

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

Identificación de genes involucrados en la tolerancia y degradación de la micotoxina ácido fusárico en *Burkholderia ambifaria* T16.

Moiana, Mauro Hernán – LU 1018918

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Ruiz, Jimena

*Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales
(INBA-CONICET)*

Co-Tutor:

Prada, Federico

Universidad Argentina de la Empresa

Junio 23, 2017



1. Contenidos

1. Contenidos	2
1. Agradecimientos.....	5
2. Resumen.....	6
3. Abstract.....	7
4. Introducción.....	8
5.1. El género Burkholderia	8
5.1.1. Clasificación taxonómica y características.....	8
5.1.2. El complejo Burkholderia cepacia (Bcc).....	11
5.1.3. El rol de las especies del género Burkholderia en el biocontrol de fitopatógenos.....	14
5.2. El género Fusarium	16
5.2.1. Características	16
5.2.2. Producción de micotoxinas.....	17
5.2.2.1. El ácido fusárico	18
6. Objetivos	19
7. Antecedentes.....	20
8. Hipótesis.....	22
9. Materiales y métodos	23
9.1. Condiciones de cultivo y cepas utilizadas.....	23
9.2. Preparación de células competentes	26
9.3. Transformación de células competentes	26
9.4. Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (Miniprep)	27
9.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	27
9.6. Construcción de la biblioteca de transposición mediante conjugación bacteriana.....	27

9.7.	Selección de colonias incapaces de producir proteasas extracelulares.....	29
9.8.	Selección de colonias incapaces de utilizar AF como única fuente de carbono	30
9.9.	PCR arbitraria (PCR-AR)	30
9.9.1.	PCR-AR para clones incapaces de secretar proteasas extracelulares	32
a)	1ra ronda de PCR-AR	32
b)	2da ronda de PCR-AR.....	32
9.9.2.	PCR-AR para clones incapaces de crecer con AF como única fuente de carbono.	33
	Protocolo A.....	33
a)	1ra ronda de PCR-AR	33
b)	2da ronda de PCR-AR.....	33
	Protocolo B.....	34
c)	1ra ronda de PCR-AR	34
d)	2da ronda de PCR-AR.....	34
9.10.	Purificación de fragmentos de PCR y secuenciación	34
9.11.	Análisis de las secuencias de ADN obtenidas.	35
9.12.	Ensayo de crecimiento dual en placa.....	35
9.13.	Análisis estadístico	36
9.14.	Ensayo de actividad lecitinasa.....	36
10.	Anexo.....	37
11.	Resultados	41
11.1.	Construcción de una biblioteca de transposición en B. ambifaria mediante conjugación bacteriana.....	41
11.2.	Selección de colonias de B. ambifaria incapaces de producir proteasas extracelulares.....	43
11.2.1.	Mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5 Tel en las cepas de B. ambifaria con fenotipo proteasa extracelular negativo	45
11.2.2.	Evaluación del fenotipo lecitinasa en las mutantes para el sistema general de secreción (GSP) ...	47

11.2.3.	Evaluación de la capacidad de las clones de B. ambifaria con fenotipo proteasa negativo o proteasa leaky de inhibir el crecimiento de Fusarium oxysporum in vitro.	48
11.2.4.	Mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5Tel en B. ambifaria P12	51
11.3.	Selección de colonias de B. ambifaria incapaces de utilizar AF como única fuente de carbono	52
11.3.1.	Mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5Tel en las cepas de B. ambifaria incapaces de utilizar AF como fuente de carbono.	53
11.4.	Evaluación de la toxicidad del AF en las cepas de B. ambifaria incapaces de degradar AF... 56	
11.5.	Evaluación de la utilización de AF como única fuente de nitrógeno en las cepas de B. ambifaria incapaces de degradar AF.....	57
12.	Discusión.....	58
13.	Conclusiones	72
14.	Perspectivas Futuras	73
15.	Potencial aplicación biotecnológica.....	73
16.	Bibliografía	76

1. Agradecimientos

Agradezco encarecidamente a todo el grupo de trabajo del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA-CONICET), y en especial a la Dra. Jimena Ruiz que me dio la posibilidad de realizar este proyecto bajo su tutoría. A mis padres, por apoyarme en todo lo que he decidido hacer en la vida y por el esfuerzo que hicieron al darme una buena educación, los valores que hoy poseo y por inculcarme lo importante que es superarse a uno mismo. A mi hermana, por alentarme y ayudarme siempre que fuese necesario. A mi novia, por su paciencia infinita y por acompañarme todo este tiempo. Y finalmente a mis compañeros de trabajo del laboratorio de Hemostasia del Hospital Muñiz por permitirme aclarar inquietudes y formar parte de mi aprendizaje diario.

2. Resumen

El género *Fusarium* incluye diversos hongos fitopatógenos que afectan una gran variedad de cultivos, ocasionando importantes pérdidas económicas a nivel local y mundial. Dentro de las micotoxinas producidas por estos hongos se encuentra el **ácido fusárico** (AF). Este compuesto contribuye a la patogenicidad vegetal, y además de ser tóxico para células vegetales también presenta toxicidad para bacterias, animales y humanos. *Burkholderia ambifaria T16* es una bacteria aislada de la rizósfera de plantas de cebada que presenta la capacidad de inhibir el crecimiento de varias especies de *Fusarium in vitro* y de degradar y detoxificar AF. Los genes involucrados en la tolerancia y degradación al/del AF no han sido aún identificados en ninguna especie bacteriana. Los objetivos de este trabajo comprendieron la identificación de genes involucrados en la degradación y/o tolerancia de/al AF y en la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en *Burkholderia ambifaria T16*. Para cumplir con dichos objetivos, se construyó una biblioteca de inserciones por transposición, y se procedieron a analizar los fenotipos de interés en las colonias obtenidas (incapacidad para crecer con AF como única fuente de carbono o incapacidad para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* como resultado de la inserción del mini-transposón) para posteriormente identificar los genes interrumpidos. Los resultados obtenidos mostraron que varios genes de la vía del 2-metilcitrato o catabolismo del propionato son necesarios para la tolerancia y/o el crecimiento en presencia de AF como única fuente de carbono y energía. Asimismo, la interrupción de genes que codifican enzimas que generan metabolitos involucrados en las reacciones de degradación de propanoil-CoA o de ácidos grasos de cadena impar que generan propanoil-CoA también afectó la capacidad de *B. ambifaria* de crecer con AF como única fuente carbonada. Estos datos sugieren que el propionato podría ser un intermediario en la degradación de AF. Asimismo, nuestros resultados sugieren que el complejo Mla, responsable de mantener la asimetría lipídica en la membrana externa bacteriana sería imprescindible para la tolerancia de *Burkholderia ambifaria T16* al AF.

3. Abstract

Fusarium genus includes several fungal phytopathogens which infects a big variety of crops, causing important economic losses locally and worldwide. Fusaric acid (FA) is one of the mycotoxins produced by these fungi. This compound contributes to plant pathogeny and besides being toxic for plant cells, is also toxic to bacteria, animals and humans. ***Burkholderia ambifaria T16*** is a bacteria isolated from the rhizosphere of barley plants, which has shown the capability to inhibit *Fusarium spp.* growth in vitro, as well as the ability to degrade and detoxify FA. Genes involved in FA degradation and/or tolerance have not been identified so far. The aims of this work were the identification of genes involved in FA degradation and/or tolerance, and in growth inhibition of *Fusarium oxysporum* in ***Burkholderia ambifaria T16***. To fulfill these objectives, an insertion transposon library was constructed to later identify the genes disrupted by the mini-transposon in the colonies with interesting phenotypes (incapability to growth with FA as sole carbon and energy source or incapability to inhibit growth of *Fusarium oxysporum* as a result of mini-transposon insertion). The results shown that genes involved in 2-methylcitrate cycle or propionate catabolism are essential to growth with FA as sole carbon source and/or to tolerate the presence of this compound. Besides, the interruption of genes encoding enzymes which synthesize metabolites involved in propanoyl-CoA degradation pathways or odd chain fatty acid degradation (which generates propanoyl-CoA) also affected the capability of ***B. ambifaria*** to grow with FA as sole carbon source. These data suggest that propionate could be an intermediate of FA degradation. Moreover, our results shown that the MIIa complex, responsible for maintaining the asymmetric lipidic structure of the bacterial outer membrane would be essential for FA tolerance in ***Burkholderia ambifaria T16***.

4. Introducción

5.1. El género *Burkholderia*

5.1.1. Clasificación taxonómica y características

El género *Burkholderia* pertenece a la clase *Beta proteobacteria* dentro del *phylum Proteobacteria*. La primera bacteria perteneciente a este género fue aislada en 1940 por Walter Burkholder, a partir de bulbos de cebolla (Burkholder 1950). Al momento de su aislamiento, Burkholder propuso para esa bacteria el nombre de *Pseudomonas cepacia*. En los años 80, con la llegada de las técnicas de secuenciación que permitieron secuenciar los genes conservados de rDNA, se revisó la clasificación taxonómica y la nomenclatura de varios géneros de bacterias, entre ellos el género *Pseudomonas*. *Pseudomonas cepacia* y otras seis especies de *Pseudomonas* pertenecientes al grupo derDNA de homología II (*Pseudomonas solana cearum*, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei* y *Pseudomonas caryophylli*) (Palleroni, Kunisawa et al. 1973) se transfirieron a un nuevo género que se denominó *Burkholderia* (Yabuuchi, Kosako et al. 1992). Posteriormente, se fueron agregando al género *Burkholderia* otras especies originalmente pertenecientes al género *Pseudomonas* (Urakami, Itoyoshida et al. 1994, Gillis, Vanvan et al. 1995). Hasta el momento, el género *Burkholderia* consta de casi cien especies (Depoorter, Bull et al. 2016). Sin embargo, los análisis de las secuencias de rDNA 16S disponibles en las bases de datos, sugieren que, todavía, serían muchas las especies de *Burkholderia* que esperan su descripción formal.

Las especies que componen el género *Burkholderia* son filogenéticamente diversas y se agrupan en diversos linajes de acuerdo a la secuencia de rDNA 16S (**Figura 1**). El primer grupo filogenético comprende a la especie tipo, *Burkholderia cepacia*, y se compone de todas las especies del grupo **Bcc** (*Burkholderia cepacia complex*), las cuales serán descritas en el apartado siguiente. Un segundo grupo filogenético (grupo *B. pseudomallei*) incluye a los microorganismos patógenos *B. mallei* y *B. pseudomallei*, agentes causantes de las

enfermedades conocidas como muermo (Whitlock, Estes et al. 2007) y melioidosis (Chen, Laevens et al. 2001), respectivamente. Por otro lado, el grupo *B. glathei*, incluye a especies aisladas de hábitats muy diversos, tales como suelos contaminados con compuestos aromáticos (Shibata, Maeda et al. 2013, Fislage, Wauters et al. 2016), hongos (Yim, Moukadiri et al. 2006), intestino de insectos (Shibata, Maeda et al. 2013) y plantas (Moukadiri, Prado et al. 2009). El grupo *B. xenovorans* comprende alrededor de 40 especies de bacterias asociadas a plantas, muchas de las cuales son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Estas bacterias son beneficiosas para las especies vegetales a las cuales se encuentran asociadas (Vetter and Wittinghofer 2001). Por último, existen varias especies que, en base a su secuencia de rDNA 16S, no se agrupan con ninguno de los grupos filogenéticos mencionados. Estas son: *B. rhizoxinica* y *B. endofungorum*, endosimbiontes del hongo fitopatógeno *Rhizopus microsporus* (Meyer, Scrima et al. 2008), y el grupo de *B. caryophylli* (patógeno de cebollas) (Ballard, Palleroni et al. 1970), *B. symbiotica* (endosimbionte de especies de *Mimosa*) (Astrom and Bystrom 1994) y *B. soli* (aislada de suelo) (Putz, Florentz et al. 1994).

