Putative transposase y4bF	.	1,42542174
	LPU83_pLPU83c_0664	Putative transposase y4bF	X	1,37324337
	LPU83_pLPU83c_0666	Putative transposase y4bF	X	1,3135916
	LPU83_pLPU83c_0676	Putrescine transport system permease protein potI	E	-1,15005929
	LPU83_pLPU83c_0677	Spermidine/putrescine transport system permease protein potB	E	-1,30323258
	LPU83_pLPU83c_0683	Putative membrane protein	S	1,92161514
<i>tnp3</i>	LPU83_pLPU83c_0687	Transposase	X	1,31414704
<i>glxB</i>	LPU83_pLPU83c_0691	Amidophosphoribosyl transferase protein (EC 2.4.2.-)	E	-1,20266204
<i>glnT</i>	LPU83_pLPU83c_0694	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	E	-1,278852
<i>purU</i>	LPU83_pLPU83c_0695	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10) (Formyl-FH(4) hydrolase)	F	-1,77015191
<i>folD</i>	LPU83_pLPU83c_0696	Bifunctional protein FolD [Includes: Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (EC 3.5.4.9); Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (EC 1.5.1.5)]	H	-1,14637376
	LPU83_pLPU83c_0697	Aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10)	E	-1,47300295
	LPU83_pLPU83c_0698	Uncharacterized protein	.	-1,85013372
<i>vanB</i>	LPU83_pLPU83c_0699	Ferredoxin protein (EC 1.14.13.-)	C	-1,39058219
	LPU83_pLPU83c_0701	Dimethylaniline monooxygenase (N-oxide forming) (EC 1.14.13.8)	P	-1,42821046
<i>tktB</i>	LPU83_pLPU83c_0739	Transketolase (EC 2.2.1.1)	G	-1,14814228
	LPU83_pLPU83c_0757	Uncharacterized protein	.	1,43959771
	LPU83_pLPU83c_0767	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	I	1,13673903
	LPU83_pLPU83c_0775	Isopenicillin-N N-acyltransferase (EC 2.3.1.164)	.	1,3862374
	LPU83_pLPU83c_0783	Uncharacterized protein	.	1,15398396
	LPU83_pLPU83d_0013	Permease component of ABC-type sugar transporter	G	2,12787015
	LPU83_pLPU83d_0028	7-keto-8-aminopelargonate synthetase-like enzyme	H	1,68988063
<i>bioB</i>	LPU83_pLPU83d_0029	Biotin synthase (EC 2.8.1.6)	H	1,57997867
	LPU83_pLPU83d_0040	Transcriptional regulator	K	-1,7540038
<i>mmsB</i>	LPU83_pLPU83d_0043	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBADH) (EC 1.1.1.31)	I	1,37256072
<i>ampC</i>	LPU83_pLPU83d_0054	Beta-lactamase (EC 3.5.2.6)	V	-3,51249803
	LPU83_pLPU83d_0057	Putative D-xylulose reductase (EC 1.1.1.9)	ER	1,20600415
	LPU83_pLPU83d_0059	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA component (Ntr-type)	GT	1,78760508
	LPU83_pLPU83d_0076	Uncharacterized protein	V	1,04454991
	LPU83_pLPU83d_0077	Uncharacterized protein	V	1,16287646

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>pcaF</i>	LPU83_pLPU83d_0098	Uncharacterized protein	.	1,53192538
	LPU83_pLPU83d_0099	Putative membrane protein	.	1,38487493
	LPU83_pLPU83d_0104	Beta-ketoadipyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.174)	I	-1,01080649
	LPU83_pLPU83d_0105	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)	I	-1,29141738
<i>catI</i>	LPU83_pLPU83d_0106	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)	I	-1,56898025
	LPU83_pLPU83d_0128	Family 3 adenylate cyclase	T	1,95210842
	LPU83_pLPU83d_0129	Glutathione import ATP-binding protein GsiA (EC 3.6.3.-)	O	-1,07073776
	LPU83_pLPU83d_0130	ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component	E	-1,23586541
<i>gsiA1</i>	LPU83_pLPU83d_0131	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, permease component	EP	-1,47213586
	LPU83_pLPU83d_0132	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, permease component	EP	-1,62762733
	LPU83_pLPU83d_0133	Putative glycosyl transferase	R	-1,2549475
	LPU83_pLPU83d_0134	Glycosyltransferase	M	-1,55886967
	LPU83_pLPU83d_0135	Putative glycosyl transferase	R	-2,26994453
	LPU83_pLPU83d_0144	Uncharacterized protein	R	1,438697
	LPU83_pLPU83d_0148	Putative ABC transporter ATP-binding protein y4o5	G	1,09533017
	LPU83_pLPU83d_0181	Precorin-4 C(11)-methyltransferase (EC 2.1.1.133)	H	-1,22961613
<i>cobM</i>	LPU83_pLPU83d_0185	Precorin-2 C(20)-methyltransferase (EC 2.1.1.130)	H	-1,0727763
	LPU83_pLPU83d_0192	Uncharacterized protein	R	1,0203375
	LPU83_pLPU83d_0193	Putative transmembrane transcriptional regulator (Anti-sigma factor)	K	1,18908076
	LPU83_pLPU83d_0195	HTH-type transcriptional regulator HmrR	K	-2,78616193
<i>actP</i>	LPU83_pLPU83d_0196	Copper-transporting P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	P	-2,01843763
<i>msrA2</i>	LPU83_pLPU83d_0204	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA (Protein-methionine-S-oxide reductase) (EC 1.8.4.11)	O	-1,52392846
		(Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase) (Peptide Met(O) reductase)		
	LPU83_pLPU83d_0205	Response regulator with CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	T	-1,5701072
	LPU83_pLPU83d_0206	Mannonate dehydratase (EC 4.2.1.8) (D-mannonate hydro-lyase)	G	-1,17694908
	LPU83_pLPU83d_0211	Uncharacterized protein	P	1,07900513
	LPU83_pLPU83d_0212	Uncharacterized protein	P	1,56210682
	LPU83_pLPU83d_0223	Family 2 glycosyl transferase	G	1,05658944
	LPU83_pLPU83d_0228	Uncharacterized protein	S	1,1714071
	LPU83_pLPU83d_0229	Uncharacterized protein	M	1,52598307
	LPU83_pLPU83d_0245	Phenylacetic acid degradation protein PaaD	Q	1,49946524
	LPU83_pLPU83d_0248	Uncharacterized protein	O	1,51528583
	LPU83_pLPU83d_0249	Uncharacterized protein	O	1,25958606
	LPU83_pLPU83d_0250	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	1,59925469
<i>msmX</i>	LPU83_pLPU83d_0251	Permease component of ABC-type sugar transporter	G	1,69736874
	LPU83_pLPU83d_0253	Maltodextrin import ATP-binding protein MsmX (EC 3.6.3.-)	G	1,16063971
	LPU83_pLPU83d_0254	Uncharacterized protein	O	1,02181686
	LPU83_pLPU83d_0268	Uncharacterized protein	.	1,48323047
	LPU83_pLPU83d_0269	COBW domain-containing protein DDB_G0274527	R	1,61545229
	LPU83_pLPU83d_0270	Mo-co oxidoreductase dimerization domain-containing protein	.	2,38854115
	LPU83_pLPU83d_0282	Acyl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	I	1,31171711
	LPU83_pLPU83d_0283	Putative acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 2 (EC 2.3.1.9)	I	1,80575917
	LPU83_pLPU83d_0287	Putative ABC-type transport system, permease component	R	-2,20996693
	LPU83_pLPU83d_0288	ABC-type uncharacterized transport system, permease component	R	-3,26636813
	LPU83_pLPU83d_0289	ATPase component of uncharacterized ABC-type transporter	R	-2,5222447
	LPU83_pLPU83d_0290	Putative ABC-type transport system, periplasmic component/surface lipoprotein	M	-2,82834392
<i>atzB</i>	LPU83_pLPU83d_0291	Hydroxydechloroatrazine ethylaminohydrolase (EC 3.5.99.3)	FR	-2,0267169
	LPU83_pLPU83d_0292	Glutathione S-transferase	O	-2,44850733
	LPU83_pLPU83d_0293	Uncharacterized protein	PR	-1,58741167
	LPU83_pLPU83d_0296	Uncharacterized protein	.	1,02501648
	LPU83_pLPU83d_0300	UPF0065 protein	C	1,13780557
	LPU83_pLPU83d_0301	Tripartite tricarboxylate transporter TctB family	.	1,69149869
	LPU83_pLPU83d_0302	Putative 52,8 kDa protein in TAR-I ttuC' 3'region	R	1,30996292
	LPU83_pLPU83d_0314	Uncharacterized protein	.	1,70641969
<i>phaZ2</i>	LPU83_pLPU83d_0320	Uncharacterized protein	.	1,52168626
	LPU83_pLPU83d_0339	Poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase C (EC 3.1.1.-)	Q	1,15542094
	LPU83_pLPU83d_0340	Uncharacterized protein	K	1,03009353
	LPU83_pLPU83d_0354	Uncharacterized protein	HR	1,04963517
<i>uxs1</i>	LPU83_pLPU83d_0365	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1 (EC 4.1.1.35)	M	1,04871754
	LPU83_pLPU83d_0366	Uncharacterized protein	.	1,04942477
	LPU83_pLPU83d_0369	HAD-superfamily class IIA hydrolase, TIGR01459	F	-1,25042498
	LPU83_pLPU83d_0372	Transcriptional regulator, DeoR family	KG	-1,17156303
<i>rbsC</i>	LPU83_pLPU83d_0375	Ribose transport system permease protein rbsC	R	-1,07206376
	LPU83_pLPU83d_0381	Uncharacterized protein	.	1,5448967
	LPU83_pLPU83d_0382	Uncharacterized protein	.	1,34508787
	LPU83_pLPU83d_0387	Uncharacterized protein	.	1,24428315
	LPU83_pLPU83d_0425	Uncharacterized protein	L	1,07671545
	LPU83_pLPU83d_0427	Uncharacterized protein	.	1,02257296
	LPU83_pLPU83d_0431	Transposase	.	1,14949859
	LPU83_pLPU83d_0432	Putative membrane protein	X	1,12346024
	LPU83_pLPU83d_0433	Uncharacterized protein	.	1,53778069
	LPU83_pLPU83d_0447	Uncharacterized protein	P	1,12723497
	LPU83_pLPU83d_0448	Uncharacterized protein	.	1,14309336
	LPU83_pLPU83d_0454	FMN reductase	C	1,26107534
	LPU83_pLPU83d_0455	Ketopantoate reductase	H	1,99921511
	LPU83_pLPU83d_0456	Putative acyl-CoA dehydrogenase	I	2,19392286
	LPU83_pLPU83d_0457	Putative alkanesulfonate monooxygenase	HR	1,94701352
	LPU83_pLPU83d_0458	Oxidoreductase	HR	1,53155579
	LPU83_pLPU83d_0459	Peptide ABC transporter	O	1,65912551
	LPU83_pLPU83d_0460	Putative ABC transporter (Permease protein)	EP	1,84764719
	LPU83_pLPU83d_0461	Peptide ABC transporter	EP	1,25458637
	LPU83_pLPU83d_0462	ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component	E	1,93150171
<i>clpP1</i>	LPU83_pLPU83d_0474	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92) (Endopeptidase Clp)	O	-1,10031241
	LPU83_pLPU83d_0484	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7) (Nitrogenase metallocusters biosynthesis protein Nifs)	X	2,58018945
	LPU83_pLPU83d_0505	Uncharacterized protein	.	1,39751929
	LPU83_pLPU83d_0506	Probable transaldolase (EC 2.2.1.2)	G	1,70005648
<i>tal</i>	LPU83_pLPU83d_0509	HAD family hydrolase	GR	1,9201822
	LPU83_pLPU83d_0510	Uncharacterized protein	.	2,34057192
	LPU83_pLPU83d_0520	Sugar ABC transporter permease	G	1,49721377
	LPU83_pLPU83d_0521	Binding-protein-dependent transporters inner membrane component	G	1,68772041
	LPU83_pLPU83d_0522	Extracellular solute-binding protein	G	1,18016837
	LPU83_pLPU83d_0531	CyaF4 adenylate cyclase	R	1,8677341
	LPU83_pLPU83d_0533	Putative oxidoreductase yvaG (EC 1.-.-.-)	IQR	1,0577114
	LPU83_pLPU83d_0536	Uncharacterized protein	.	1,32367016
<i>cydF4</i>	LPU83_pLPU83d_0547	Uncharacterized protein	K	-1,48823611
	LPU83_pLPU83d_0550	Uncharacterized protein	.	-1,0589049
	LPU83_pLPU83d_0551	Uncharacterized protein	.	1,27257551
	LPU83_pLPU83d_0557	Uncharacterized protein	G	1,51914479