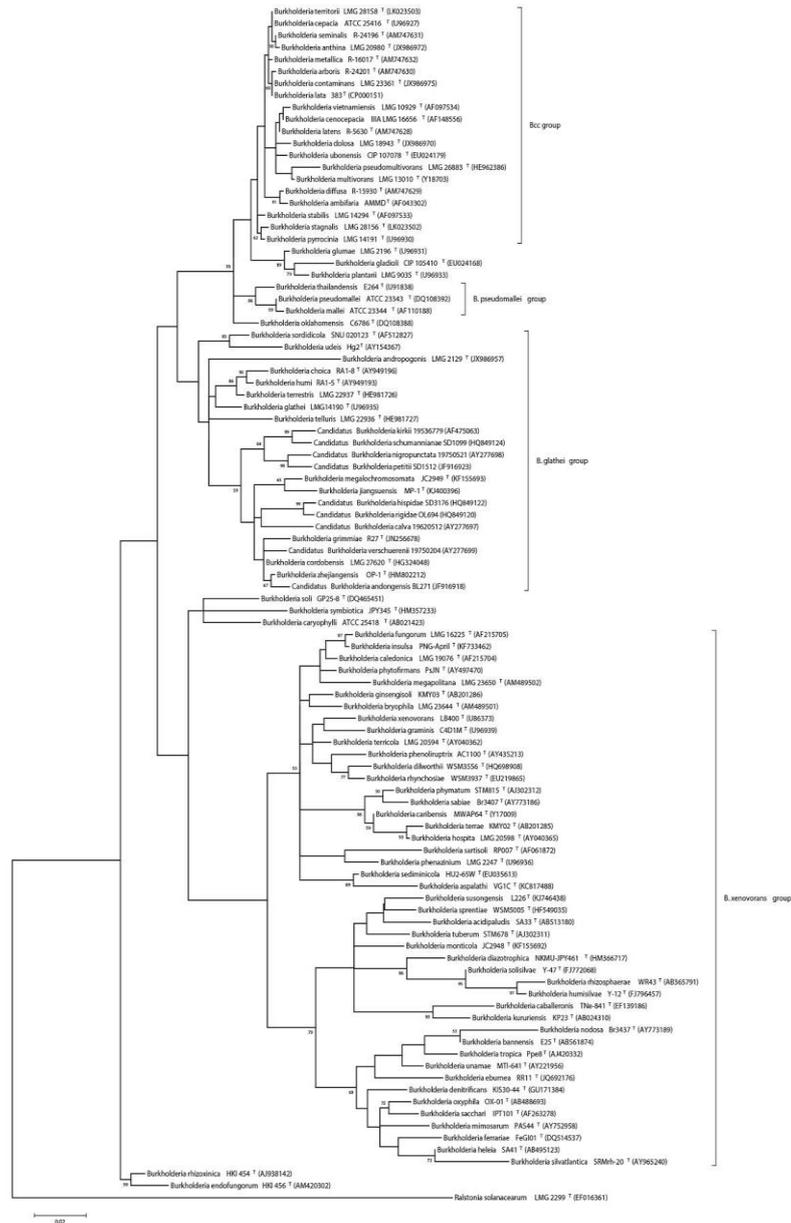


Figura 1. Árbol filogenético del género *Burkholderia* construido en base a las secuencias parciales del gen 16S rDNA. Tomado de Depoorter, Bull *et al.* 2016

Las bacterias del género *Burkholderia* son habitantes comunes del suelo y la rizósfera, y su distribución biogeográfica es dependiente del pH del suelo, ya que se las encuentra presentes en densidades mucho más elevadas en suelos ácidos que en suelos alcalinos (Stopnisek, Bodenhausen et al. 2014, Tago, Itoh et al. 2014, Hall, Busch et al. 2015, Sermswan, Royros et al. 2015). Asimismo, tal como se detalló en el párrafo anterior existen varias especies de *Burkholderia* que conviven con hongos (en interacciones antagonistas o mutualistas), los cuales normalmente prefieren ambientes ácidos (Stopnisek, Zühlke et al. 2016).

Otra característica importante de estas bacterias es la asociación de algunas especies de *Burkholderia* con plantas. Durante los últimos años, se han aislado numerosas especies de *Burkholderia* asociadas con plantas que han mostrado distintos grados de dependencia, incluyendo interacciones simbióticas (Weisskopf, Heller et al. 2011).

5.1.2. El complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc)

El complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) está compuesto de aproximadamente 20 especies (**Figura 1**), aisladas en su mayoría de hábitats naturales como suelo o rizósfera de diversas especies vegetales (Fiore, Laevens et al. 2001, Miller, LiPuma et al. 2002, Vermis, Brachkova et al. 2003). Sin embargo, muchas de las especies pertenecientes a este grupo han surgido también como patógenos oportunistas capaces de causar infecciones importantes en pacientes con fibrosis quística pulmonar (Isles, Maclusky et al. 1984). Las especies de este grupo poseen un potencial biotecnológico muy interesante, debido a su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas y compuestos bioactivos, los cuales están involucrados en la estimulación del crecimiento vegetal, la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos y la degradación de diversos contaminantes tóxicos.

Por estos motivos, muchas de las especies del grupo **Bcc** se han utilizado como agentes de control biológico, como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) o bien en procesos de biorremediación en ambientes contaminados con xenobióticos (**Tablas 1**

y 2). Sin embargo, debido a los problemas relacionados con las infecciones oportunistas en pacientes con fibrosis quística (Speert 2001), actualmente existe mucha cautela en cuanto a su utilización y liberación al medio ambiente (<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-TOX/2003/June/Day-13/t15010.htm> 2003).

Especie	Fuente	Actividad PGPR y/o biocontrol	Biorremediación	Frecuencia de recuperación de pacientes con fibrosis quística (%)	Transmisión a través de pacientes con fibrosis quística
<i>B. ambifaria</i>	Rizósfera, suelo y humanos	+	ND	<1	NR
<i>B. anthina</i>	Rizósfera, suelo, agua y humanos	ND	ND	<1	NR
<i>B. cenocepacia</i>	Rizósfera, suelo, agua y humanos	+	ND	45,6	+
<i>B. cepacia</i>	Cebolla, rizósfera, suelo, agua y humanos	+	+	3,1	+
<i>B. dolosa</i>	Rizósfera y humanos	ND	ND	3,8	+
<i>B. multivorans</i>	Rizósfera, suelo, agua y humanos	ND	ND	38,7	+
<i>B. vietnamiensis</i>	Rizósfera, suelo, agua y humanos	+	+	5,9	NR

Abreviaturas: ND: No determinado; NR: no reportado; +: actividad o propiedad reportada

Tabla 1. Características de algunas especies del grupo **Bcc**. Tomado de Chiarini, Bevivino *et al.* 2006.

Especie	Cepa	Origen	Degradación de sustratos o actividad	Referencias
Biorremediación				
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC17759 (LMG2161)	Suelo forestal (Trinidad)	4-fluorobenzoato, 4-hidroxibenzoato, benceno, fenol, tolueno, meta-cresol, fenol, orto-cresol.	(Schlomann, Schmidt et al. 1990)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	G4 (ATCC53617; R1808)	Cloacas (USA)		(Fries 1997) y (Tran, Berge et al. 2000)
Biocontrol				
<i>Burkholderia ambifaria</i>	RAL-3	Rizósfera de maíz	Actividad PGPR y biocontrol de hongos (especies de <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Botritis</i> y <i>Rhizoctonia</i>)	(Pedersen, M.S. et al. 1999)
<i>B.cenocepacia</i>	BC-1	Rizósfera de maíz	Biocontrol de hongos (<i>Pythium</i>) en semillas de maíz	(Mao, Lunnsden et al. 1998)
<i>B. vietnamiensis</i>	LMG10925 (TVV75)	Rizósfera de arroz (Vietnam)	Actividad PGPR en arroz	(Trân Van, Berge et al. 2000)

Tabla 2. Cepas del grupo **Bcc** con propiedades útiles para la biotecnología. Tomado de Chiarini, Bevivino *et al.* 2006.

Dentro del **Bcc**, se encuentra *Burkholderia ambifaria*, la especie bacteriana utilizada en este trabajo. Esta especie se describió por primera vez en el año 2001 (Coenye, Mahenthalingam et al. 2001). El nombre *ambifaria* proviene del latín *ambifarius*: “que posee dos caras”, debido a que las cepas pertenecientes a esta especie pueden ser potencialmente utilizadas para control biológico, pero también se han aislado algunos ejemplares de secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística pulmonar (Coenye, Mahenthalingam *et al.* 2001). Cabe destacar que de todas las especies del **Bcc**, *B. ambifaria* es la que se encuentra más frecuentemente en la rizósfera, y que únicamente una minoría de los pacientes infectados con **Bcc** presenta esta especie (Ramette, Li Puma et al. 2005, Reik, Spilker et al. 2005). Este hecho, sumado a la gran variedad de compuestos con actividad

antifúngica producidos por esta bacteria, provocaron un gran interés por el estudio de la misma en los últimos años.

5.1.3. El rol de las especies del género *Burkholderia* en el biocontrol de fitopatógenos

Desde principios del siglo XXI, la humanidad ha estado enfrentando desafíos en relación a los cambios climáticos y a la crisis energética (Muller , Schmidhuber et al. 2008). La población humana se encuentra en un continuo crecimiento y la producción de alimentos debe incrementarse para asegurar el acceso a alimentos sanos en cantidades suficientes. Para cumplir con la demanda creciente de alimento, actualmente la agricultura se basa en la utilización de plaguicidas y fertilizantes químicos que permiten aumentar los rendimientos de producción. Sin embargo, la utilización de estos productos es nociva para el medio ambiente y la aplicación continua de plaguicidas químicos promueve la aparición de fitopatógenos resistentes. Ante este panorama, uno de los desafíos en el campo de la agricultura es investigar e implementar alternativas sustentables basadas en los mecanismos que tienen lugar en la naturaleza para el control de plagas. Entre estas alternativas se encuentra la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol de fitopatógenos, los cuales son capaces de suprimir patógenos o disminuir el daño causado por ellos (Elsas, Jansson et al. 2007).

La efectividad de las bacterias del género *Burkholderia*, en particular las del grupo **Bcc**, como agentes de biocontrol de fitopatógenos y PGPR está basado en sus amplias propiedades beneficiosas, entre las que se incluyen la producción de ácido indolacético (hormona vegetal que estimula el desarrollo de los frutos) (Jiang, Sheng et al. 2008), la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico (Suarez-Moreno, Caballero-Mellado et al. 2012) y la capacidad de producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, antibacteriales, insecticidas o herbicidas (Cimermanic, Medema et al. 2014). Entre estos compuestos podemos mencionar la pirrolnitrina (el-Banna and Winkelmann 1998), la cepafungina (Schellenberg, Bigler et al. 2007), la cepacina (Parker, Rathnum et al. 1984), la

occidiofungina (Lu, Novak et al. 2009), la burkholdelina (Tawfik, Jeffs et al. 2010) y la enaciloxinaIIa (Mahenthiralingam, Song et al. 2011).

Durante la década del '90, se registraron varias cepas pertenecientes al grupo **Bcc** en la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) debido a su capacidad de producción de compuestos con potente actividad antifúngica (Vial, Groleau et al. 2007), para su utilización como agentes de biocontrol de diversos hongos fitopatógenos. Sin embargo, teniendo en cuenta el riesgo potencial que poseen estas cepas para la salud, los productos fueron retirados del mercado. Como alternativa se pensó en reemplazar a las cepas del grupo **Bcc** por cepas del grupo **B. xenovorans**, las cuales hasta el momento no han sido asociadas con infecciones en humanos. Sin embargo, hasta el momento, sólo tres especies de este grupo, **B. phenazinum**, **B. megapolitana** y **B. bryophila** han demostrado actividad antifúngica moderada (Vandamme, Opelt et al. 2007).

Entre las especies que poseen capacidad de promoción del crecimiento de las plantas (PGPR) y actividad de biocontrol de hongos fitopatógenos se encuentra **B. ambifaria**. Esta especie ha demostrado ser capaz de inhibir una gran variedad de hongos fitopatógenos, entre los cuales se encuentran *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Erysiphe graminis* y *Puccinia recondite* (Li, Roberts et al. 2002, Chul-Hoon, Kim et al. 2004). Asimismo, esta bacteria también posee actividad antimicrobiana contra diversos patógenos Gram negativos, como *Acinetobacter baumannii* y otras especies del grupo **Bcc** como **B. multivorans** y **B. dolosa** (Mahenthiralingam, Song et al. 2011). El compuesto responsable de esta actividad ha sido identificado como enacyloxinaIIa, un antibiótico macrólido poco común (Parmeggiani, Krab et al. 2006). Asimismo, **B. ambifaria** también sintetiza burkholdelinas, lipopéptidos que presentan potente actividad antifúngica (Tawfik, Jeffs et al. 2010) y pirrolnitrinas, efectivos contra hongos fitopatógenos como **R. solani** y *Fusarium spp.*, levaduras como *C. albicans* y diversas bacterias Gram negativas (Burkhead, Schisler et al. 1994, El-Banna and Winkelmann 1998, Hwang, Chilton et al. 2002). Por último, **B. ambifaria** produce diversos compuestos volátiles que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* y **R. solani** (Groenhagen,

Baumgartner et al. 2013). Además de presentar actividad fungicida, también se ha demostrado que estos compuestos incrementan la biomasa en plantas como *Arabidopsis thaliana*, así como la resistencia a antibióticos en *E. coli* (Groenhagen, Baumgartner et al. 2013).