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>alsT</i>	LPU83_pLPU83d_0566	Uncharacterized protein	.	-1,00096596
	LPU83_pLPU83d_0576	ABC transporter substrate-binding protein	P	-1,1573198
	LPU83_pLPU83d_0582	Uncharacterized protein	S	1,77612434
	LPU83_pLPU83d_0598	Uncharacterized protein	.	-1,46707303
	LPU83_pLPU83d_0612	Uncharacterized protein	.	1,15135604
	LPU83_pLPU83d_0625	Putative membrane protein	.	1,02377093
	LPU83_pLPU83d_0626	Uncharacterized protein	.	1,09085002
	LPU83_pLPU83d_0648	Uncharacterized protein	.	1,27488351
	LPU83_pLPU83d_0650	Uncharacterized protein	.	1,69656799
	LPU83_pLPU83d_0654	Uncharacterized protein	.	1,24335162
	LPU83_pLPU83d_0655	Putative transposase y4qJ	.	1,25637422
	LPU83_pLPU83d_0656	Putative integrase/recombinase y4qK	L	2,20352002
	LPU83_pLPU83d_0658	Secretion protein HlyD family protein	V	1,65058912
	LPU83_pLPU83d_0661	Amino-acid carrier protein AlsT	E	1,04525686
	LPU83_pLPU83d_0662	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	P	1,93186721
	LPU83_pLPU83d_0663	Selenide, water dikinase (EC 2.7.9.3) (Selenium donor protein) (Selenophosphate synthase)	E	1,42976782
	LPU83_pLPU83d_0669	Protein FdhE homolog	CO	1,04500336
	LPU83_pLPU83d_0674	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	T	1,16261401
	LPU83_pLPU83d_0676	Methyl-accepting chemotaxis protein	NT	1,28352127
	LPU83_pLPU83d_0679	Putative SOS response-associated peptidase (EC 3.4.-.-)	O	1,32886439
<i>nuoK</i>	LPU83_pLPU83d_0682	Putative secreted protein	.	1,19317515
	LPU83_pLPU83d_0683	Putative membrane protein	.	1,0696726
<i>acrA</i>	LPU83_pLPU83d_0697	NADH-quinone oxidoreductase subunit K (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit K) (NDH-1 subunit K)	C	1,14700757
	LPU83_pLPU83d_0710	Uncharacterized protein	T	1,43399628
<i>malK3</i>	LPU83_pLPU83d_0713	Acriflavine resistance protein A	MV	1,28304333
	LPU83_pLPU83d_0723	ABC transporter permease	EP	1,03942973
<i>ddpC</i>	LPU83_pLPU83d_0755	Endopolygalacturonase	G	1,5072711
	LPU83_pLPU83d_0756	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	1,42900328
<i>malK3</i>	LPU83_pLPU83d_0757	Permease component of ABC-type sugar transporter	G	2,00822093
	LPU83_pLPU83d_0758	ABC-type sugar transport system, permease component	G	1,37463403
<i>ddpC</i>	LPU83_pLPU83d_0759	Glycogen debranching enzyme	G	1,32944688
	LPU83_pLPU83d_0762	Maltose/maltodextrin import ATP-binding protein MalK (EC 3.6.3.19)	G	1,03368987
<i>ddpC</i>	LPU83_pLPU83d_0774	Putative D,D-dipeptide transport system permease protein ddpC	EP	-1,00711352
	LPU83_pLPU83d_0783	DNA-binding domain-containing protein, AraC-type	K	1,61512592
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0784	Uncharacterized protein	.	1,37627761
	LPU83_pLPU83d_0786	NADH/ubiquinone/plastoquinone	CP	1,52754272
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0787	Putative membrane protein	P	2,12680062
	LPU83_pLPU83d_0788	Na ⁺ /H ⁺ antiporter MnhB subunit-related protein	P	2,87029185
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0789	Putative membrane protein	P	3,67313849
	LPU83_pLPU83d_0790	Putative membrane protein	R	3,54756797
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0791	Putative membrane protein	P	2,8080249
	LPU83_pLPU83d_0792	Putative membrane protein	P	2,7347044
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0794	Uncharacterized protein	.	3,39478128
	LPU83_pLPU83d_0795	Citrate transporter	G	2,74423241
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0796	Peptidase M20	E	3,633799
	LPU83_pLPU83d_0797	AbgT putative transporter	H	3,99861404
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0798	Uncharacterized protein	.	2,88382117
	LPU83_pLPU83d_0799	Acetyltransferases and hydrolases with the alpha/beta hydrolase fold-like protein	I	1,39842941
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0800	Efflux pump membrane transporter	V	1,32626326
	LPU83_pLPU83d_0801	RND family efflux transporter, MFP subunit	MV	2,01144412
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0802	Uncharacterized protein	.	1,82615456
	LPU83_pLPU83d_0803	Putative membrane protein	S	1,98198836
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0805	Alpha/beta hydrolase fold protein	HR	-1,70638503
	LPU83_pLPU83d_0807	Uncharacterized protein	X	1,47995846
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0823	Uncharacterized protein	.	-1,54310845
	LPU83_pLPU83d_0825	Uncharacterized protein	.	-1,26887442
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0833	Orf_Bo015	X	1,43155278
	LPU83_pLPU83d_0837	Helix-turn-helix-domain containing protein arac type	K	1,07743708
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0840	Uncharacterized protein	.	1,32803481
	LPU83_pLPU83d_0847	Uncharacterized protein	.	-1,78889586
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0865	Uncharacterized protein	K	1,36704746
	LPU83_pLPU83d_0876	Uncharacterized protein	.	2,10066696
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0878	Uncharacterized protein	.	2,95042023
	LPU83_pLPU83d_0879	ATPase involved in chromosome partitioning	N	2,46468006
<i>bepG</i>	LPU83_pLPU83d_0880	Uncharacterized protein	.	2,23192179
	LPU83_pLPU83d_0881	TraA	.	2,19501761
<i>traA</i>	LPU83_pLPU83d_0885	Type IV secretory pathway, VirB10 component	U	1,09243833
	LPU83_pLPU83d_0886	Type IV secretory pathway, VirB9 component	U	1,19913187
<i>traA</i>	LPU83_pLPU83d_0888	Type IV secretory pathway, VirB6 component	U	1,71661437
	LPU83_pLPU83d_0889	Uncharacterized protein	.	1,16341079
<i>traA</i>	LPU83_pLPU83d_0890	Type IV secretion system protein	.	1,96453801
	LPU83_pLPU83d_0891	Soluble lytic murein transglycosylase-like protein	M	2,08390347
<i>traA</i>	LPU83_pLPU83d_0892	Type IV secretion/conjugal transfer ATPase, VirB4 family	U	1,82015559
	LPU83_pLPU83d_0893	Putative membrane protein	U	2,58661007
<i>traA</i>	LPU83_pLPU83d_0894	Putative secreted protein	U	2,45694915
	LPU83_pLPU83d_0895	Uncharacterized protein	M	2,16715474
<i>nodW3</i>	LPU83_pLPU83d_0899	Nodulation protein W	TK	1,94549643
	LPU83_pLPU83d_0900	Histidine kinase	T	1,24739296
<i>nodW3</i>	LPU83_pLPU83d_0934	Uncharacterized protein	.	-2,71493174
	LPU83_pLPU83d_0935	Dyp-type peroxidase family protein	P	-2,92095582
<i>nodW3</i>	LPU83_pLPU83d_0936	Uncharacterized protein	.	-1,04488718
	LPU83_pLPU83d_0937	Acetoacetate decarboxylase (EC 4.1.1.4)	Q	-1,20155228
<i>rutE</i>	LPU83_pLPU83d_0938	Putative NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase LPU83_pLPU83d_0938 (EC 1.-.-.-)	C	-1,11792145
	LPU83_pLPU83d_0939	Uncharacterized protein	IQR	-1,21009909
<i>rutE</i>	LPU83_pLPU83d_0940	Uncharacterized protein	.	-1,31332644
	LPU83_pLPU83d_0941	NADH dehydrogenase, FAD-containing subunit	C	-1,43536442
<i>ndh</i>	LPU83_pLPU83d_0942	NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3)	C	-1,72505809
	LPU83_pLPU83d_0943	Uncharacterized protein	.	-1,74915282
<i>ndh</i>	LPU83_pLPU83d_0944	Putative membrane protein	.	-2,37189091
	LPU83_pLPU83d_0960	Uncharacterized protein	.	3,17759628
<i>ndh</i>	LPU83_pLPU83d_0961	Uncharacterized protein	.	2,59487122
	LPU83_pLPU83d_0962	Uncharacterized protein	.	1,06220352
<i>ndh</i>	LPU83_pLPU83d_0963	Uncharacterized protein	.	1,10687595
	LPU83_pLPU83d_0980	Uncharacterized protein	O	1,32540801
<i>ndh</i>	LPU83_pLPU83d_0989	Major facilitator superfamily protein	.	1,16184352
	LPU83_pLPU83d_1004	Uncharacterized protein	.	1,18695815
<i>ndh</i>	LPU83_pLPU83d_1023	Uncharacterized protein	K	-1,71805267