5.2. El género *Fusarium*

5.2.1. Características

Se denomina *Fusarium* a un género de hongos filamentosos ampliamente distribuido a nivel mundial. Entre los miembros de este género se incluyen varios fitopatógenos. *F. graminearum* y *F. verticillioides* son los principales responsables de la podredumbre de la espiga junto con el tallo de la planta de maíz, la cual produce importantes daños, tanto mundialmente como a nivel local en la región del Centro y Noroeste Argentino (Lori, Sisterna et al. 2003, Reynoso and S. N. Chulse 2009). Asimismo, la enfermedad comúnmente conocida como “plaga de la cabeza”, es causada por varias especies de *Fusarium*. Esta infección provoca severas pérdidas económicas en la producción de cereales. En nuestro país, las pérdidas del rendimiento debido a esta plaga se encuentran entre el 20 y 50% (Stenglein 2009). Cabe destacar que en la Argentina también se ha reportado la existencia de asociación patogénica *F. graminearum*-Soja (Pioli, Mizzoni et al. 2004). Otras especies de *Fusarium* que causan importantes pérdidas económicas son *F. oxysporum* y *F. solani*. *F. oxysporum* existe como patógeno especializado, denominado *forma especial* (*f. sp*) según la/s planta/s hospedante/s que afecte. Este hongo es capaz de infectar más de un centenar de especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, entre ellas tomate, papa, y banana (Bosland 1998). En los últimos años, *F. oxysporum* se ha encontrado en Argentina como agente etiológico responsable del marchitamiento de la lechuga y el decaimiento del perejil (Malbrán , Mourelos et al. 2014, Lori, Malbrán et al. 2016). Por otra parte, *Fusarium solani* infecta predominantemente papa, leguminosas y miembros de la familia de las cucurbitáceas. Junto con *F. oxysporum* esta especie ha sido responsable del decaimiento y colapso en plantas de orégano, enfermedad que ha alcanzado una incidencia entre 7-23% (Gaetán, Madia et al. 2007).

En particular, *F. oxysporum* juega el rol de un “asesino silencioso”, ya que las cepas patógenas de este hongo pueden permanecer “dormidas” por 30 años antes de ser virulentas e infectar a la planta. Este hongo es famoso por causar el marchitamiento de la planta antes de que produzca algún signo de infección. Cabe destacar, que *F. oxysporum* es capaz de infectar casi cualquier cultivo. Las esporas de este hongo son capaces de sobrevivir en el aire por largos periodos de tiempo. No solo es un problema para los agricultores por las pérdidas económicas que ocasiona sino, además, es increíblemente difícil de erradicar. El método más efectivo es la esterilización del suelo el cual es un método muy costoso para la mayoría de agricultores (<http://www.sciweb.nybg.org/science2/hcol/fusarium3.asp>).

5.2.2. Producción de micotoxinas

Un aspecto relevante relacionado con la presencia de especies de *Fusarium* en plantas, es la toxicidad entre media y alta que poseen las diversas micotoxinas producidas por estos hongos, tanto para humanos como para animales (Nelson, Dignani et al. 1994, Wang and Ng 1999, Desjardins 2006, Simonetti, M. Montecchia et al. 2013). Las micotoxinas, por su peligrosidad para el consumo, se han clasificado como el factor de riesgo dietético crónico más importante, por encima de los contaminantes sintéticos, toxinas vegetales, aditivos alimentarios o inclusive residuos de plaguicidas (Kuiper-Goodman 1998). Es allí donde la investigación desarrollada en el área de las micotoxinas ha comprendido tradicionalmente el análisis de la presencia de tales compuestos en alimentos y forrajes, y sus efectos en la salud humana y cría de animales. Sin embargo, el impacto de las micotoxinas en el ambiente y los peligros de su prevalencia han sido poco investigadas. Se ha reportado presencia de micotoxinas producidas por *Fusarium spp.* en aguas de drenaje y suelo de campos de trigo y maíz infectados con estos hongos, dando como resultado una detección frecuente y ocasional de estas micotoxinas en aguas de ríos cercanos (Schenzel, Forrer et al. 2012). Por lo tanto, la escorrentía de los campos agrícolas es una fuente significativa de micotoxinas en las aguas superficiales.

5.2.2.1. El ácido fusárico

Entre las micotoxinas producidas por numerosas especies de hongos del género *Fusarium*, se encuentra el ácido fusárico (AF, ácido 5-butilpicolínico) (**Figura 2**) (Bacon, Porter et al. 1996). Este metabolito secundario contribuye a la patogenia de las enfermedades producidas por *Fusarium spp.* en diversos cultivos (Pegg 1981), siendo además un contaminante frecuente de alimentos y forrajes a base de cereales, que posee efectos nocivos para la salud humana y animal (Wang and Ng 1999).

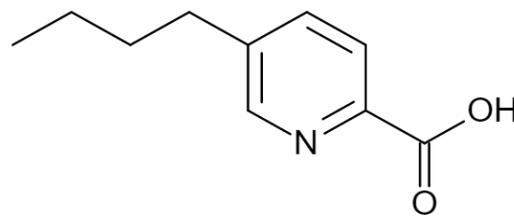


Figura 2. Estructura química del ácido fusárico.

La producción de AF y su correlación con la patogenia, se han estudiado en cepas de *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, y *F. solani* (Pegg 1981, El-Hassan, El-Saman et al. 2007). En la mayoría de los casos se detectó una correlación positiva entre la producción de AF y la virulencia de las cepas de *Fusarium* estudiadas. Las distintas formas especiales de *F. oxysporum* mostraron los mayores rendimientos de producción de AF, así como la mayor virulencia (Pegg 1981, El-Hassan, El-Saman et al. 2007, Selim and El-Gammal 2015). Se han encontrado cantidades elevadas de AF en plantas infectadas con diversas especies de *Fusarium* en tejidos, frutos, granos de cereales y semillas (Kalyanasundaram and Venkata Ram 1956, Kalyanasundaram 1958, Bacon and Hinton 1996, Bacon, Porter et al. 1996, Li, Zuo et al. 2013). Asimismo, también se encontró una interacción sinérgica entre el AF y otras micotoxinas con elevada toxicidad como las fumonisinas y el deoxinivalenol (Smith 1992, Bacon, Porter et al. 1995). Estos resultados resaltan la importancia de la contaminación por AF en la salud humana y animal.

Con respecto a los efectos del AF en distintos tipos de células, se ha demostrado que en células vegetales el AF inhibe la respiración celular (Marré, Vergani et al. 1993), afecta la permeabilidad y el potencial de membrana (Gaumann 1958, Koehler and Bentrup 1983, Pavlovkin, Mistrik et al. 2004) e incrementa el nivel de especies reactivas de oxígeno (Kuzniak 2001). Por otro lado, también se ha demostrado que el AF es tóxico para bacterias con capacidades de biocontrol de *Fusarium spp* (principalmente para aquellas del género *Bacillus*) (Landa, Cachinero-Diaz et al. 2002), y disminuye marcadamente la capacidad de distintas especies del género *Pseudomonas* de producir sustancias antifúngicas involucradas en el biocontrol de estos fitopatógenos (Schnider-Keel, Seematter et al. 2000, Landa, Cachinero-Diaz et al. 2002, Notz, Maurhofer et al. 2002, Duffy, Keel et al. 2004, van Rij, Wesselink et al. 2004, van Rij, Girard et al. 2005, Bacon, Hinton et al. 2006, Ruiz, Bernar et al. 2015), lo cual estaría indicando que la micotoxina reduce la eficacia de biocontrol de las bacterias.

6. Objetivos

F. oxysporum es una especie de hongo cosmopolita, cuyas cepas patógenas especializadas (*f. sp.*) son las agentes causantes de las enfermedades de marchitamiento y decaimiento de una gran variedad de cultivos. Dado que *F. oxysporum* se encuentra universalmente presente en el suelo y es uno de los mayores productores de AF, la probabilidad de encontrar cepas productoras de AF en casi cualquier muestra de suelo es muy alta (Notz, Maurhofer et al. 2002).

Los efectos negativos de los fitopatógenos del género *Fusarium* en los cultivos y del AF en las plantas y en el control biológico de enfermedades causadas por *Fusarium spp.*, plantean la necesidad de la búsqueda de nuevas estrategias que puedan responder a esta problemática. En nuestro laboratorio hemos aislado a partir de la rizósfera de cebada de la localidad de Junín (Pcia. de Buenos Aires), una cepa identificada como *Burkholderia ambifaria* y denominada *Burkholderia ambifaria* T16. Esta cepa mostró la interesante y particular capacidad de degradar AF (tanto *in vitro*, como *in planta*), ya que puede utilizarlo

como fuente de carbono, nitrógeno y energía; así como también de inhibir *in vitro* el crecimiento de varias cepas de *Fusarium* (Roberts, Ottaviano et al. 2013, Roberts, Ottaviano et al. 2014, Ottaviano 2015). En este trabajo se construyó una biblioteca de mutantes por transposición con el objetivo de identificar genes involucrados en la degradación de AF y en la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Dado que la producción de proteasas extracelulares es un mecanismo que se ha ligado al metabolismo secundario (Pugsley 1991), los cuales son los responsables de la inhibición del crecimiento de muchos hongos y que el método de selección del fenotipo de proteasas permite evaluar muchas colonias, decidimos seleccionar primeramente colonias deficientes en la producción de proteasas extracelulares para posteriormente evaluar si en las mismas se encontraba afectada la inhibición de *F. oxysporum*.

En la siguiente sección de este informe se describen los antecedentes y trabajos previos que nuestro grupo de trabajo y otros investigadores han realizado sobre los temas relacionados con esta investigación.

7. Antecedentes

Genes presuntamente involucrados en la tolerancia y detoxificación de AF (genes *fus*) fueron identificados previamente en *Burkholderia cepacia* y *Klebsiella oxytoca* mediante transformación de *E. coli* con una biblioteca genómica proveniente de dichas bacterias y posterior selección de clones con elevada resistencia a AF (Toyoda, Katsuragi et al. 1991, Utsumi, Yagi et al. 1991). Los clones con elevada resistencia al AF portaban genes codificantes de proteínas con alta similitud con sistemas de exportación que intervienen en la resistencia a antibióticos, biocidas, colorantes, detergentes, y moléculas involucradas en la comunicación célula-célula (Schweizer 2003). Si bien la transformación de *E. coli* con plásmidos portando estos genes incrementó la resistencia de esta bacteria al AF, dichos plásmidos no confirieron la capacidad de utilizar AF como única fuente de carbono, por lo cual el rol de los genes y su relación con el AF aún no ha sido esclarecido.

Teniendo en cuenta los efectos negativos del AF en la eficiencia de biocontrol en cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* con capacidad de supresión de enfermedades causadas por *Fusarium spp*, y con el objetivo de aislar bacterias con capacidad de biocontrol, y a su vez, de degradación de AF, se realizaron en el año 2012 aislamientos provenientes de la rizósfera de plantas de cebada cultivadas en la localidad de Junín (Pcia. de Buenos Aires). Se utilizaron protocolos de aislamiento con medios selectivos para los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*, debido a que estos microorganismos son habitantes naturales de la rizósfera y se caracterizan por su alta versatilidad metabólica, así como también por su capacidad para producir compuestos con propiedades antifúngicas (Parke and Gurian-Sherman 2001, Haas and Defago 2005). Se obtuvieron un total de aproximadamente 300 aislamientos y se analizó la capacidad de los mismos para crecer en un medio mínimo conteniendo AF como única fuente de carbono y energía, lo cual indicaba la capacidad para degradar este compuesto. Una cepa originalmente aislada en medio TBT selectivo para *Burkholderia* (Hagedorn, Gould et al. 1987) fue capaz de crecer utilizando AF como única fuente de carbono. En base a la secuenciación del 16S rDNA y de los genes *recA* y *gyrB*, dicha cepa fue identificada como perteneciente a la especie *Burkholderia ambifaria* y denominada *B. ambifaria* T16. La cuantificación del contenido de AF presente en el sobrenadante de los cultivos de *B. ambifaria* T16 cultivada en medio mínimo con AF como única fuente de carbono demostró que la cantidad de esta micotoxina disminuyó un 80% luego de 20 hs de crecimiento a 30°C y era indetectable luego de 24hs, cuando la bacteria alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento.

Como se mencionó previamente, el AF es tóxico para las células vegetales y responsable del marchitamiento de varios cultivos. Los resultados descriptos en el párrafo anterior demostraron que *B. ambifaria* T16 era capaz de crecer utilizando AF como única fuente carbonada y que, conjuntamente con el crecimiento de la bacteria, se observaba una disminución en el contenido de AF en el sobrenadante de los cultivos. Estos datos llevaron a hipotetizar que si *B. ambifaria* era capaz de degradar AF, su inoculación en semillas de cebada incubadas en presencia de la micotoxina podría disminuir los efectos tóxicos del AF

en las plántulas de cebada. Para poner a prueba esta hipótesis, se realizaron cultivos de *B. ambifaria* T16 en medio mínimo suplementado con AF como única fuente de carbono y se incubaron distintas concentraciones de bacterias con semillas de cebada pre-germinadas. Posteriormente, las semillas se colocaron sobre placas de Petri con papel humedecido, tanto en ausencia como en presencia de distintas concentraciones de AF, y se dejaron crecer durante 48hs. Los resultados demostraron que la inoculación de las semillas con *B. ambifaria* T16 fue capaz de suprimir el efecto negativo del AF sobre el crecimiento de coleoptiles y raíces. Las semillas tratadas con la bacteria presentaron vástagos más largos, así como también raíces más numerosas y de mayor longitud en comparación con las semillas sin tratar (Roberts, Ottaviano et al. 2013, Roberts, Ottaviano et al. 2014).

Asimismo, también se evaluó la capacidad de *B. ambifaria* T16 de inhibir el crecimiento de *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. graminearum*. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el cultivo de la bacteria como el sobrenadante libre de células eran capaces de inhibir el crecimiento de los hongos *in vitro*. En ambos tipos de ensayos, los porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico obtenidos se encontraron entre el 30% y el 70%. Estos resultados demuestran que algún/os producto/s del metabolismo de *B. ambifaria* T16 es/son capaz/ces de inhibir con alta eficiencia el desarrollo vegetativo de las especies *Fusarium* ensayadas (Roberts, Ottaviano et al. 2013).

8. Hipótesis

Dado que *B. ambifaria* es capaz de crecer utilizando AF como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, debe poseer genes capaces de degradar este compuesto. Asimismo, su capacidad de inhibición de hongos del género *Fusarium* indica que es capaz de sintetizar moléculas involucradas en la inhibición de estos hongos, y que la información para la síntesis de dichos compuestos se encuentra contenida en su genoma.

Burkholderia ambifaria es una especie que se encuentra dentro del grupo **Bcc**, y como se mencionó previamente, su uso como agente de biocontrol no está recomendado debido al riesgo potencial que podrían presentar para la salud de individuos afectados con fibrosis

quística pulmonar. Sin embargo, esta cepa ha demostrado tener una virulencia muy atenuada y consideramos que el conocimiento de los genes involucrados en la degradación de micotoxinas y en la inhibición del crecimiento de fitopatógenos sería de gran utilidad con vistas al futuro, ya que existen trabajos que proponen el uso de cepas genéticamente modificadas del complejo **Bcc**, las cuales conservan sus propiedades de inhibición de fitopatógenos, pero carecen de los genes asociados a virulencia (Li, Pandit et al. 1999, Mahenthiralingam, Song et al. 2011).

9. Materiales y métodos

9.1. Condiciones de cultivo y cepas utilizadas

El medio LB (Maniatis 1982) se utilizó rutinariamente para el cultivo de las cepas de *E. coli* empleadas, las cuales se detallan en la **Tabla 3**. Cuando fue necesario el medio se suplementó con los siguientes antibióticos: ampicilina/carbenicilina 100 µg/ml, telurito de potasio 20 µg/ml, cloranfenicol 34 µg/ml. El medio sólido se preparó mediante el agregado de Agar-Agar a una concentración final de 15% (m/vol). Los cultivos se incubaron a 37°C con una agitación de 200 rpm.

B. ambifaria se cultivó en LB a 30°C con el agregado de los antibióticos tetraciclina 5 µg/ml y/o telurito 20 µg/ml cuando fue necesario o bien en medio mínimo M9 (Miller 1972) suplementado con 1 mM MgSO₄ y 0,1% (vol/vol) de solución de trazas (MT) (Lageveen, Huisman et al. 1988). Como fuente de carbono se utilizaron citrato de sodio a una concentración final de 0,2% (m/vol) o bien AF a una concentración final de 2,5 mM. La solución madre de AF se preparó a una concentración de 280 mM, disolviendo el AF en 18% (vol/vol) de metanol y ajustando el pH de la solución a 6,5 con NaOH 2N. Las placas de medio mínimo M9 se prepararon agregando Agar/Agar a una concentración final de 15% (m/vol). *F. oxysporum* se cultivó en medio Agar PDA (ver Anexo) a 25°C.

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el AF en *B. ambifaria*, las bacterias se cultivaron en placas de poliestireno de 96-pocillos que contenían

0,150 ml de medio mínimo M9 (Miller 1972) suplementado con 1 mM MgSO₄, 0,1% (vol/vol) de solución de trazas (MT) (Lageveen, Huisman et al. 1988), 0,2% de citrato de sodio (m/vol) y distintas concentraciones de AF. Los cultivos se inocularon a una DO_{600nm} (DO₆₀₀) inicial de 0,05 y se incubaron durante 24 h. a 30°C con agitación. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se determinó la CIM como aquella concentración de AF en la cual no se observaba turbidez.

Para evaluar la utilización de AF como única fuente de nitrógeno las células se pre-cultivaron en Caldo Nutritivo (ver composición en el Anexo), luego en medio mínimo M9 suplementado con 1 mM MgSO₄, 0,1% (vol/vol) de solución de trazas (MT) y 0,2% de citrato de sodio (m/vol), y finalmente en medio mínimo M9 sin el agregado de NH₄Cl (M9s/N), para asegurar que la bacteria no podía crecer con las trazas de nitrógeno que aportan el resto de los componentes del medio. Estos últimos cultivos se utilizaron para inocular el mismo medio (M9s/N) suplementado con 2,5 mM de AF y 20 µg/ml de telurito de potasio, en el caso de las bacterias que tenían inserciones del mini-Tn5 Tel (**Tabla 3**) en su genoma. La DO₆₀₀ inicial de los cultivos fue de 0,05 y los mismos se incubaron durante 48 h a 30°C a 200 rpm y transcurrido ese tiempo se midió la DO₆₀₀ obtenida.

Las cepas utilizadas en este trabajo se conservaron a corto plazo en placas de Petri con medio LB suplementadas con los antibióticos correspondientes, en caso necesario, y se guardaron a una temperatura de 4°C. Para la conservación a largo plazo, las cepas se guardaron congeladas a -60°C en tubos crioviales utilizando *Glicerol Freezing Medium* (ver composición del medio en el Anexo).

Cepas bacterianas		
Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu) araD\Delta lacX74galEgalKphoAthi-IrpsErpoBargE(Am) recA$ l isogena para el fago λ pir	(Herrero, de Lorenzo et al. 1990)
HB101	Sm ^r recAthi pro leuhsdRM ⁺	(Herrero, de Lorenzo et al. 1990)
S17-1 λ pir	Tp ^r Sm ^r recAthihsdRM ⁺ , lisógeno λ pir RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7	(de Lorenzo and Timmis 1994)
<i>B. ambifaria</i>		
T16	Aislada de rizósfera de cebada. Tet ^r	(Roberts, Ottaviano et al. 2014)
P2	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS07775::miniTn5	Este trabajo
P10	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS01015::miniTn5	Este trabajo
P12	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS08030::miniTn5	Este trabajo
P34	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS07790::miniTn5	Este trabajo
P37	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS07780::miniTn5	Este trabajo
P67	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS07740::miniTn5	Este trabajo
FA2	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS24395::miniTn5	Este trabajo
FA3	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS06285::miniTn5	Este trabajo
FA4	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS24400::miniTn5	Este trabajo
FA21	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS525570::miniTn5	Este trabajo
FA84	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS11755::miniTn5	Este trabajo
FA90	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, (CH72_RS02970-CH72_RS02975)::miniTn5	Este trabajo
FA91	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS24380::miniTn5	Este trabajo
FA92	Derivada de <i>B. ambifaria</i> T16, CH72_RS24400::miniTn5	Este trabajo

<i>F. oxysporum</i>	Aislado de suelo cultivado con trigo	(Silvestro, Senglein et al. 2013)
Plásmidos		
Nombre	Características relevantes	Referencia
pJMT6	Ap ^r Tel ^r , pUT/mini-Tn5 Tel	(Sanchez-Romero, Diaz-Orejas et al. 1998)
pRK600	Cm ^r ColE1oriV RK2mob ⁺ tra ⁺	(Fernandez-Tresguerres, Martin et al. 1995)
Oligonucleótidos (5'→3')		
Nombre	Secuencia	Referencia
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	(Das, Noe et al. 2005)
ARB6	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNCGCC	(Das, Noe et al. 2005)
telBint	GTTGGGCTGGCAGTGTTCGATCCGCAA	Este trabajo
telBext	TTGCGAAGCAGTACCAGCAGGAAT	Este trabajo

Tabla 3. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

9.2. Preparación de células competentes

E. coli se cultivó en medio SOB (ver composición del medio en el Anexo) a 30°C con agitación constante hasta una densidad óptica a DO₆₀₀ igual a 0,5. Los cultivos se incubaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 4000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 8 ml de TB frío (ver Anexo) y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, la suspensión se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm a 4°C y el *pellet* obtenido se resuspendió suavemente en 2 ml de TB frío y 0,14 ml de dimetilsulfóxido (DMSO).

9.3. Transformación de células competentes

Se mezcló el ADN con 0,05 ml de células competentes y se incubó 30 minutos en hielo, 1 minuto 30 segundos a 42°C y 10 minutos en hielo. Luego, las células se trasvasaron a un tubo Eppendorf con 0,3 ml de medio SOC (ver Anexo) y la suspensión se incubó durante 1

hora a 37°C con agitación moderada. Finalmente, las células se sembraron en placas con el medio de selección correspondiente.

9.4. Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (Miniprep)

El aislamiento de ADN plasmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando el kit “AccuprepPlasmid Mini Extraction kit” (BioneerCorporation, Korea).

9.5. Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa para el análisis y la purificación de fragmentos de ADN se prepararon de acuerdo a Sambrook and Green 1989. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,75 y 1% (m/vol), según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se corrieron utilizando buffer TAE (ver Anexo) a 100-120 V en cubas de electroforesis Sigma-Aldrich Co. Como marcador de peso molecular se utilizaron el 1 kb y 100 pb de Takara (TakaraBio Inc. Korea). Los geles se tiñeron con una solución del reactivo Syber Green (Invitrogen) durante 15 minutos y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

9.6. Construcción de la biblioteca de transposición mediante conjugación bacteriana

El plásmido pJMT6 (Tabla 3 y Figura 3), el cual contiene un mini-transposón denominado mini-Tn5 Tel (Figura 4), se movilizó desde la cepas dadoras *E. coli* CC118 λ pir (conjugación triparental) o bien S17-1 λ pir (conjugación biparental) (Tabla 3) a la cepa receptora *B. ambifaria* T16 (Tabla 3) mediante conjugación biparental o triparental, utilizando en este último caso a la cepa helper *E. coli* HB101, portadora del plásmido pRK600 (Tabla 3) y el protocolo descrito por Martínez – García (Martinez-Garcia, Calles et al. 2011) con las siguientes modificaciones: Las células se cultivaron hasta un $DO_{600} \approx 0,8$, se lavaron con $MgSO_4$ 10 mM y finalmente se preparó una suspensión bacteriana en 5 ml de la misma solución de manera de obtener una DO_{600} igual a 0,03 para cada cepa. La mezcla de

conjugación se colocó encima de un filtro Millipore de tamaño de poro 0,45 μM , el cual se colocó sobre una placa de LB y se incubó a 30°C durante 14hs. Las células que recibieron el mini-transposón se seleccionaron en placas de LB con 20 $\mu\text{g/ml}$ telurito de potasio y 5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina.