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>exoY</i>	LPU83_pLPU83d_1024	HipA domain-containing protein	T	-1,53618848
	LPU83_pLPU83d_1028	Arylsulfatase A family protein	P	1,90780321
	LPU83_pLPU83d_1038	Uncharacterized protein	.	2,63833913
	LPU83_pLPU83d_1039	Uncharacterized protein	.	1,39843541
	LPU83_pLPU83d_1041	Uncharacterized protein	.	1,84466637
	LPU83_pLPU83d_1049	Uncharacterized protein	KL	-1,28543672
	LPU83_pLPU83d_1051	Uncharacterized protein	.	1,02230959
	LPU83_pLPU83d_1052	Uncharacterized protein	.	1,11845924
	LPU83_pLPU83d_1054	Uncharacterized protein	.	1,54586154
	LPU83_pLPU83d_1055	Uncharacterized protein	.	1,6094205
	LPU83_pLPU83d_1058	Uncharacterized protein	.	1,5533552
	LPU83_pLPU83d_1067	Uncharacterized protein	R	1,37430001
	LPU83_pLPU83d_1069	Uncharacterized protein	.	1,61943319
	LPU83_pLPU83d_1070	Putative membrane protein	.	2,03126717
	LPU83_pLPU83d_1071	Putative membrane protein	.	2,27010211
	LPU83_pLPU83d_1076	Uncharacterized protein	G	-1,04201826
	LPU83_pLPU83d_1096	YecA family protein	S	2,00291271
	LPU83_pLPU83d_1100	Uncharacterized protein	.	1,09869454
	LPU83_pLPU83d_1101	Uncharacterized protein	.	1,65813217
	LPU83_pLPU83d_1107	Putative membrane protein	.	1,26375666
	LPU83_pLPU83d_1117	Exopolysaccharide production protein ExoY	M	1,3650413
	LPU83_pLPU83d_1122	Uncharacterized protein	R	1,86848473
	LPU83_pLPU83d_1123	Protoporphyrinogen oxidase	H	2,41490229
	LPU83_pLPU83d_1124	Glycosyltransferase	M	2,12303445
	LPU83_pLPU83d_1125	Uncharacterized protein	.	2,21395014
	LPU83_pLPU83d_1126	Uncharacterized protein	.	2,21941511
	LPU83_pLPU83d_1127	Methyltransferase	.	1,27825921
	LPU83_pLPU83d_1129	Uncharacterized protein	.	1,15093155
	LPU83_pLPU83d_1138	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	G	2,27169168
	LPU83_pLPU83d_1142	Putative nucleoside-diphosphate sugar epimerase	R	-1,74516423
<i>GT2</i>	LPU83_pLPU83d_1146	Glutathione S-transferase 2 (EC 2.5.1.18)	O	-1,87126224
	LPU83_pLPU83d_1160	Isochorismatase family protein	HR	1,06358496
	LPU83_pLPU83d_1170	Putative membrane protein	F	-1,2084098
	LPU83_pLPU83d_1210	Alpha/beta hydrolase fold protein	HR	-1,00712376
<i>laaA</i>	LPU83_pLPU83d_1219	L-amino acid amidase (EC 3.5.1.101)	HR	1,18867405
	LPU83_pLPU83d_1235	Uncharacterized protein	TK	1,04140494
<i>algD3</i>	LPU83_pLPU83d_1236	UDP-glucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	M	1,456353
	LPU83_pLPU83d_1259	Uncharacterized protein	V	1,34560174
	LPU83_pLPU83d_1260	MOSC domain containing protein	C	1,02544334
	LPU83_pLPU83d_1265	Enoyl-CoA hydratase/isomerase	I	2,00973637
<i>opuAA</i>	LPU83_pLPU83d_1271	Uncharacterized protein	.	1,48933062
	LPU83_pLPU83d_1295	Malate/L-lactate dehydrogenase	C	-2,02676553
	LPU83_pLPU83d_1296	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	C	-1,00000858
	LPU83_pLPU83d_1297	Glycine betaine transport ATP-binding protein OpuAA (EC 3.6.3.32)	E	-2,77165043
	LPU83_pLPU83d_1298	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein proW	E	-2,7360914
	LPU83_pLPU83d_1299	ABC-type proline/glycine betaine transport system, periplasmic component	E	-2,13584809
	LPU83_pLPU83d_1302	Putative N-methylproline demethylase (EC 1.-.-.-)	C	-1,2728241
	LPU83_pLPU83d_1306	Uncharacterized protein	.	-1,2741184
	LPU83_pLPU83d_1308	Flavodoxin reductase family protein	C	-1,00217039
	LPU83_pLPU83d_1317	Putative amino-acid ABC transporter ATP-binding protein y4tH	E	-1,32748343
<i>proW</i>	LPU83_pLPU83d_1318	ABC transporter substrate-binding protein	ET	-1,1537252
	LPU83_pLPU83d_1320	ABC transporter permease	E	-1,20134296
	LPU83_pLPU83d_1321	Putative arylmalonate decarboxylase protein	Q	-1,26212639
	LPU83_pLPU83d_1326	Uncharacterized protein	.	1,9974914
	LPU83_pLPU83d_1327	Uncharacterized protein	.	2,26949086
	LPU83_pLPU83d_1328	Uncharacterized protein	.	1,33531332
	LPU83_pLPU83d_1329	Putative secreted protein	R	1,46545537
	LPU83_pLPU83d_1331	Glyoxalase	R	1,90013135
	LPU83_pLPU83d_1338	Periplasmic component of amino acid ABC-type transporter/signal transduction system	ET	-1,01738716
	LPU83_pLPU83d_1342	Cytochrome c-type protein	C	-1,14854776
	LPU83_pLPU83d_1343	Periplasmic nitrate reductase, electron transfer subunit (Diheme cytochrome c NapB)	CP	-1,12017558
	LPU83_pLPU83d_1348	Uncharacterized protein	.	1,0805367
	LPU83_pLPU83d_1355	Putative exported Erk/YbiS/YhnG family protein	M	1,27219432
	LPU83_pLPU83d_1356	Uncharacterized protein	.	1,5105881
<i>gshB</i>	LPU83_pLPU83d_1357	Glutathione synthetase (EC 6.3.2.3) (GSH synthetase) (GSH-S) (GSHase) (Glutathione synthase)	HJ	1,13865382
	LPU83_pLPU83d_1358	Uncharacterized protein	S	1,32871385
	LPU83_pLPU83d_1359	Uncharacterized protein	E	1,60447026
	LPU83_pLPU83d_1361	Histidine kinase (EC 2.7.13.3)	NT	1,8635896
	LPU83_pLPU83d_1362	Putative two-component sensor histidine kinase/response regulator hybrid protein	T	1,37718996
	LPU83_pLPU83d_1363	Uncharacterized protein	.	-1,50356547
	LPU83_pLPU83d_1364	Uncharacterized protein	L	-1,64503807
	LPU83_pLPU83d_1365	Uncharacterized protein	.	1,67227656
	LPU83_pLPU83d_1368	Uncharacterized protein	.	2,7529934
	LPU83_pLPU83d_1369	Uncharacterized protein	.	-1,18639519
<i>ycgB</i>	LPU83_pLPU83d_1375	Uncharacterized protein	D	1,35391152
	LPU83_pLPU83d_1376	UPF0229 protein LPU83_pLPU83d_1376	R	1,46454141
	LPU83_pLPU83d_1377	Uncharacterized protein	T	1,55301827
	LPU83_pLPU83d_1398	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase component beta subunit	C	1,03867079
<i>yeaG</i>	LPU83_pLPU83d_1399	Uncharacterized protein	S	1,67722735
	LPU83_pLPU83d_1405	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, middle subunit CoxM/CutM-like protein	C	-1,36903003
	LPU83_pLPU83d_1406	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, large subunit CoxL/CutL-like protein	C	-1,47510856
	LPU83_pLPU83d_1414	Putative tartrate transporter	G	1,07077977
	LPU83_pLPU83d_1417	Transcriptional regulator	K	1,05920303
	LPU83_pLPU83d_1419	Lactose transport ATP-binding protein LacK	G	-1,03811296
<i>lacK1</i>	LPU83_pLPU83d_1420	Permease component of ABC-type sugar transporter	G	-1,30545139
	LPU83_pLPU83d_1421	Trehalose/maltose ABC transporter	U	-1,39588068
	LPU83_pLPU83d_1427	Type I secretion system ATP-binding protein PrsD	G	1,35536889
	LPU83_pLPU83d_1428	Type I secretion system membrane fusion protein PrsE	V	1,82606612
<i>prsD</i>	LPU83_pLPU83d_1429	Endo-1,3-1,4-beta-glycanase ExsH (EC 3.2.1.-)	G	2,36124319
	LPU83_pLPU83d_1430	Transposase IS4 family protein (Transposase for insertion sequence element IS1106)	K	1,05521136
<i>exsH</i>	LPU83_pLPU83d_1431	4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase (EC 5.3.1.17) (5-keto-4-deoxyuronate isomerase) (DKI isomerase)	G	2,19072677
	LPU83_pLPU83d_1432	Cupin domain-containing protein	R	1,45036028
<i>kduD</i>	LPU83_pLPU83d_1433	2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.127)	IGR	1,34281409
	LPU83_pLPU83d_1439	Lipid A core-O-antigen ligase-like enzyme	M-	-1,01520361
	LPU83_pLPU83d_1440	Uncharacterized protein	M	-1,1043649
	LPU83_pLPU83d_1444	Putative membrane protein	.	1,98611163
	LPU83_pLPU83d_1446	Transcriptional regulator	K	-1,33158143