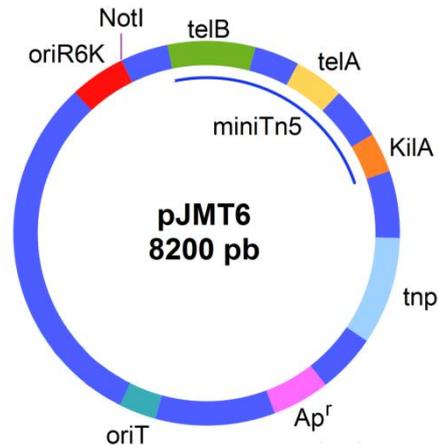


Figura 3. Estructura del plásmido pJMT6 Ap^r, pUT/mini-Tn5, Tel^f (8,2 kb). Posee el origen de replicación R6K el cual requiere una proteína específica para su replicación, codificada por el gen *pir*, con lo cual solo puede replicar en cepas que produzcan esta proteína. Presenta, además, el origen de transferencia *oriT*, el cual permite la movilización del plásmido por conjugación. Contiene el gen de la transposasa (*tnp*) con el fin de que la transposición sea efectuada independientemente del hospedador. Finalmente, posee un marcador de selección (codificado por el gen *bla*) el cual codifica para la resistencia a ampicilina (Hansen, Sørensen et al. 1997).

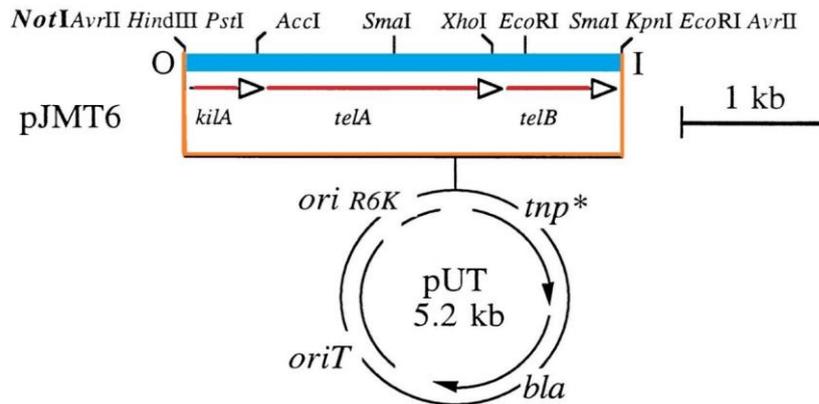


Figura 4. Transposón mini-Tn5Tel incluido en el plásmido pJMT6. Porta los genes *kilA* y *telAB*, los cuales codifican para la resistencia a las sales de telurito, típicamente telurito de potasio (K₂TeO₃). Las colonias que adquieren esta resistencia presentan un color negro, producto de la reducción del telurito y la formación de telurio metálico insoluble, lo cual hace a las colonias fácilmente distinguibles en placas de medio sólido.

9.7. Selección de colonias incapaces de producir proteasas extracelulares

El principio de este ensayo se basa en la capacidad de las bacterias de secretar proteasas extracelulares que degradan la caseína (principal proteína de la leche) observándose un halo claro alrededor de las colonias. Se utilizó Agar Nutritivo (ver Anexo) con el agregado de 2% (vol/vol) de leche descremada estéril para seleccionar aquellas colonias que presentaban una reducción del halo de degradación (en comparación con el producido por la cepa salvaje original) o bien ausencia del halo. El fenotipo de estas colonias se confirmó mediante otro repique en el mismo medio.

9.8. Selección de colonias incapaces de utilizar AF como única fuente de carbono

Para identificar aquellas colonias que perdieron la capacidad de crecer con AF como única fuente de carbono -como resultado de la inserción del mini-Tn5 Tel- se utilizaron placas que contenían medio mínimo M9 (Miller 1972) suplementado con MgSO₄ 1 mM, solución de trazas MT 0,1% (vol/vol) (Lageveen, Huisman et al. 1988), telurito de potasio 20 µg/ml, tetraciclina 5 µg/ml y citrato de sodio 0,2% (m/vol) o bien AF 2,5 mM como fuente de carbono y energía. Las colonias incapaces de crecer en medio mínimo con AF como fuente de carbono se seleccionaron y su incapacidad para catabolizar el AF se corroboró mediante crecimiento en medio líquido con 2,5 mM de AF.

9.9. PCR arbitraria (PCR-AR)

Se utilizó un protocolo de PCR arbitraria (Das, Noe et al. 2005) (**Figura 5**) con el objetivo de amplificar las regiones del genoma adyacentes a los sitios de inserción del mini-transposón. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos o *primers* y dos rondas de amplificación. Uno de los miembros de cada par de *primers* (ARB2 y ARB6) (**Tabla 3**), está diseñado de forma arbitraria para que se aparee con regiones no conocidas del genoma, mientras que el otro (telBint y telBext) es complementario a un extremo del mini-transposón. Se espera que el *primer* arbitrario se aparee con múltiples regiones del genoma.

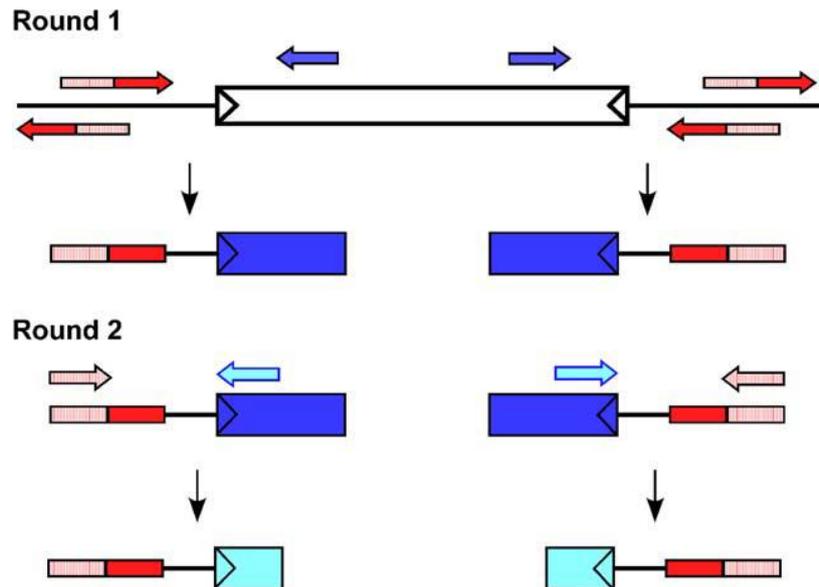


Figura 5. Principio de la PCR-AR. Los *primers* específicos del mini-transposón mini-Tn5 (representado en la figura como una caja blanca con triángulos en cada punta) son representados con flechas azules y celestes. En una primera ronda de PCR se utiliza un *primer* externo (flecha azul) que se une a un extremo del mini-Tn5 junto con un *primer* arbitrario (representado como una flecha roja). En esta ronda de PCR se utilizan bajas temperaturas de *annealing* con el fin de favorecer la unión del *primer* arbitrario al genoma. Los productos de la primera ronda son utilizados como moldes en una segunda ronda de PCR, en la cual se utiliza un *primer* interno (flecha celeste) que se aparea al extremo del fragmento amplificado en la primera ronda, y un *primer* interno arbitrario (color rosado, el cual es idéntico al extremo 5' del *primer* arbitrario utilizado en la primera onda). Los amplicones obtenidos de la segunda reacción son analizados a través de secuenciación utilizando el *primer* representado con la flecha celeste (Das, Noe et al. 2005).

9.9.1. PCR-AR para clones incapaces de secretar proteasas extracelulares

a) 1ra ronda de PCR-AR

Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l, el cual contenía: 15,1 μ l de H₂O, 2 μ l de Buffer 10x para la ADN polimerasa DreamTaq (Invitrogen), 1,5 mM de MgSO₄, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M del oligonucleótido telBext, 0,5 μ M del oligonucleótido ARB6, 0,2 μ l de DMSO, 3U/ μ l de ADN polimerasa DreamTaq y finalmente una punta de escarbadiante de la colonia a amplificar.

El ciclo de reacción contó con una etapa inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguida de 6 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 30°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C y una etapa final de extensión de 7 minutos a 72°C.

b) 2da ronda de PCR-AR

Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l, el cual contenía: 14,7 μ l de H₂O, 2 μ l de Buffer 10x para la ADN polimerasa DreamTaq, 1,5 mM de MgSO₄, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de ambos oligonucleótidos (telBint y ARB2), 0,2 μ l de DMSO, 3U/ μ l de ADN polimerasa DreamTaq y finalmente, 1 μ l del producto de amplificación de la primera ronda.

El ciclo de reacción contó con una etapa inicial de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C y una etapa final de extensión de 4 minutos a 72°C.

9.9.2. PCR-AR para clones incapaces de crecer con AF como única fuente de carbono.

Protocolo A

a) 1ra ronda de PCR-AR

Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l, el cual contenía: Buffer 1x para la ADN polimerasa DreamTaq (Invitrogen), 1,5 mM de $MgSO_4$, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M del oligonucleótido telBext, 0,5 μ M del oligonucleótido ARB6, 1,5% (vol/vol) de DMSO, 3U/ μ l de ADN polimerasa DreamTaq y finalmente una punta de escarbadiante de la colonia a amplificar.

El ciclo de reacción contó con una etapa inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguida de 6 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 30°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C. Luego, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C. Finalmente una etapa final de extensión de 7 minutos a 72°C.

b) 2da ronda de PCR-AR

Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l, el cual contenía: Buffer 1x para la ADN polimerasa DreamTaq, 1,5 mM de $MgSO_4$, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de ambos oligonucleótidos (telBint y ARB2), 1,5% (vol/vol) DMSO, 3U/ μ l de ADN polimerasa DreamTaq y finalmente, 1 μ l de DNA de primera ronda.

El ciclo de reacción contó con una etapa inicial de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C y una etapa final de extensión de 4 minutos a 72°C.

Protocolo B

c) 1ra ronda de PCR-AR

Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l, el cual contenía: Buffer 1x para la ADN polimerasa Phusion High Fidelity (New England Biolabs), 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M del oligonucleótido telBext, 0,6 μ M del oligonucleótido ARB6, 1,5% (vol/vol) de DMSO, 3U/ μ l de ADN polimerasa Phusion High Fidelity y finalmente una punta de escarbadiante de la colonia a amplificar.

El ciclo de reacción contó con una etapa inicial de desnaturalización de 8 minutos a 98°C, seguida de 6 ciclos de 5 minutos a 98°C, 10 segundos a 30°C y 40 segundos a 72°C. Luego, 35 ciclos de 5 segundos a 98°C, 10 segundos a 45°C y 40 segundos a 72°C. Finalmente una etapa final de extensión de 1 minuto a 72°C.

d) 2da ronda de PCR-AR

Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l, el cual contenía: Buffer 1x para la ADN polimerasa, 200 μ M de dNTPs, 0,3 μ M de ambos oligonucleótidos (telBint y ARB2), 1,5% (vol/vol) de DMSO, 3U/ μ l de ADN polimerasa Phusion High Fidelity y finalmente, 2 μ l del producto de amplificación de la primera ronda.

El ciclo de reacción contó con una etapa inicial de desnaturalización de 1 minuto a 98°C, seguida de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 10 segundos a 57°C y 40 segundos a 72°C y una etapa final de extensión de 1 minuto a 72°C.

9.10. Purificación de fragmentos de PCR y secuenciación

Se utilizó el kit *Accuprep Gel Purification* (Corea) para purificar las reacciones de PCR. En aquellas reacciones en las cuales se observó sólo una banda de amplificación en el gel, se procedió a purificar la reacción, mientras que en aquellas en las cuales se observó más de un producto de amplificación se purificó la banda más prominente. La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

9.11. Análisis de las secuencias de ADN obtenidas.

Se estudió la homología de las secuencias de ADN obtenidas con las secuencias presentes en las bases de datos utilizando la herramienta informática BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se eligieron los resultados que mostraron mayor porcentaje de identidad y se buscaron en la base de datos “*Burkholderia Genome Data Base*” (<http://beta.burkholderia.com>). Asimismo, las secuencias se analizaron con la ayuda del software *Bioedit*.

9.12. Ensayo de crecimiento dual en placa

Se evaluó la actividad antagonista de los aislamientos bacterianos incapaces de producir proteasas extracelulares sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Claes, Puhler et al. 2002) utilizando el método de cultivo dual en placa (**Figura 6**). Para esto, se vertieron 20 ml de medio PDA en placas de Petri estériles y las mismas se inocularon con las cepas bacterianas y el hongo. El inóculo de *F. oxysporum* consistió en una porción de micelio de 5 mm de diámetro (el cual se obtuvo a partir de placas cultivadas durante 3 semanas a 25°C), que se colocó en el centro de la placa y a una distancia de 2,5 cm de una estría de 1,5 cm de la bacteria. Las placas se incubaron a 25°C por un periodo que varió entre 7 a 10 días. Conjuntamente se hicieron controles, dejando crecer los hongos en medio PDA, en las mismas condiciones y sin inocular con la bacteria. Finalmente, la evaluación de la actividad antagonista se realizó midiendo el radio de la colonia fúngica, y se expresó el porcentaje de inhibición del desarrollo de la misma según:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

donde **A** es el radio en cm de la colonia fúngica en ausencia de la bacteria (placa control) y **B** es el radio en cm de la colonia fúngica en presencia de la bacteria. La **Figura 6** muestra un ejemplo de cómo se midieron los radios de la colonia (Brock and Buckel 2004).

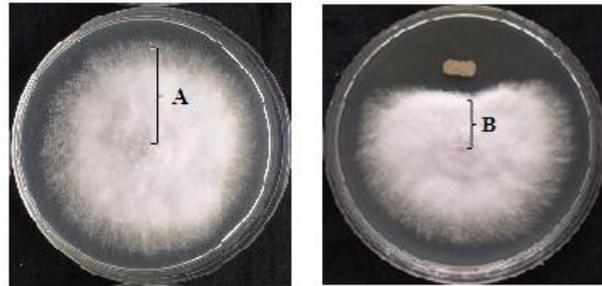


Figura 6. Foto que ilustra cómo se realizó la medición de los radios de la colonia fúngica en ausencia (A) y en presencia (B) de bacterias.

9.13. Análisis estadístico

Se utilizó el software IBM SPSS Statics v23. En primer lugar, se determinó si los datos poseían distribución normal utilizando la prueba de Shapiro-Wilks. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de un factor y como prueba post hoc la comparación múltiple de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas para un P menor a 0,05.

9.14. Ensayo de actividad lecitinasa

Se utilizó Agar Yema de Huevo (ver Anexo) para evaluar la capacidad de las bacterias de degradar la lecitina (actividad lecitinasa). Un resultado positivo consiste en la aparición de una zona clara alrededor de la colonia debido a la degradación de la lecitina presente en la yema de huevo.

10. Anexo

Composición de medios de cultivo y buffers

Glicerol freezing medium

Glicerol -----	87%
KCl -----	1 M
NaCl -----	1 M
MgSO ₄ -----	0,2 M

Caldo nutritivo

Peptona -----	5 g/l
Extracto de Levadura -----	3 g/l
Agar -----	15 g/l
NaCl -----	5 g/l

PDA (Agar Papa Dextrosa)

Extracto de papa -----	4 g/l
Dextrosa -----	20 g/l
Agar -----	20 g/l

Agar yema de huevo

Peptona -----20 g/l

Fosfato disódico -----2,5 g/l

NaCl -----1 g/l

Solución 0,5% p/v de MgSO₄ -----0,1 ml

Glucosa -----1 g/l

Agar ----- 12,5 g/l

Calentar con agitación hasta disolución total. Ajustar pH a 7,3 – 7,4 y esterilizar en autoclave. Enfriar a baño de 60 °C. Lavar bien un huevo y desinfectar cáscara con alcohol. Dejar secar, romper cáscara y separar la yema de la albúmina. Añadir la yema al medio de cultivo fundido y enfriado hasta 60°C, mezclar hasta obtener suspensión homogénea.

Electroforesis en geles de agarosa

Buffer TAE 50X

Tris -----242 g/l

Acetato -----57.1 ml

EDTA (500 mM pH 8.0) -----100 ml

Buffer de siembra 6X

Azul de bromofenol -----0,25 g/l

Sacarosa -----40 g/l

Soluciones para la preparación de células competentes

SOB

Triptona -----20 g/l

Extracto de Levadura -----5 g/l

NaCl -----0,5 g/l

KCl -----186 mg/l

MgSO₄ -----2,4 g/l

SOC

Triptona -----20 g/l

Extracto de levadura -----5 g/l

NaCl -----186 mg/l

MgSO₄ -----2,4 g/l

Glucosa -----20 µl/l

Buffer TB

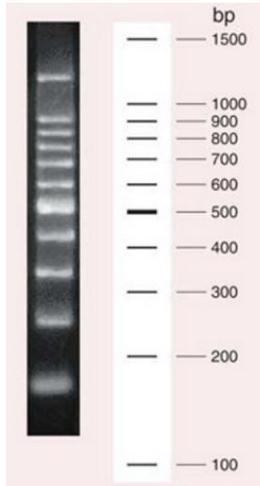
Hepes -----10 mM

CaCl₂ 2H₂O -----15 mM

KCl -----250 mM

MnCl₂ -----55 mM

Marcador de peso molecular: 100pb de Takara (TakaraBio Inc. Korea).



11. Resultados

11.1. Construcción de una biblioteca de transposición en *B. ambifaria* mediante conjugación bacteriana

Con el fin de identificar genes involucrados en la degradación y/o tolerancia de/al AF y en la producción y/o secreción de proteasas extracelulares (metabolismo secundario) en *B. ambifaria T16*, se decidió utilizar una estrategia global, la cual consistió en la construcción de una biblioteca de inserciones por transposición en dicha bacteria, utilizando para ello un minitransposón perteneciente a la familia de los transposones mini-Tn5 que porta resistencia a la sal telurito de potasio, denominado mini-Tn5 Tel (Sanchez-Romero, Diaz-Orejas et al. 1998) (**Figura 4**). Este sistema permite la inserción estable del mini-Tn5 en el genoma de muchas bacterias Gram negativas, y tiene la ventaja de que posee un marcador de selección que no es un antibiótico, sino que confiere resistencia a la sal telurito de potasio. Teniendo en cuenta que *B. ambifaria T16* es resistente a la mayoría de los antibióticos convencionales, el uso de la resistencia a telurito de potasio como marcador de selección nos permitió seleccionar aquellas células bacterianas que habían incorporado el mini-Tn5 Tel a su genoma. El mini transposón utilizado se encuentra en un vector suicida, denominado pJMT6 (**Tabla 3, Figura 3**) incapaz de replicar en ausencia de la proteína pir del fago λ y movilizable por conjugación. A fin de averiguar la concentración de telurito de potasio a utilizar para la selección del mini-Tn5Tel, realizamos la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para esta sal en la bacteria *B. ambifaria T16*. La CIM obtenida fue de 20 $\mu\text{g/ml}$, por lo cual utilizamos esta concentración en las placas de selección.

El plásmido pJMT6 que lleva el mini-Tn5 Tel se introdujo en *B. ambifaria T16* mediante conjugación bacteriana. En este punto, cabe destacar que, aunque *B. ambifaria T16* no se encuentra secuenciada, otras cepas de *B. ambifaria* secuenciadas presentes en bases de datos como AMMD oMC40-6, presentan un genoma de alrededor de 7 Mpb (<http://beta.burkholderia.com/strain/show?id=136>). De acuerdo con este dato, calculamos que

para obtener al menos una inserción del mini-transposón por ORF, el tamaño de la biblioteca de inserciones por transposición tenía que ser de al menos 7000 colonias.

Realizamos conjuntamente protocolos de conjugación biparental y triparental (Protocolos descritos en **9.6**), a fin de seleccionar aquel con el cual obtuviéramos un mayor número de células con el mini-Tn5 Tel. Para el protocolo de conjugación biparental utilizamos como cepa dadora a *E. coli*S17-1 λ pir/pJMT6 (**Tabla 3**), la cual lleva las funciones de transferencia de ADN (genes *tra*) integradas en su genoma. Por otro lado, en el protocolo de conjugación triparental utilizamos a las cepas *E. coli*CC118 λ pir/pJMT6 (cepa dadora) y **HB101** con el plásmido **RK600** (cepa *helper*), ya que en este caso las funciones de transferencia son aportadas por dicho plásmido (**Tabla 3**). En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos.

Conjugación	Recuento transconjugantes (UFC/ml)	Transconjugantes cada 3×10^7 células receptoras
Biparental	$4,69 \times 10^4$	$1,58 \times 10^3$
Triparental	$3,01 \times 10^5$	$1,03 \times 10^4$

Tabla 4. Número total de transconjugantes y cálculo de eficiencia (transconjugantes cada 3×10^7 células receptoras) obtenidas en la conjugación biparental y triparental.

Teniendo en cuenta que mediante conjugación triparental obteníamos un número mayor de transconjugantes por ml, utilizamos este protocolo para la construcción de la biblioteca de inserciones mini-Tn5 Tel.

11.2. Selección de colonias de *B. ambifaria* incapaces de producir proteasas extracelulares

A continuación, realizamos la evaluación de aproximadamente 15000 colonias de la biblioteca de inserciones por transposición en placas de Agar Leche 2%, a fin de seleccionar aquellos que mostraran ausencia de actividad de proteasas extracelulares o bien una actividad menor que la de la cepa salvaje *B. ambifaria* T16, estimada a partir de la observación de halos de degradación en Agar Leche 2%. Esta prueba se basa en la capacidad de las bacterias de producir y secretar proteasas que degradan la caseína de la leche, observándose un halo claro alrededor de las colonias cuando la prueba es positiva (**Figura 7**).

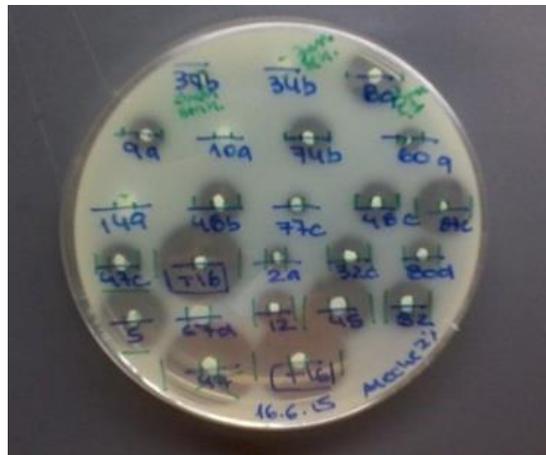


Figura 7. Evaluación de la producción de proteasas extracelulares en colonias provenientes de la conjugación triparental (colonias con inserción del mini-Tn5 Tel en su genoma) en Agar Leche 2%. Las colonias se repicaron con un escarbadientes estéril a partir de las placas de selección de M9 citrato 0,2% suplementadas con telurito de potasio 20 $\mu\text{g/ml}$ y tetraciclina 5 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron por 24 hs a 30°C.

Se seleccionaron aquellas colonias que mostraron ausencia de halo o un halo de tamaño menor que el observado para la cepa salvaje, *B. ambifaria* T16, la cual se repicaba en cada placa a fin de poder realizar la comparación. De un total de aproximadamente 15000

colonias, seleccionamos 17 con fenotipo proteasa negativo (ausencia de halo) o proteasa *leaky* (halo menor que la cepa salvaje), los cuales se detallan en la **Tabla 5**. Al mismo tiempo, realizamos la medición del diámetro del halo de degradación y el diámetro de las colonias, a fin de obtener un índice de producción de proteasas extracelulares (IPPE), al cual definimos como el cociente del diámetro del halo sobre el diámetro de la colonia, a fin de que nos sirviera para evaluar cualitativamente la capacidad de producción de proteasas extracelulares.

<i>B. ambifaria</i>	Diámetro colonia (mm)	Diámetro halo de degradación (mm)	IPPE (diámetro del halo / diámetro de la colonia)
T16	4	19	4,75
P2	2	4	2
P8	3	11	3,67
P9	2	6	3
P10	3	0	0
P12	2	7	3,5
P14	3	0	0
P32	3	11	3,67
P34	3	0	0
P37	3	0	0
P47	2	7	3,5
P48b	2	9	4,5
P67	5	0	0
P74	2	9	4,5
P77	3	0	0
P80	2	7	3,5
P82	3	10	3,33
P87	2	11	5,5

Tabla 5. Evaluación del fenotipo de proteasas extracelulares en colonias de *B. ambifaria*. Se midió el halo de degradación en Agar Leche 2%, conjuntamente con el diámetro de la colonia, a fin de calcular el índice de producción de proteasas extracelulares (IPPE) para cada colonia.

T16 corresponde a la cepa salvaje y las colonias restantes provienen de la conjugación (poseen el mini-Tn5Tel insertado en su genoma).

Posteriormente, seleccionamos tres colonias con fenotipo proteasa negativo (IPPE=0): *B. ambifaria* P34, P37 y P67, para mapear el sitio de inserción del mini-Tn5 Tel y verificar la relación con el fenotipo observado, de manera de validar los resultados obtenidos.

11.2.1. Mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5 Tel en las cepas de *B. ambifaria* con fenotipo proteasa extracelular negativo

El mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5 Tel en *B. ambifaria* P34, P37 y P67 se realizó mediante PCR arbitraria, tal como se describió en Materiales y Métodos, sección 9.9.1. La **Figura 8** muestra los fragmentos obtenidos para cada cepa, luego de la segunda ronda de amplificación.