Gen	Locus tag	Descripción	COG	M
<i>galE</i>	LPU83_pLPU83d_1453	Uncharacterized protein	S	1,5170995
	LPU83_pLPU83d_1454	Family 3 adenylate cyclase	T	1,39140213
	LPU83_pLPU83d_1455	Uncharacterized protein	S	-1,51355515
	LPU83_pLPU83d_1456	Glycosyl transferase possibly involved in lipopolysaccharide synthesis	M	-1,28037194
	LPU83_pLPU83d_1457	UDP-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)	M	-1,183094
	LPU83_pLPU83d_1458	Putative nucleoside-diphosphate sugar epimerase	MO	-1,2402603
	LPU83_pLPU83d_1459	Lipid A core-O-antigen ligase-like enzyme	.	-1,12259297
	LPU83_pLPU83d_1463	Uncharacterized protein	I	1,77514747
	LPU83_pLPU83d_1474	Uncharacterized protein	.	2,81765528
	LPU83_pLPU83d_1475	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	E	-1,91664044
<i>glnII</i>	LPU83_pLPU83d_1486	Sulfite oxidase	C	1,12923675
	LPU83_pLPU83d_1501	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	-1,35182889
	LPU83_pLPU83d_1507	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain-containing protein	O	1,72870126
	LPU83_pLPU83d_1547	Permease component of ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transporter	G	-1,31254672
<i>yuxG</i>	LPU83_pLPU83d_1551	Putative oxidoreductase yuxG (EC 1.-.-.-)	G	-1,13875841
	LPU83_pLPU83d_1553	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD (EC 1.11.1.15)	P	1,37619513
	LPU83_pLPU83d_1554	RNA polymerase sigma factor, sigma-70 family	K	1,17997501
	LPU83_pLPU83d_1555	Uncharacterized protein	.	1,64514903
	LPU83_pLPU83d_1559	Putative membrane protein	.	1,31271953
	LPU83_pLPU83d_1564	Putative secreted protein	.	1,16036605
	LPU83_pLPU83d_1570	Putative insertion sequence protein	X	1,08877206
	LPU83_pLPU83d_1571	Uncharacterized protein	X	1,46896505
	LPU83_pLPU83d_1575	Esterase, PHB depolymerase family (EC 3.1.1.73)	Q	1,11265341
	LPU83_pLPU83d_1586	Uncharacterized protein	J	1,26507189
<i>fur</i>	LPU83_pLPU83d_1587	Uncharacterized protein	R	1,60102881
	LPU83_pLPU83d_1602	Putative membrane protein	.	3,07942264
	LPU83_pLPU83d_1603	Putative membrane protein	.	1,08909683
	LPU83_pLPU83d_1624	Putative secreted protein	.	-1,21528637
	LPU83_pLPU83d_1636	Uncharacterized protein	S	1,18512404
	LPU83_pLPU83d_1655	Uncharacterized protein	.	1,47556555
	LPU83_pLPU83d_1656	Uncharacterized protein	X	2,46335008
	LPU83_pLPU83d_1663	Uncharacterized protein	.	1,21556847
	LPU83_pLPU83d_1670	Ferric uptake regulation protein	P	1,05172418
	LPU83_pLPU83d_1676	Uncharacterized protein	S	-1,068098
<i>putA</i>	LPU83_pLPU83d_1685	Uncharacterized protein	T	2,113277
	LPU83_pLPU83d_1706	Putative ATP-binding ABC transporter protein	G	1,20514331
	LPU83_pLPU83d_1714	Uncharacterized protein	.	2,17924004
	LPU83_pLPU83d_1716	Cupin 2 conserved barrel domain protein	R	1,00013381
	LPU83_pLPU83d_1717	Putative membrane protein	.	1,27833523
	LPU83_pLPU83d_1719	Putative transmembrane protein	.	-1,43591303
	LPU83_pLPU83d_1736	Putative transcriptional regulator	K	-1,66864701
	LPU83_pLPU83d_1742	Uncharacterized protein	L	-1,83320504
	LPU83_pLPU83d_1743	Uncharacterized protein	.	-1,66394128
	LPU83_pLPU83d_1744	Uncharacterized protein	.	-1,07747185
<i>putA</i>	LPU83_pLPU83d_1745	Uncharacterized protein	S	-1,08753792
	LPU83_pLPU83d_1749	Uncharacterized protein	.	1,23356707
	LPU83_pLPU83d_1765	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein-like protein	E	1,25330186
	LPU83_pLPU83d_1781	Bifunctional protein PutA [Includes: Proline dehydrogenase (EC 1.5.5.2) (Proline oxidase); Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (PSC dehydrogenase) (EC 1.2.1.88) (L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase)]	E	-1,87344566
<i>agIK3</i>	LPU83_pLPU83d_1804	FAD/FMN-dependent dehydrogenase	C	-1,13772319
	LPU83_pLPU83d_1808	Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain	K	1,09671781
	LPU83_pLPU83d_1809	ABC-type xylose transport system, periplasmic component	G	1,55324441
	LPU83_pLPU83d_1810	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G	1,9058954
	LPU83_pLPU83d_1814	Rrf2 family protein, putative transcriptional regulator	K	1,0590381
	LPU83_pLPU83d_1815	Small-conductance mechanosensitive channel	M	3,19159842
	LPU83_pLPU83d_1816	Uncharacterized protein	R	2,77124143
	LPU83_pLPU83d_1817	Putative nucleoside-diphosphate sugar epimerase	R	3,27058616
	LPU83_pLPU83d_1818	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD (EC 1.11.1.15)	P	2,62582926
	LPU83_pLPU83d_1819	Transcriptional regulator	K	1,76906498
<i>tauA</i>	LPU83_pLPU83d_1822	Putative dehydrogenase	R	-1,24327908
	LPU83_pLPU83d_1823	Permease component of ABC-type sugar transporter	G	-1,82322842
	LPU83_pLPU83d_1825	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-1,1020227
	LPU83_pLPU83d_1827	Putative secreted protein	.	1,29315839
	LPU83_pLPU83d_1836	Arabinose efflux permease family protein	.	-2,10326148
	LPU83_pLPU83d_1839	Permease component of ABC-type sugar transporter	G	-1,26307519
	LPU83_pLPU83d_1851	Uncharacterized protein	.	1,16512137
	LPU83_pLPU83d_1861	Alpha-glucoside transport ATP-binding protein AgIK	G	1,40260617
	LPU83_pLPU83d_1872	Taurine-binding periplasmic protein	P	1,93327192
	LPU83_pLPU83d_1873	Taurine import ATP-binding protein TauB (EC 3.6.3.36)	P	2,74358248
<i>tauB</i>	LPU83_pLPU83d_1874	Taurine transport system permease protein tauC	P	2,23012575
	LPU83_pLPU83d_1875	FMN-dependent oxidoreductase, nitrotriacetate monooxygenase family	HR	1,08309052
	LPU83_pLPU83d_1879	Uncharacterized protein	R	1,30732334
	LPU83_pLPU83d_1896	Uncharacterized protein	.	-1,10844619
	LPU83_pLPU83d_1900	ABC-type sugar transport system, permease component	G	1,00390394
	LPU83_pLPU83d_1905	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	EG	-1,24757456
	LPU83_pLPU83d_1921	Putative transcriptional regulator	K	2,06477228
	LPU83_pLPU83d_1922	Uncharacterized protein	R	2,04469682
	LPU83_pLPU83d_1923	Uncharacterized protein	.	1,73443018
	LPU83_pLPU83d_1924	Uncharacterized protein	J	1,58379118
<i>tauC</i>	LPU83_pLPU83d_1925	Uncharacterized protein	S	1,39421998
	LPU83_pLPU83d_1926	Uncharacterized protein	.	1,07141591
	LPU83_pLPU83d_1939	Putative secreted protein	.	1,0732989

Tabla A.3. Lista de genes identificados con la misma tendencia en su nivel de expresión.

locus tag	Valor M (Prot.)	Valor M (ARN)
LPU83_0176	ON	-0.68
LPU83_0683	ON	-0.49
LPU83_1733	ON	-1.73
LPU83_1748	ON	-0.90
LPU83_2906	ON	-0.33
LPU83_3025	ON	-0.64
LPU83_3826	ON	-1.32
LPU83_3925	ON	-1.67
LPU83_plPU83c_0218	ON	-0.10
LPU83_plPU83c_0248	ON	-0.98
LPU83_plPU83d_0204	ON	-1.52
LPU83_plPU83d_0292	ON	-2.45
LPU83_plPU83a_0021	-4.40	-4.53
LPU83_2651	-4.12	-1.43
LPU83_3075	-2.92	-1.36
LPU83_3943	-2.80	-0.77
LPU83_1662	-2.80	-2.45
LPU83_0951	-2.77	-0.07
LPU83_2264	-2.63	-1.45
LPU83_2903	-2.55	-0.36
LPU83_2124	-2.51	-1.03
LPU83_plPU83d_1781	-2.33	-1.87
LPU83_0944	-2.27	-0.02
LPU83_4171	-2.27	-1.24
LPU83_3973	-2.20	-1.39
LPU83_1140	-2.19	-0.86
LPU83_1473	-2.16	-0.81
LPU83_3442	-2.14	-0.87
LPU83_1658	-2.14	-1.66
LPU83_2016	-2.06	-2.66
LPU83_0323	-1.98	-0.16
LPU83_3132	-1.97	-0.06
LPU83_4032	-1.96	-0.27
LPU83_1011	-1.91	-0.48
LPU83_3200	-1.88	-3.01
LPU83_0652	-1.86	-0.77
LPU83_1350	-1.85	-0.63
LPU83_4172	-1.79	-1.59
LPU83_2336	-1.79	-0.36
LPU83_1655	-1.77	-1.41
LPU83_3251	-1.70	-0.52
LPU83_1826	-1.67	-0.34
LPU83_0909	-1.65	-0.73
LPU83_3380	-1.62	-0.95
LPU83_3977	-1.60	-1.18
LPU83_plPU83d_0291	-1.59	-2.03
LPU83_1043	-1.58	-0.71
LPU83_0739	-1.53	-0.03
LPU83_1394	-1.50	-1.50
LPU83_1661	-1.50	-2.21
LPU83_0650	-1.48	-0.13
LPU83_1666	-1.45	-2.75
LPU83_plPU83d_1757	-1.45	-0.43
LPU83_3672	-1.45	-0.28
LPU83_0036	-1.43	-0.37
LPU83_1609	-1.43	-1.10
LPU83_plPU83d_1305	-1.41	-0.23
LPU83_0256	-1.39	-0.27
LPU83_plPU83c_0701	-1.39	-1.43
LPU83_0874	-1.38	-0.07
LPU83_1265	-1.36	-0.99
LPU83_0140	-1.33	-0.18
LPU83_3508	-1.32	-0.80
LPU83_3589	-1.31	-1.47
LPU83_1492	-1.29	-1.21
LPU83_3934	-1.27	-1.19
LPU83_0873	-1.24	-0.39
LPU83_2580	-1.24	-0.73
LPU83_0133	-1.22	-0.39
LPU83_plPU83c_0694	-1.21	-1.28
LPU83_0314	-1.21	-0.68
LPU83_2577	-1.21	-0.75
LPU83_2485	-1.21	-0.22
LPU83_1659	-1.19	-1.70
LPU83_0164	-1.19	-0.34
LPU83_2339	-1.17	-1.34
LPU83_0053	-1.16	-0.97
LPU83_0031	-1.15	-0.90
LPU83_0364	-1.15	-0.59
LPU83_2242	-1.14	-0.18
LPU83_3679	-1.14	-1.27
LPU83_0520	-1.12	-0.66
LPU83_0384	-1.11	-0.76