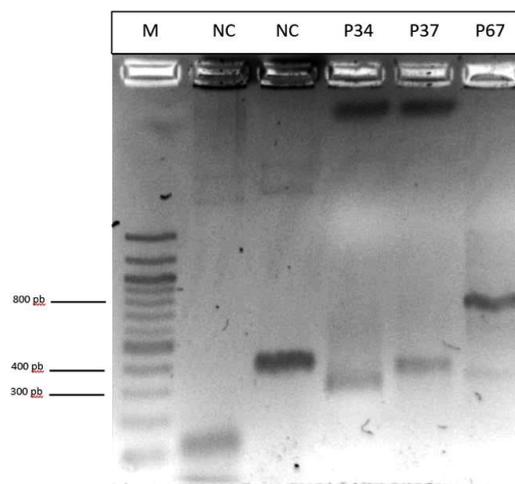


Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa de fragmentos de ADN obtenidos luego de la segunda ronda de amplificación mediante el método de PCR arbitraria para *B. ambifaria* P34, P37 y P67. M: Marcador de peso molecular Takara 100 pb; NC: no corresponde.

Los fragmentos de PCR obtenidos se purificaron, se enviaron a secuenciar y se analizó su homología con las secuencias presentes en bases de datos, a fin de determinar el sitio de inserción del mini-Tn5Tel. Para todas las mutantes analizadas, las secuencias obtenidas mostraron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de *B. ambifaria* AMMD, la cepa tipo de la especie *B. ambifaria* (Coenye, Mahenthiralingam et al. 2001), con la cual *B.*

ambifaria T16 mostró el mayor porcentaje de similitud en las secuencias de los genes marcadores rDNA 16s, *gyrB* y *recA* (Roberts, Ottaviano et al. 2014). La **Tabla 6** muestra los resultados obtenidos para cada cepa. Se puede observar que todas las mutantes que mostraron ausencia de actividad de proteasas extracelulares, poseen el mini-Tn5Tel insertado en un gen que codifica para proteínas que forman parte de la rama terminal del sistema general de secreción (GSP, por sus siglas en inglés: *General Secretary Pathway*) o sistema de secreción de tipo II, el cual está involucrado en el transporte de varias enzimas hidrolíticas, entre ellas varias proteasas (Horswill, Dudding et al. 2001).

Cepa	Nombre del locus en el genoma de <i>B.ambifaria</i> AMMD	Nombre del gen	Función	Coordenadas en el genoma de <i>B. ambifaria</i> AMMD	% de Identidad	Tamaño del fragmento PCR	Coordenadas en el fragmento de PCR	
							Correspondientes al fragmento <i>kilAtelAB</i> (mini-Tn5 Tel)*	Correspondientes al genoma de <i>B. ambifaria</i> #
<i>B.ambifaria</i> P34	CH72_RS07790	<i>gspM</i>	Proteína de la vía general de secreción	1632255 - 1632530	85	350	1-201	202-478
<i>B.ambifaria</i> P37	CH72_RS07780	<i>gspL</i>	Proteína de la vía general de secreción	1631739 - 1631638	97	400	1 – 204	205 – 305
<i>B.ambifaria</i> P67	CH72_RS07740	<i>gspE</i>	Proteína de la vía general de secreción	1624638 - 1625111	99	800	1 – 207	208 – 681

Tabla 6. Localización de la inserción del mini-Tn5 Tel en el genoma de las mutantes de *B. ambifaria* incapaces de secretar proteasas extracelulares. Se utilizaron los extremos del mini- Tn5Tel (fragmento *kilAtelAB*) para localizar el sitio de inserción del transposón mediante PCR arbitraria en cada una de las mutantes. La Tabla muestra el nombre del locus, el nombre del gen y la función de la proteína para la cual codifican los genes interrumpidos

por el mini-Tn5 Tel. Asimismo, también se muestra el largo de cada fragmento de amplificación obtenido en la PCR de la **Figura 8**, el número de nucleótidos (pb) de la PCR que coinciden con el extremo del mini-transposón (*), las pb del fragmento de PCR que muestran homología con el genoma de *B. ambifaria* AMMD (#), así como sus coordenadas (ubicación) en el genoma y los porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos obtenidos en cada caso con la secuencia de *B. ambifaria* AMMD.

11.2.2. Evaluación del fenotipo lecitinasa en las mutantes para el sistema general de secreción (GSP)

A continuación, y para corroborar los resultados obtenidos que indicaban que *B. ambifaria* P34, P37 y P67 mostraban una inserción del mini-Tn5 Tel en genes codificantes para el sistema GSP involucrado en el transporte de enzimas hidrolíticas, se decidió analizar en estas mutantes la actividad de lipasas extracelulares en placas de Agar Yema de Huevo (actividad lecitinasa). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 9**. Tal como puede observarse, *B. ambifaria* T16 (cepa salvaje) presentó actividad lecitinasa positiva, lo cual se evidenció por la presencia de un halo claro alrededor de las colonias. Por otro lado, no se observó halo de degradación al repicar colonias de *B. ambifaria* P34, P37 y P67, lo cual indica que las mismas no poseen actividad lecitinasa. Estos resultados terminaron de confirmar el fenotipo de las mutantes de inserción analizadas, las cuales serían deficientes en el sistema GSP.

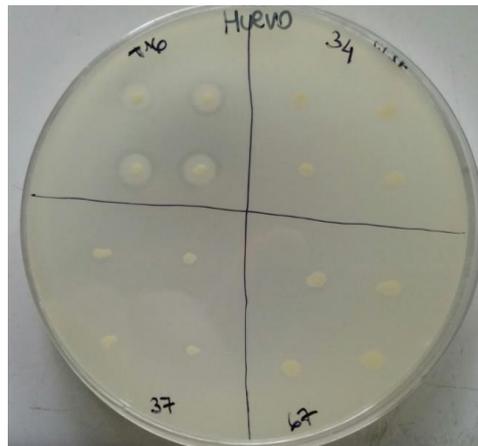


Figura 9. Evaluación de la actividad de lipasas extracelulares de *B. ambifaria* T16(cepa salvaje), P34, P37 y P67 (mutantes de inserción mini-Tn5 Tel). Se repicaron 4 colonias de cada cepa en placas de Agar Yema de Huevo, las cuales se incubaron durante 3 días a 30 °C.

11.2.3. Evaluación de la capacidad de las clones de *B. ambifaria* con fenotipo proteasa negativo o proteasa *leaky* de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro*.

Dado que, como se mencionó en la Introducción, la producción de proteasas extracelulares es un mecanismo que puede estar asociado al metabolismo secundario (Pugsley 1991), y teniendo en cuenta que *B. ambifaria* T16 mostró una marcada inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *F. oxysporum in vitro* (Ottaviano 2015), decidimos evaluar la capacidad de los clones proteasa negativos y proteasa “leaky” (que presentaban un halo de degradación menor al observado para la cepa salvaje) de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum in vitro*, con el fin de identificar genes que pudieran estar involucrados en la producción de sustancias con actividad antifúngica. Para ello, realizamos una primera selección de las cepas de la **Tabla 5** mediante ensayos de crecimiento dual en placa, de acuerdo a los descrito en **9.12**. Se seleccionaron las cepas *B. ambifaria* P2, *B. ambifaria* P10, *B. ambifaria* P12, *B. ambifaria* P14, *B. ambifaria* P34, *B. ambifaria* P37 y *B. ambifaria* P67 para un segunda selección, ya que estas presentaron un halo de inhibición del

crecimiento de *F. oxysporum* menor al observado para la cepa salvaje *B. ambifaria* T16. Con estas cepas repetimos los ensayos de crecimiento dual por triplicado y, posteriormente determinamos el porcentaje de inhibición de crecimiento para cada una. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 10**.

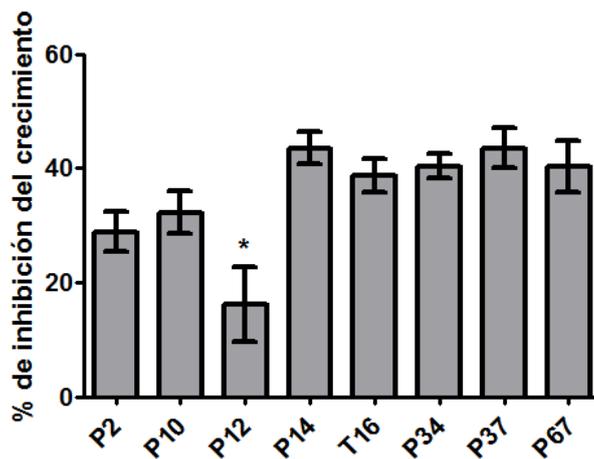


Figura 10. Ensayos de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* utilizando las cepas *B. ambifaria* T16 (salvaje) y las distintas mutantes mini-Tn5 Tel. Se realizaron ensayos de crecimiento dual en placas de Agar PDA para cada cepa y se determinó el porcentaje de inhibición mediante la medición del diámetro de la colonia fúngica en presencia y ausencia de la bacteria (C-), tal como se describió en Materiales y Métodos luego de incubar las placas durante siete días a 25°C. Los valores representan el promedio del porcentaje de inhibición \pm el desvío estándar (D.S) utilizando cada cepa. Los datos fueron analizados usando como prueba estadística ANOVA de un factor. Los asteriscos sobre las barras de error indican que existen diferencias significativas respecto de la cepa salvaje *Burkholderia ambifaria* T16. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $P < 0.05$.

Como puede observarse en la **Figura 10**, la única mutante de inserción que presentó diferencias significativas en la capacidad de inhibición de *F. oxysporum* en comparación con la cepa salvaje, *B. ambifaria*T16, fue la cepa *B. ambifaria* P12. La **Figura 11** muestra una foto tomada con lupa, en la cual se puede ver claramente el antagonismo de *B. ambifaria* T16 hacia el hongo *F. oxysporum* en ensayos de crecimiento dual en placa. Por otro lado, *B. ambifaria* P12 fue incapaz de inhibir el crecimiento del hongo (el micelio del hongo crece hasta tocar la estría de la bacteria). Asimismo, del análisis de la **Figura 10** también se desprende que las cepas mutantes en el sistema de secreción de tipo II (*B. ambifaria* P34, P37 y P67) no mostraron diferencias significativas en la inhibición de *F. oxysporum*, lo cual indica que el sistema de secreción de tipo II no contribuye a la inhibición del crecimiento del hongo.

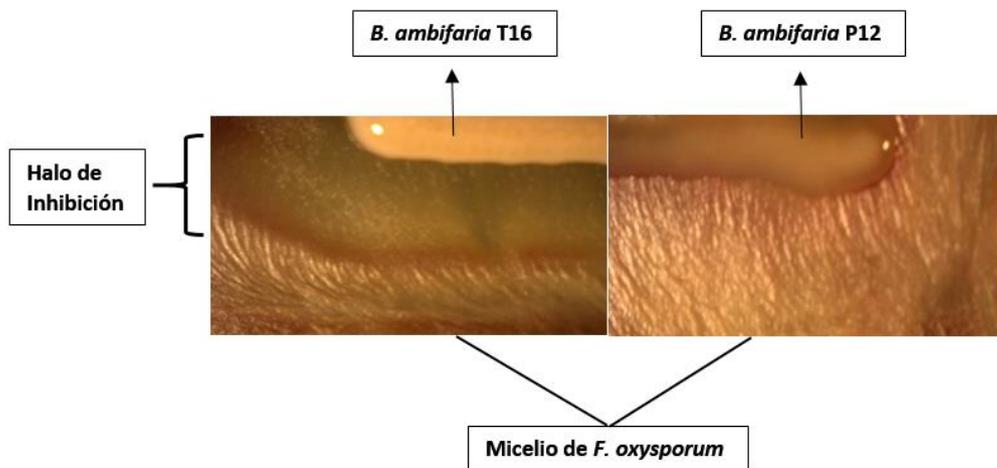


Figura 11. Ensayo de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* utilizando *B. ambifaria* T16 (salvaje) y *B. ambifaria* P12. Se muestra una foto de placas de Agar PDA inoculadas con *B. ambifaria* T16 o *B. ambifaria* P12 y el hongo *F. oxysporum*. Las fotos se tomaron con un aumento de 6.5X luego de su incubación durante 7 días a 25°C.