locus tag	Valor M (Prot.)	Valor M (ARN)
LPU83_3919	-1.10	-0.86
LPU83_1380	-1.09	-0.01
LPU83_0044	-1.08	-0.26
LPU83_1440	-1.08	-0.61
LPU83_0159	-1.07	-0.81
LPU83_1479	-1.07	-0.74
LPU83_2574	-1.06	-0.39
LPU83_1441	-1.06	-1.02
LPU83_3062	-1.03	-1.11
LPU83_plPU83d_0725	-1.03	-0.19
LPU83_0315	-1.02	-1.29
LPU83_3429	-1.02	-1.25
LPU83_2747	-1.00	-0.59
LPU83_2464	1.06	2.03
LPU83_plPU83d_1809	1.06	1.55
LPU83_0482	1.06	0.19
LPU83_plPU83b_0279	1.06	1.43
LPU83_2674	1.09	0.27
LPU83_3052	1.09	0.66
LPU83_1827	1.12	0.03
LPU83_plPU83d_1820	1.12	0.22
LPU83_plPU83d_0192	1.13	1.02
LPU83_2663	1.14	4.37
LPU83_2831	1.15	0.31
LPU83_plPU83d_0057	1.20	1.21
LPU83_plPU83d_1817	1.22	3.27
LPU83_1498	1.23	0.15
LPU83_plPU83b_0324	1.24	1.58
LPU83_3741	1.25	4.11
LPU83_plPU83d_1921	1.26	2.06
LPU83_3421	1.34	0.45
LPU83_plPU83d_1837	1.36	0.11
LPU83_plPU83d_0097	1.36	0.42
LPU83_3593	1.36	0.78
LPU83_plPU83d_1123	1.41	2.41
LPU83_plPU83d_1511	1.45	0.40
LPU83_plPU83d_1558	1.48	0.11
LPU83_2149	1.50	0.31
LPU83_plPU83d_1922	1.52	2.04
LPU83_plPU83d_1902	1.53	0.36
LPU83_3149	1.58	2.89
LPU83_plPU83d_1890	1.62	0.04
LPU83_plPU83d_1549	1.63	0.14
LPU83_3710	1.65	2.46
LPU83_2148	1.66	0.87
LPU83_plPU83d_1124	1.67	2.12
LPU83_plPU83c_0775	1.73	1.39
LPU83_3745	1.76	1.70
LPU83_0565	1.79	0.24
LPU83_2824	1.92	1.26
LPU83_3255	1.99	0.26
LPU83_0147	2.01	0.79
LPU83_plPU83d_1818	2.02	2.63
LPU83_plPU83d_1443	2.13	0.10
LPU83_3188	2.16	4.44
LPU83_1690	2.17	0.97
LPU83_2945	2.18	0.52
LPU83_0686	2.18	1.25
LPU83_3712	2.20	5.02
LPU83_1458	2.28	0.76
LPU83_plPU83d_1815	2.29	3.19
LPU83_3711	2.31	4.97
LPU83_0567	2.31	0.46
LPU83_3363	2.47	0.06
LPU83_3744	2.50	3.51
LPU83_3849	2.54	0.32
LPU83_plPU83c_0629	2.54	1.36
LPU83_3143	2.63	2.85
LPU83_2265	2.72	0.46
LPU83_plPU83d_0203	2.78	0.85
LPU83_2210	2.79	1.64
LPU83_plPU83d_0303	3.29	0.92
LPU83_3147	3.39	2.77
LPU83_0893	3.47	0.09
LPU83_0525	3.48	0.33
LPU83_plPU83d_1361	3.73	1.86
LPU83_3146	4.14	2.74
LPU83_3186	4.76	4.32
LPU83_3144	4.85	2.18
LPU83_0131	OFF	0.99
LPU83_0370	OFF	0.16
LPU83_0515	OFF	0.91
LPU83_0710	OFF	2.18
LPU83_0722	OFF	0.60

locus tag	Valor M (Prot.)	Valor M (ARN)
LPU83_0834	OFF	0.08
LPU83_0885	OFF	0.54
LPU83_0916	OFF	0.24
LPU83_1071	OFF	0.47
LPU83_1147	OFF	0.08
LPU83_1679	OFF	0.42
LPU83_1882	OFF	0.52
LPU83_1945	OFF	0.60
LPU83_2069	OFF	0.71
LPU83_2189	OFF	0.35
LPU83_2209	OFF	1.55
LPU83_2211	OFF	2.52
LPU83_2212	OFF	2.85
LPU83_2417	OFF	0.70
LPU83_2822	OFF	2.65
LPU83_3537	OFF	0.20
LPU83_3713	OFF	5.05
LPU83_3715	OFF	3.65
LPU83_3742	OFF	4.09
LPU83_3743	OFF	4.14
LPU83_3770	OFF	0.45
LPU83_3781	OFF	0.31
LPU83_plPU83a_0034	OFF	0.74
LPU83_plPU83a_0038	OFF	0.04
LPU83_plPU83a_0096	OFF	0.90
LPU83_plPU83b_0056	OFF	1.70
LPU83_plPU83b_0169	OFF	1.42
LPU83_plPU83b_0254	OFF	1.88
LPU83_plPU83c_0143	OFF	0.23
LPU83_plPU83c_0264	OFF	0.62
LPU83_plPU83c_0307	OFF	0.46
LPU83_plPU83c_0380	OFF	1.64
LPU83_plPU83c_0449	OFF	0.69
LPU83_plPU83c_0651	OFF	1.22
LPU83_plPU83d_0144	OFF	1.44
LPU83_plPU83d_0187	OFF	0.05
LPU83_plPU83d_0873	OFF	0.07
LPU83_plPU83d_1168	OFF	0.08
LPU83_plPU83d_1504	OFF	0.23
LPU83_plPU83d_1923	OFF	1.73
LPU83_3191	5.18	4.33

BIBLIOGRAFÍA

- Aertsen A & Michiels CW (2004) Stress and how bacteria cope with death and survival. *Critical reviews in microbiology* **30**: 263-273.
- Amabile-Cuevas CF & Demple B (1991) Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic acids research* **19**: 4479-4484.
- Anderson NL & Anderson NG (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**: 1853-1861.
- Armengaud J (2013) Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! *Environmental microbiology* **15**: 12-23.
- Ashburner M (1982) The effects of heat shock and other stress on gene activity: an introduction. In: Heat Shock: From Bacteria to Man. ed Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1-10.
- Askoura M, Sarvan S, Couture JF & Stintzi A (2016) The *Campylobacter jejuni* Ferric Uptake Regulator Promotes Acid Survival and Cross-Protection against Oxidative Stress. *Infection and immunity* **84**: 1287-1300.
- Athmann C, Zeng N, Kang T, Marcus EA, Scott DR, Rektorschek M, Buhmann A, Melchers K & Sachs G (2000) Local pH elevation mediated by the intrabacterial urease of *Helicobacter pylori* cocultured with gastric cells. *The Journal of clinical investigation* **106**: 339-347.
- Audia JP, Webb CC & Foster JW (2001) Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International journal of medical microbiology : IJMM* **291**: 97-106.
- Baik HS, Bearson S, Dunbar S & Foster JW (1996) The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiology* **142 (Pt 11)**: 3195-3200.
- Bang IS, Kim BH, Foster JW & Park YK (2000) OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology* **182**: 2245-2252.
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J & Kuster B (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**: 1017-1031.
- Barber LE (1980) Enumeration, Effectiveness, and pH Resistance of *Rhizobium meliloti* Populations in Oregon Soils. *Soil Science Society of America Journal* **44**: 537-539.
- Barriuso-Iglesias M, Barreiro C, Sola-Landa A & Martin JF (2013) Transcriptional control of the F₀F₁-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microbial biotechnology* **6**: 178-188.
- Bentley SD & Parkhill J (2004) Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annual review of genetics* **38**: 771-792.
- Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.
- Bijlsma JJ, Gerrits MM, Imamdi R, Vandenbroucke-Grauls CM & Kusters JG (1998) Urease-positive, acid-sensitive mutants of *Helicobacter pylori*: urease-independent acid resistance involved in growth at low pH. *FEMS microbiology letters* **167**: 309-313.
- Boeker EA, E. E.; (1972) In "The Enzymes". (P Boyer, Ed), 3rd ed Academic Press, New York VI: 217-253.
- Bolger AM, Lohse M & Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114-2120.
- Boor KJ (2006) Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *PLoS biology* **4**: e23.
- Booth IR (2002) Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International journal of food microbiology* **78**: 19-30.
- Booth IR, Cash P & O'Byrne C (2002) Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 33-42.
- Bordeleau L, Prévost D, (1994) Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* **161**: 115-125.
- Boussau B, Karlberg EO, Frank AC, Legault BA & Andersson SG (2004) Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9722-9727.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brigido C & Oliveira S (2013) Most acid-tolerant chickpea mesorhizobia show induction of major chaperone genes upon acid shock. *Microbial ecology* **65**: 145-153.
- Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V & Steele JL (2010) Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of bacteriology* **192**: 2445-2458.
- Brockwell JP, A.; Holliday, R.A.; (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **31**: 211-219.
- Bromfield ES, Butler G & Barran LR (2001) Temporal effects on the composition of a population of *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus alba*. *Can J Microbiol* **47**: 567-573.
- Brown JL, Ross T, McMeekin TA & Nichols PD (1997) Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International journal of food microbiology* **37**: 163-173.

- Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP & Hobman JL (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS microbiology reviews* **27**: 145-163.
- Brunel B, Cleyet-Marel JC, Normand P & Bardin R (1988) Stability of Bradyrhizobium japonicum Inoculants after Introduction into Soil. *Applied and environmental microbiology* **54**: 2636-2642.
- Burton JC (1972) Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Agronomy* **15**: 229-246.
- Capitani G, De Biase D, Aurizi C, Gut H, Bossa F & Grutter MG (2003) Crystal structure and functional analysis of Escherichia coli glutamate decarboxylase. *The EMBO journal* **22**: 4027-4037.
- Castanie-Cornet MP & Foster JW (2001) Escherichia coli acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the gadA and gadBC glutamate decarboxylase genes. *Microbiology* **147**: 709-715.
- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF & Foster JW (1999) Control of acid resistance in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **181**: 3525-3535.
- Clements MO & Foster SJ (1999) Stress resistance in Staphylococcus aureus. *Trends in microbiology* **7**: 458-462.
- Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, et al. (2008) Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature methods* **5**: 613-619.
- Correa OB, A.; (1997) Cellular mechanisms of pH tolerance in Rhizobium loti. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 153.
- Cotter PA, Chepuri V, Gennis RB & Gunsalus RP (1990) Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in Escherichia coli is regulated by oxygen, pH, and the fnr gene product. *Journal of bacteriology* **172**: 6333-6338.
- Cotter PD, Gahan CG & Hill C (2001) A glutamate decarboxylase system protects Listeria monocytogenes in gastric fluid. *Molecular microbiology* **40**: 465-475.
- Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N & Mann M (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **13**: 2513-2526.
- Cox MM & Battista JR (2005) Deinococcus radiodurans - the consummate survivor. *Nature reviews Microbiology* **3**: 882-892.
- Croucher NJ & Thomson NR (2010) Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* **13**: 619-624.
- Curran TM, Lieou J & Marquis RE (1995) Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Applied and environmental microbiology* **61**: 4494-4496.
- Curtis TP, Sloan WT & Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10494-10499.
- Chang YY & Cronan JE, Jr. (1999) Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **33**: 249-259.
- Chao TC, Buhrmester J, Hansmeier N, Puhler A & Weidner S (2005) Role of the regulatory gene rirA in the transcriptional response of Sinorhizobium meliloti to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5969-5982.
- Chen H, Richardson AE & Rolfe BG (1993) Studies of the Physiological and Genetic Basis of Acid Tolerance in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii. *Applied and environmental microbiology* **59**: 1798-1804.
- Chen H, Gartner E & Rolfe BG (1993) Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **59**: 1058-1064.
- Cheville AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM & Kaspar CW (1996) rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in Escherichia coli O157:H7. *Applied and environmental microbiology* **62**: 1822-1824.
- Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS & Ames BN (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in Salmonella typhimurium. *Cell* **41**: 753-762.
- da-Silva JR, Alexandre A, Brígido C & Oliveira S (2017) Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia? *AIMS Microbiology* **3**: 365-382.
- Date R. A. HJ (1979) Selecting Rhizobium for acid, infertile soils of the tropics. *Nature* **277**: 3.
- de Lucena DK, Puhler A & Weidner S (2010) The role of sigma factor RpoH1 in the pH stress response of Sinorhizobium meliloti. *BMC microbiology* **10**: 265.
- Del Papa MF, Pistorio M, Balagué LJ, Draghi WO, Wegener C, Perticari A, Niehaus K & Lagares A (2003) A microcosm study on the influence of pH and the host-plant on the soil persistence of two alfalfa-nodulating rhizobia with different saprophytic and symbiotic characteristics. *Biology and Fertility of Soils* **39**: 112-116.
- Del Papa MF, Balague LJ, Sowinski SC, et al. (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central argentina and uruguay. *Applied and environmental microbiology* **65**: 1420-1427.
- Del Papa MF, Pistorio M, Draghi WO, et al. (2007) Identification and characterization of a nodH ortholog from the alfalfa-nodulating Or191-like rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 138-145.
- Demple B & Halbrook J (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in Escherichia coli. *Nature* **304**: 466-468.

- Devkota SR, Kwon E, Ha SC, Chang HW & Kim DY (2017) Structural insights into the regulation of *Bacillus subtilis* SigW activity by anti-sigma RsiW. *PLoS ONE* **12**: e0174284.
- Diez M, Zimmermann B, Borsch M, *et al.* (2004) Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase. *Nature structural & molecular biology* **11**: 135-141.
- Dilworth MJ & Glenn AR (1999) Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. *Novartis Found Symp* **221**: 4-14, discussion 14-18.
- Dilworth MJ, Rynne FG, Castelli JM, Vivas-Marfisi AI & Glenn AR (1999) Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology* **145 (Pt 7)**: 1585-1593.
- Dilworth MJ, Howieson JG, Reeve WG, Tiwari RP & Glenn AR (2001) *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**: 435.
- Dobereiner J (1970) Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Zweite naturwissenschaftliche Abt: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie* **124**: 224-230.
- Draghi WO, Del Papa MF, Pistorio M, Lozano M, de Los Angeles Giusti M, Torres Tejerizo GA, Jofre E, Boiardi JL & Lagares A (2010) Cultural conditions required for the induction of an adaptive acid-tolerance response (ATR) in *Sinorhizobium meliloti* and the question as to whether or not the ATR helps rhizobia improve their symbiosis with alfalfa at low pH. *FEMS Microbiol Lett* **302**: 123-130.
- Draghi WO, Del Papa MF, Hellweg C, *et al.* (2016) A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Sci Rep* **6**: 29278.
- Duke J (1983) *Handbook of Energy Crops*. Published only on the Internet, .
- Eardly BD, Hannaway DB & Bottomley PJ (1985) Characterization of Rhizobia from Ineffective Alfalfa Nodules: Ability to Nodulate Bean Plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.]. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1422-1427.
- Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Eichhorn E, van der Ploeg JR & Leisinger T (1999) Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **274**: 26639-26646.
- Evans CGT (1970) The continuous cultivation of microorganisms. II. Construction of a chemostat. *methods Microbiol* **2**.
- Farr SB & Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological reviews* **55**: 561-585.
- Feehily C & Karatzas KA (2013) Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of applied microbiology* **114**: 11-24.
- Feklistov A, Sharon BD, Darst SA & Gross CA (2014) Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annual review of microbiology* **68**: 357-376.
- Fenner BJ, Tiwari RP, Reeve WG, Dilworth MJ & Glenn AR (2004) *Sinorhizobium medicae* genes whose regulation involves the ActS and/or ActR signal transduction proteins. *FEMS Microbiol Lett* **236**: 21-31.
- Ferrero RL, Cussac V, Courcoux P & Labigne A (1992) Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *Journal of bacteriology* **174**: 4212-4217.
- Foster JW (1993) The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *Journal of bacteriology* **175**: 1981-1987.
- Foster JW (1999) When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current opinion in microbiology* **2**: 170-174.
- Foster JW (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature reviews Microbiology* **2**: 898-907.
- Foster JW & Hall HK (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **172**: 771-778.
- Foster JW & Hall HK (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **173**: 5129-5135.
- Foster JW & Moreno M (1999) Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. *Novartis Foundation symposium* **221**: 55-69; discussion 70-54.
- Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, *et al.* (2013) STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* **41**: D808-815.
- Fred EB, Baldwin IL & McCoy E (1932) Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. *University of Wisconsin* **343**.
- Fujihara S & Yoneyama T (1993) Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and environmental microbiology* **59**: 1104-1109.
- Gajiwala KS & Burley SK (2000) HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *Journal of molecular biology* **295**: 605-612.

- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF & Young ND (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant physiology* **137**: 1228-1235.
- Gilbert SF (2000) Control of Gene Expression at the Level of Translation. Developmental Biology 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Glenn AR & Dilworth MJ (1994) The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letters* **123**: 1-9.
- Gong S, Richard H & Foster JW (2003) YjdE (AdiC) is the arginine:Agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**: 4402-4409.
- Goodson MR, RJ (1989) Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Lett Appl Microbiol* **8**: 77-79.
- Gorden J & Small PL (1993) Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and immunity* **61**: 364-367.
- Goss R (1851) *Genre-Bilder aus den schleswig-holsteinischen Feldzügen von 1849 und 1850*. Leipzig,.
- Goss TJ, O'Hara GW, Dilworth MJ & Glenn AR (1990) Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *Journal of bacteriology* **172**: 5173-5179.
- Graham P (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol* **38**: 475-484.
- Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Aarons SR & Quinto C (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium trypici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 198-207.
- Graham PHV, S.E.; Mackie, F.; Vargas, A.T.; Palacios, A.; (1982) Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research* **5**.
- Griffitts JS, Carlyon RE, Erickson JH, Moulton JL, Barnett MJ, Toman CJ & Long SR (2008) A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol Microbiol* **69**: 479-490.
- Grkovic S, Brown MH & Skurray RA (2002) Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 671-701, table of contents.
- Guerrero-Castro J, Lozano L & Sohlenkamp C (2018) Dissecting the Acid Stress Response of *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Frontiers in microbiology* **9**: 846.
- Gunawardena HP, Feltcher ME, Wrobel JA, Gu S, Braunstein M & Chen X (2013) Comparison of the membrane proteome of virulent *Mycobacterium tuberculosis* and the attenuated *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strain by label-free quantitative proteomics. *Journal of proteome research* **12**: 5463-5474.
- Guo RT, Ko TP, Chen AP, Kuo CJ, Wang AH & Liang PH (2005) Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate: roles of the metal ion and conserved residues in catalysis. *The Journal of biological chemistry* **280**: 20762-20774.
- Haag AF, Balaban M, Sani M, et al. (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS biology* **9**: e1001169.
- Harrison PW, Lower RP, Kim NK & Young JP (2010) Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol* **18**: 141-148.
- He S, Zhou X, Shi C & Shi X (2016) Ethanol adaptation induces direct protection and cross-protection against freezing stress in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of applied microbiology* **120**: 697-704.
- Hecker M & Volker U (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in microbial physiology* **44**: 35-91.
- Helal HM & Sauerbeck D (1989) Carbon Turnover in the Rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **152**: 211-216.
- Hellweg C, Puhler A & Weidner S (2009) The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC microbiology* **9**: 37.
- Hengge-Aronis R (1993) Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**: 165-168.
- Herigstad B, Hamilton M & Heersink J (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* **44**: 121-129.
- Hersh BM, Farooq FT, Barstad DN, Blankenhorn DL & Slonczewski JL (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **178**: 3978-3981.
- Heunis T, Deane S, Smit S & Dicks LM (2014) Proteomic profiling of the acid stress response in *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of proteome research* **13**: 4028-4039.
- Hickey EW & Hirshfield IN (1990) Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1038-1045.
- Hijano EH & Basigalup DH (1995) *El cultivo de la alfalfa en la República Argentina*.

- Hilker R, Stadermann KB, Doppmeier D, Kalinowski J, Stoye J, Straube J, Winnebald J & Goesmann A (2014) ReadXplorer--visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinformatics* **30**: 2247-2254.
- Holt RA & Jones SJ (2008) The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome research* **18**: 839-846.
- Howieson J (1985) Use of an organic buffer for the selection of acid tolerant *Rhizobium meliloti* strains. *Plant and Soil* **88**: 367-376.
- Howieson J, Ewing M & D'Antuono M (1988) Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil* **105**: 179-188.
- Howieson JG (1985) Use of an organic buffer for the selection of acid tolerant *Rhizobium meliloti* strains. *Plant and Soil* **88**: 367-376.
- Huang R, Pan M, Wan C, Shah NP, Tao X & Wei H (2016) Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress. *Journal of dairy science* **99**: 1002-1010.
- Ibekwe A, Angle JS, Chaney RL, vanBerkum P, (1997) Enumeration and N₂ fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agriculture Ecosystems & Environment* **61**: 103-111.
- Jan G, Leverrier P, Pichereau V & Boyaval P (2001) Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Applied and environmental microbiology* **67**: 2029-2036.
- Jenkins DE, Schultz JE & Matin A (1988) Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **170**: 3910-3914.
- Jenkins DE, Chaisson SA & Matin A (1990) Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **172**: 2779-2781.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619-633.
- Jordan KN, Oxford L & O'Byrne CP (1999) Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3048-3055.
- Jordan SL, Glover J, Malcolm L, Thomson-Carter FM, Booth IR & Park SF (1999) Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Applied and environmental microbiology* **65**: 1308-1311.
- Kaberdin VR & Blasi U (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS microbiology reviews* **30**: 967-979.
- Kidd SP (2011) *Stress response in pathogenic bacteria*. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA.
- Kim H, Boor KJ & Marquis H (2004) *Listeria monocytogenes* sigmaB contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. *Infection and immunity* **72**: 7374-7378.
- Kim H, Marquis H & Boor KJ (2005) SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of inlA and inlB. *Microbiology* **151**: 3215-3222.
- Kjelleberg S (1993) Starvation in Bacteria. *Plenum Press, New York*.
- Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiological reviews* **47**: 1-45.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuán J, Drouin P & Amarger N (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**: 981-993.
- Laguerre G, Courde L, Nouaim R, Lamy I, Revellin C, Breuil MC & Chaussod R (2006) Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb Ecol* **52**: 426-435.
- Lange R & Hengge-Aronis R (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **5**: 49-59.
- Langmead B & Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357-359.
- Laranjo M, Alexandre A & Oliveira S (2014) Genes commonly involved in acid tolerance are not overexpressed in the plant microsymbiont *Mesorhizobium loti* MAFF303099 upon acidic shock. *Applied microbiology and biotechnology* **98**: 7137-7147.
- Leaphart AB, Thompson DK, Huang K, et al. (2006) Transcriptome profiling of *Shewanella oneidensis* gene expression following exposure to acidic and alkaline pH. *Journal of bacteriology* **188**: 1633-1642.
- Lehrer RI, Barton A & Ganz T (1988) Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J Immunol Methods* **108**: 153-158.
- Lei Z, Jian-ping G, Shi-qing W, Ze-yang Z, Chao Z & Yongxiong Y (2011) Mechanism of acid tolerance in a rhizobium strain isolated from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Can J Microbiol* **57**: 514-524.
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA & Booth IR (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO journal* **18**: 1730-1737.

- Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP & Cvitkovitch DG (2002) A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology* **184**: 2699-2708.
- Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL & Foster JW (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **177**: 4097-4104.
- Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN & Foster JW (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **62**: 3094-3100.
- Link AJ, Phillips D & Church GM (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *Journal of bacteriology* **179**: 6228-6237.
- Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM & Yates JR, 3rd (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature biotechnology* **17**: 676-682.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lodeiro AR, Gonzalez P, Hernandez A, Balague LJ & Favelukes G (2000) Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grown common beans. *Plant Sci* **154**: 31-41.
- Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Lowendorf HS, Baya AM & Alexander M (1981) Survival of *Rhizobium* in Acid soils. *Appl Environ Microbiol* **42**: 951-957.
- MacLean AM, Finan TM & Sadowsky MJ (2007) Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol* **144**: 615-622.
- Mahler R, McDole, R, (1987) Effect of soil pH on crop yield in northern Idaho. *Agron J* **79**: 751-755.
- Marschner H (2006) Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press, London*.
- Martikainen P DBW (1993) Nitrous oxide production and nitrification in acidic soil from a Dutch coniferous forest. *Soil Biol Biochem* **25**.
- Martin-Galiano AJ, Ferrandiz MJ & de la Campa AG (2001) The promoter of the operon encoding the FOF1 ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Molecular microbiology* **41**: 1327-1338.
- Maurer LM, Yohannes E, Bondurant SS, Radmacher M & Slonczewski JL (2005) pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **187**: 304-319.
- Mauri M & Klumpp S (2014) A model for sigma factor competition in bacterial cells. *PLoS computational biology* **10**: e1003845.
- Mellor RB (1989) Bacteroids in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis Inhabit a Plant Internal Lytic Compartment: Implications for other Microbial Endosymbioses. *Journal of Experimental Botany* **40**: 831-839.
- Merrell DS & Camilli A (1999) The cadA gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Molecular microbiology* **34**: 836-849.
- Meyer-Rosberg K, Scott DR, Rex D, Melchers K & Sachs G (1996) The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **111**: 886-900.
- Michaud R, Lehman WF & Rumbaugh MD (1988) *World distribution and historical development*. American Society of Agronomy, Madison, Wis., USA
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Miller RW, McRae, D. G. & Joy, K. (1991) Glutamate and gamma-aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**: 37-45.
- Mitchell JG & Kogure K (2006) Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS microbiology ecology* **55**: 3-16.
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani ME & Mhamdi R (2007) Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterraneuse) of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* **187**: 79-85.
- Morita RY (1997) Bacteria in oligotrophic environments : starvation-survival lifestyle. *Chapman and Hall, New York*.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L & Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5**: 621-628.
- Munns D (1986) Adv Plant Nutr. *1986* **2**: 63-91.
- Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG & Stahl F (2013) Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current opinion in biotechnology* **24**: 22-30.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M & Snyder M (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**: 1344-1349.
- Narberhaus F (2010) Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA biology* **7**: 84-89.

- Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC & Haynes PA (2011) Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* **11**: 535-553.
- Nonaka G, Blankschien M, Herman C, Gross CA & Rhodius VA (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes & development* **20**: 1776-1789.
- O'Hara GW & Glenn AR (1994) The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **161**: 286-292.
- Okoniewski MJ & Miller CJ (2006) Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. *BMC bioinformatics* **7**: 276.
- Oldroyd GE & Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519-546.
- Olson ER (1993) Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular microbiology* **8**: 5-14.
- Olson RV (1948) Iron solubility in soil as affected by pH and free iron oxide content. *Science Society of America Journal* **153**.
- Ong SE & Mann M (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology* **1**: 252-262.
- Orr HA (2009) Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* **10**: 531-539.
- Otto A, Becher D & Schmidt F (2014) Quantitative proteomics in the field of microbiology. *Proteomics* **14**: 547-565.
- Papadimitriou K, Alegria A, Bron PA, et al. (2016) Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**: 837-890.
- Park YK, Bearson B, Bang SH, Bang IS & Foster JW (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* **20**: 605-611.
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 180-201.
- Perticari A, Gauna AC, Pacheco Basurco JC, Piantanida NA, Dieguez RN & Brutti LN (1989) Encuesta sobre inoculación de leguminosas forrajeras en la República Argentina. *Divulgación Técnica del Instituto de Microbiología Agrícola CICA-INTA, Castelar, Argentina*.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Picard F, Dressaire C, Girbal L & Coccagn-Bousquet M (2009) Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. *Comptes rendus biologies* **332**: 958-973.
- Pierre O, Engler G, Hopkins J, Brau F, Boncompagni E & Herouart D (2013) Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell Environ* **36**: 2059-2070.
- Pijnenborg JWM, Lie TA & Zehnder AJB (1990) Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil: pH dynamics in the rhizosphere of seedlings growing in rhizotrons. *Plant and Soil* **126**: 161-168.
- Pinto AC, Melo-Barbosa HP, Miyoshi A, Silva A & Azevedo V (2011) Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res* **10**: 1707-1718.
- Priefer UB, Aurag J, Boesten B, et al. (2001) Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *Journal of biotechnology* **91**: 223-236.
- Puustinen A (1991) Properties of the Two Terminal Oxidases of *Escherichia coli*. *American Chemical Society* **30**.
- Quivey RG, Jr., Kuhnert WL & Hahn K (2000) Adaptation of oral streptococci to low pH. *Advances in microbial physiology* **42**: 239-274.
- Raja N, Goodson M, Smith DG & Rowbury RJ (1991) Decreased DNA damage by acid and increased repair of acid-damaged DNA in acid-habituated *Escherichia coli*. *The Journal of applied bacteriology* **70**: 507-511.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR & Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Molecular biology and evolution* **21**: 541-554.
- Reeve WG (2006) The *Sinorhizobium medicae* WSM419 lpiA gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology* **152**: 3049-3059.
- Reeve WG, Tiwari RP, Wong CM, Dilworth MJ & Glenn AR (1998) The transcriptional regulator gene phrR in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology* **144**: 3335-3342.
- Reeve WG, Tiwari RP, Kale NB, Dilworth MJ & Glenn AR (2002) ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Molecular microbiology* **43**: 981-991.
- Reeve WG, Tiwari RP, Worsley PS, Dilworth MJ, Glenn AR & Howieson JG (1999) Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. *Microbiology* **145**: 1307-1316.
- Reeve WG, Brau L, Castelli J, Garau G, Sohlenkamp C, Geiger O, Dilworth MJ, Glenn AR, Howieson JG & Tiwari RP (2006) The *Sinorhizobium medicae* WSM419 lpiA gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology* **152**: 3049-3059.

- Rektorschek M, Buhmann A, Weeks D, Schwan D, Bensch KW, Eskandari S, Scott D, Sachs G & Melchers K (2000) Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the Urel membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Molecular microbiology* **36**: 141-152.
- Reuber TL & Walker GC (1993) Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**: 269-280.
- Richard H & Foster JW (2004) *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of Bacteriology* **186**: 6032-6041.
- Richard HT & Foster JW (2003) Acid resistance in *Escherichia coli*. *Advances in applied microbiology* **52**: 167-186.
- Rincon-Zachary M (2010) A possible mechanism and sequence of events that lead to the Al³⁺-induced [Ca²⁺]_{cyt} transients and inhibition of root growth. *Plant Signal Behav* **5**: 881-884.
- Roe AJ, McLaggan D, Davidson I, O'Byrne C & Booth IR (1998) Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of bacteriology* **180**: 767-772.
- Rowbury RJ (1999) Acid tolerance induced by metabolites and secreted proteins, and how tolerance can be counteracted. *Novartis Foundation symposium* **221**: 93-106; discussion 106-111.
- Rowbury RJ (2001) Extracellular sensing components and extracellular induction component alarmones give early warning against stress in *Escherichia coli*. *Advances in microbial physiology* **44**: 215-257.
- Rowbury RJ (2003) Extracellular proteins as enterobacterial thermometers. *Science progress* **86**: 139-155.
- Royce TE, Rozowsky JS & Gerstein MB (2007) Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic acids research* **35**: e99.
- Sachs G, Shin JM, Munson K, Vagin O, Lambrecht N, Scott DR, Weeks DL & Melchers K (2000) Review article: the control of gastric acid and *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **14**: 1383-1401.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- San Millan A & MacLean RC (2017) Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology spectrum* **5**.
- Schade C, Flemstrom G & Holm L (1994) Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and -inhibited rat gastric mucosa. *Gastroenterology* **107**: 180-188.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schultz KM, Lundquist TJ & Klug CS (2017) Lipopolysaccharide binding to the periplasmic protein LptA. *Protein Sci* **26**: 1517-1523.
- Schumann W (2016) Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell stress & chaperones* **21**: 959-968.
- Shalit T, Elinger D, Savidor A, Gabashvili A & Levin Y (2015) MS1-based label-free proteomics using a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *J Proteome Res* **14**: 1979-1986.
- Shen Q, Soni KA & Nannapaneni R (2015) Stability of sublethal acid stress adaptation and induced cross protection against lauric arginate in *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology* **203**: 49-54.
- Shi X & Bennett GN (1994) Effects of rpoA and cysB mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **176**: 7017-7023.
- Siegele DA & Kolter R (1992) Life after log. *Journal of bacteriology* **174**: 345-348.
- Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Simon SA, Zhai J, Nandety RS, McCormick KP, Zeng J, Mejia D & Meyers BC (2009) Short-read sequencing technologies for transcriptional analyses. *Annual review of plant biology* **60**: 305-333.
- Sinha RP (1986) Toxicity of organic acids for repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **51**: 1364-1366.
- Skouloubris S, Thiberge JM, Labigne A & De Reuse H (1998) The *Helicobacter pylori* Urel protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infection and immunity* **66**: 4517-4521.
- Slonczewski JL & Foster JW (1996) pH-regulated genes and survival at extreme pH; in: *Escherichia coli* and Salmonella. *Cellular and Molecular Biology* 283-306.
- Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E & Slonczewski JL (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *Journal of bacteriology* **176**: 1729-1737.
- Smith DK, Kassam T, Singh B & Elliott JF (1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *Journal of bacteriology* **174**: 5820-5826.
- Stim-Herndon KP, Flores TM & Bennett GN (1996) Molecular characterization of adiY, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (adiA) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142** (Pt 5): 1311-1320.
- Storz G & Hengge-Aronis R (2000) Bacterial stress responses. *Washington, DC: ASM Press*.

- Su MS, Schlicht S & Ganzle MG (2011) Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microbial cell factories* **10** Suppl 1: S8.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* **45**: D362-D368.
- Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A & Conesa A (2011) Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* **21**: 2213-2223.
- Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA & Koonin EV (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**: 33-36.
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, et al. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC bioinformatics* **4**: 41.
- Teixeira-Gomes AP, Cloeckaert A & Zygmunt MS (2000) Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **68**: 2954-2961.
- Thompson SA & Blaser MJ (1995) Isolation of the *Helicobacter pylori* recA gene and involvement of the recA region in resistance to low pH. *Infection and immunity* **63**: 2185-2193.
- Tiwari RP, Reeve WG, Dilworth MJ & Glenn AR (1996) An essential role for actA in acid tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Microbiology* **142**: 601-610.
- Tiwari RP, Reeve WG, Dilworth MJ & Glenn AR (1996) Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system. *Microbiology* **142**: 1693-1704.
- Tiwari RP, Reeve WG, Fenner BJ, Dilworth MJ, Glenn AR & Howieson JG (2004) Probing for pH-regulated genes in *Sinorhizobium medicae* using transcriptional analysis. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **7**: 133-139.
- Tiwari RP, Reeve WG, Fenner BJ, Dilworth MJ, Glenn AR & Howieson JG (2004) Probing for pH-regulated genes in *Sinorhizobium medicae* using transcriptional analysis. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**: 133-139.
- Torres Tejerizo G, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, et al. (2016) *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L). *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Soria-Díaz ME, et al. (2011) The nodulation of alfalfa by the acid tolerant *Rhizobium* sp. strain LPU83 does not require sulfated forms of lipo-chitooligosaccharide nodulation signals. *J Bacteriol* **193**: 30-39.
- Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Draghi W, et al. (2011) First genomic analysis of the broad-host-range *Rhizobium* sp. LPU83 strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like *Rhizobium* sp. group. *Journal of biotechnology*.
- Tramonti A, Visca P, De Canio M, Falconi M & De Biase D (2002) Functional characterization and regulation of gadX, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *Journal of bacteriology* **184**: 2603-2613.
- Trinick MGJ (1980) The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relationship to the cross-inoculation group concept of legumes. *New Phytologist* **86**: 17-26.
- Triplett EW & Sadowsky MJ (1992) Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol* **46**: 399-428.
- Tschauner K, Hornschemeyer P, Muller VS & Hunke S (2014) Dynamic interaction between the CpxA sensor kinase and the periplasmic accessory protein CpxP mediates signal recognition in *E. coli*. *PloS one* **9**: e107383.
- Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K & Nakazawa T (1994) A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infection and immunity* **62**: 3586-3589.
- Tucker DL, Tucker N & Conway T (2002) Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **184**: 6551-6558.
- Tung WL & Chow KC (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**: 128-129.
- Tyanova S, Temu T & Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* **11**: 2301-2319.
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M & Cox J (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* **13**: 731-740.
- Typas A, Banzhaf M, Gross CA & Vollmer W (2011) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature reviews Microbiology* **10**: 123-136.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, et al. (2010) Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. *Science* **327**: 1122-1126.
- van Der Ploeg JR, Iwanicka-Nowicka R, Bykowski T, Hryniewicz MM & Leisinger T (1999) The *Escherichia coli* ssuEADCB gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *J Biol Chem* **274**: 29358-29365.

- Van Oudenhove L & Devreese B (2013) A review on recent developments in mass spectrometry instrumentation and quantitative tools advancing bacterial proteomics. *Applied microbiology and biotechnology* **97**: 4749-4762.
- van Vliet AH (2010) Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol Lett* **302**: 1-7.
- Vance CPH, G. H. (1991) Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 373-392.
- Vassileva V, Milanov G, Ignatov G, Nikolov & B (1997) Effect of low pH on nitrogen fixation of common bean grown at various calcium and nitrate levels. *J Plant Nutr* **20**.
- Vincent JM (1970) *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, Oxford.
- Vinuesa P, Neumann-Silkow F, Pacios-Bras C, Spaink HP, Martínez-Romero E & Werner D (2003) Genetic Analysis of a pH-Regulated Operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 Involved in Acid Tolerance and Nodulation Competitiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 159-168.
- Vogwill T & MacLean RC (2015) The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evolutionary applications* **8**: 284-295.
- von Uexküll HR & Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* **171**: 1-15.
- Wang AY & Cronan JE, Jr. (1994) The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Molecular microbiology* **11**: 1009-1017.
- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T & Long S (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* **327**: 1126-1129.
- Waterman SR & Small PL (1996) Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Molecular microbiology* **21**: 925-940.
- Waterman SR & Small PL (2003) Transcriptional expression of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance genes gadA and gadBC in an hns rpoS mutant. *Journal of bacteriology* **185**: 4644-4647.
- Watkin E (2003) Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 621-624.
- Wegener C, Schröder S, Kapp D, et al. (2001) Genetic uniformity and symbiotic properties of acid-tolerant alfalfa-nodulating rhizobia isolated from dispersed locations throughout Argentina. *Symbiosis* **30**: 141-162.
- Whitman WB, Coleman DC & Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6578-6583.
- Wibberg D, Tejerizo GT, Del Papa MF, Martini C, Pühler A, Lagares A, Schlüter A & Pistorio M (2014) Genome sequence of the acid-tolerant strain *Rhizobium* sp. LPU83. *Journal of biotechnology* **176C**: 40-41.
- Wilkins M (2009) Proteomics data mining. *Expert review of proteomics* **6**: 599-603.
- Wolters DA, Washburn MP & Yates JR, 3rd (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical chemistry* **73**: 5683-5690.
- Wood T (1986) Physiological Functions of the Pentose Phosphate Pathway. *Cell Biochemistry and function* **4**: 241-247.
- Yates JR, 3rd (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of mass spectrometry : JMS* **33**: 1-19.
- Yuan ZC, Liu P, Saenkhom P, Kerr K & Nester EW (2008) Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *Journal of bacteriology* **190**: 494-507.