11.2.4. Mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5Tel en *B. ambifaria* P12

A continuación, se procedió a determinar el sitio de inserción del mini-Tn5Tel en *B. ambifaria* P12, a fin de averiguar su genotipo, mediante la amplificación de las regiones del genoma adyacentes a los sitios de inserción del transposón utilizando la técnica de PCR arbitraria. El fragmento de amplificación obtenido luego de la segunda ronda de amplificación se muestra en la **Figura 12**.

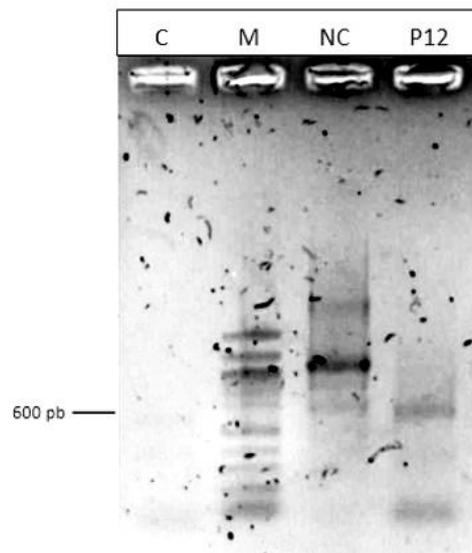


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de ADN obtenidos luego de la segunda ronda de amplificación mediante el método de PCR arbitraria para *B. ambifaria* T16 y *B. ambifaria* P12. **C:** control negativo de PCR (H₂O); **M:** Marcador de peso molecular Takara 100 pb; **NC:** no corresponde.

Como se puede observar en la **Figura 12**, se obtuvo una banda prominente de alrededor de 800 pb, la cual se purificó y se envió a secuenciar. Al comparar la secuencia obtenida con las secuencias presentes en bases de datos, se encontró que la inserción del mini-

Tn5 Tel había ocurrido en un gen que codifica una enzima GTPasa modificadora de RNA, involucrada en el control transcripcional (*MnmE*) (**Tabla 8**). Esta enzima forma un complejo con la proteína *MnmG* que en conjunto juegan un rol importante en la modificación de tRNAs (Yim, Moukadiri et al. 2006, Moukadiri, Prado et al. 2009, Hamdane, Argentini et al. 2011).

Mutante	Nombre del locus en el genoma de <i>B.ambifaria</i> a AMMD	Nombre del Gen	Función	Coordenadas en el genoma de <i>B. ambifaria</i> AMMD	% de identidad	Tamaño del fragmento PCR	Coordenadas en el fragmento de PCR	
							Correspondientes al fragmento <i>kilAtelAB</i> (mini-Tn5 Tel)*	Correspondientes al genoma de <i>B. ambifaria</i> #
<i>B. ambifaria</i> P12	CH72_R S08030	<i>MnmE</i>	GTPasa modificado -ra de RNA	1688820 - 1688934	97	800	1-203	204 - 318

Tabla 8. Localización de la inserción del mini-Tn5 Tel en *B. ambifaria* P12. Se utilizaron los extremos del mini-Tn5 Tel (fragmento *kilAtelAB*) para localizar el sitio de inserción del transposón mediante PCR arbitraria. La Tabla muestra el largo del fragmento de amplificación obtenido en la PCR de la **Figura 12**, el número de nucleótidos (pb) de la PCR que coinciden con el extremo del mini-transposón (*), las pb del fragmento de PCR que muestran homología con el genoma de *B. ambifaria* AMMD (#), así como sus coordenadas (ubicación) en el genoma y el porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos con la secuencia de *B. ambifaria* AMMD.

11.3. Selección de colonias de *B. ambifaria* incapaces de utilizar AF como única fuente de carbono

El otro fenotipo a analizar en las colonias de la biblioteca de inserciones por transposición fue la capacidad de utilizar AF como única fuente de carbono, con el fin de identificar genes responsables de la degradación y/o tolerancia a esta micotoxina. Para ello, se realizaron repiques en placas de medio mínimo con citrato de sodio o bien AF como única

fuentes carbonadas, tal como se describió en la sección 9.8 de Materiales y Métodos, con el fin de seleccionar aquellas colonias capaces de crecer en las placas de medio mínimo suplementado con citrato de sodio, pero no en las placas de medio mínimo suplementado con AF. De un total de 7000 colonias analizadas, se seleccionaron ocho incapaces de utilizar AF para su crecimiento: *B. ambifaria* FA2, FA3, FA4, FA21, FA84, FA90, FA91 y FA92 (Figura 13).

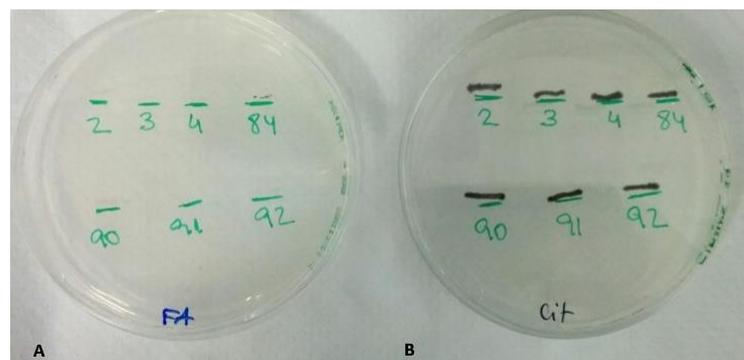


Figura 13. Colonias de *B. ambifaria* con inserciones del mini-Tn5Tel incapaces de crecer con AF como única fuente carbonada. **A.** Placa de medio mínimo M9 suplementado con 2,5 mM de AF, telurito de potasio 20 µg/ml y tetraciclina 5 µg/ml. **B.** Placa de medio mínimo M9 suplementado con 0,2% de citrato de sodio, telurito de potasio 20 µg/ml y tetraciclina 5 µg/ml.

11.3.1. Mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5Tel en las cepas de *B. ambifaria* incapaces de utilizar AF como fuente de carbono.

El mapeo del sitio de inserción del mini-Tn5Tel en las colonias seleccionados en el apartado anterior se realizó mediante PCR arbitraria, tal como se describió en Materiales y Métodos, sección 9.9.2. Para *B. ambifaria* FA2, FA4, FA21, FA90 y FA91, la amplificación se realizó utilizando DreamTaq (Promega), mientras que para *B. ambifaria* FA3, FA4yFA82, fue necesario utilizar una Taq polimerasa de alta fidelidad (Phusion High Fidelity, New England Biolabs) más robusta, ya que no obtuvimos fragmentos de amplificación al realizar la

PCR con la Taq polimerasa común (Dream Taq). La **Figura 14** muestra los fragmentos obtenidos para cada cepa, luego de la segunda ronda de amplificación.

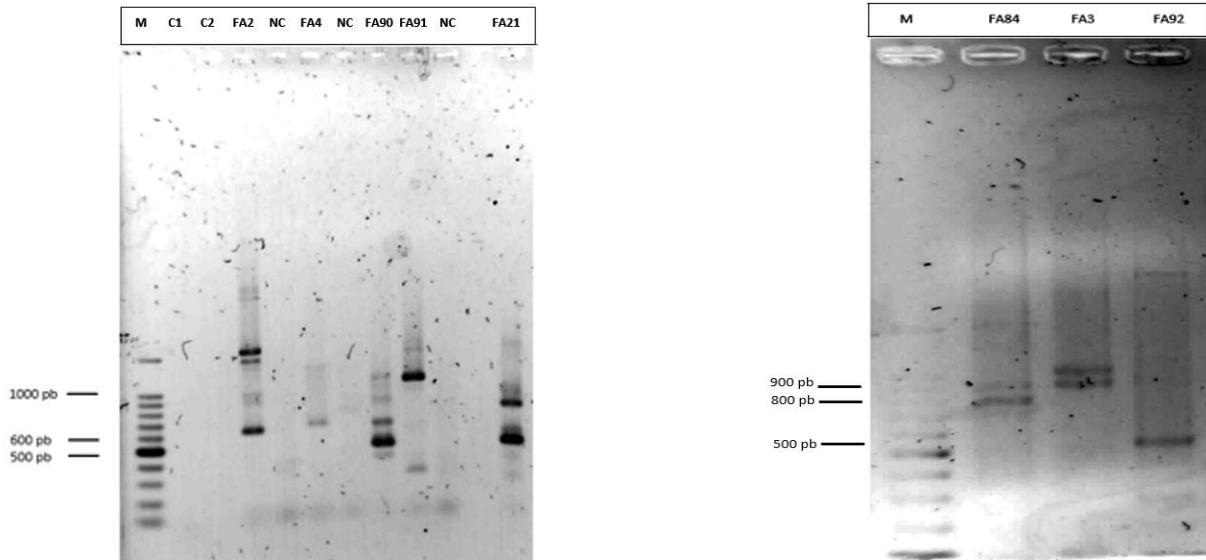


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de ADN obtenidos luego de la segunda ronda de amplificación mediante el método de PCR arbitraria para *B. ambifaria* FA2, FA3, FA4, FA21, FA84, FA90, FA91 y FA92. M: marcador de peso molecular Takara 100 bp C: control negativo (H₂O), NC: no corresponde.

Como puede observarse en la figura, en algunos casos se obtuvieron varios fragmentos de amplificación al realizar la PCR arbitraria. En estos casos, se eligieron varias bandas que se purificaron y se enviaron a secuenciar. Los resultados de la secuenciación mostraron que correspondían a la misma región del genoma, en los cuales el primer arbitrario se había apareado en más de un lugar. Al igual que en el caso de las cepas mutantes para la secreción de proteasas extracelulares, las secuencias obtenidas mostraron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de *B. ambifaria* AMMD. La **Tabla 9** detalla los resultados obtenidos para cada cepa y en la **Tabla 10** se describe el rol de los genes interrumpidos por el mini-transposón.

Mutante	Nombre del locus en el genoma de <i>B.ambifaria</i> AMMD	Nombre del gen	Función	Coordenadas en el genoma de <i>B. ambifaria</i> AMMD	% de identidad	Tamaño del fragm. de PCR	Coordenadas en el fragmento de PCR	
							Correspon-dientes al fragmento <i>kilAtelAB</i> (mini-Tn5 Tel)*	Correspon-dientes al genoma de <i>B. ambifaria</i> #
<i>B.ambifaria</i> FA2	CH72_RS24395	<i>prpB</i>	Enzima involucrada en el metabolismo del propionato	1825234-1825051	98,57	600	2-108	215-390
<i>B.ambifaria</i> FA3	CH72_RS06285	<i>mlaD</i>	Proteína de mantenimiento de asimetría lipídica de membrana externa	1304002-1303455	97	900	1-102	209-756
<i>B.ambifaria</i> FA4	CH72_RS24400	<i>prpR</i>	Proteína regulatoria del catabolismo del propionato	1826624-4825903	91	700	3-114	222-700
<i>B.ambifaria</i> FA21	CH72_RS525570		Acil-CoA deshidrogenasa	2088997-2089383	96	500	3-105	212-500
<i>B.ambifaria</i> FA84	CH72_RS11755		Fosfoenol piruvato carboxilasa	2519727-2519218	97	800	1-102	208-724
<i>B.ambifaria</i> FA90	CH72_RS02975	Región intergénica	---	605831-605627	99	500	2-102	208-412
<i>B.ambifaria</i> FA91	CH72_RS24380	<i>prpF</i>	3-metilacnitato isomerasa	1820669-1819980	98	1000	1-104	210-903
<i>B.ambifaria</i> FA92	CH72_RS24400	<i>prpR</i>	Proteína regulatoria del catabolismo del propionato	1827051-1826811	99	500	1-104	210-451

Tabla 9. Localización de la inserción del mini-Tn5 Tel en el genoma de las distintas mutantes *B. ambifaria*. Se utilizaron los extremos del mini-Tn5Tel (fragmento *kilAtelAB*) para localizar el sitio de inserción del transposón mediante PCR arbitraria en cada una de las mutantes. La Tabla muestra el largo de cada fragmento de amplificación obtenido en la PCR de la **Figura 14**, el número de nucleótidos (pb) de la PCR que coinciden con el extremo del mini-transposón (*), las pb del fragmento de PCR que muestran homología con el genoma de *B. ambifaria* AMMD (#), así como sus coordenadas (ubicación) en el genoma y los

porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos obtenidos en cada caso con la secuencia de *B. ambifaria* AMMD.

Gen interrumpido	Función de la proteína que codifica
<i>prpB</i>	Enzima involucrada en el metabolismo del propionato. Cataliza el último paso en el ciclo del 2-metilcitrato, clivando 2-metilisocitrato para dar succinato y piruvato. El succinato es oxidado a oxalacetato que reingresa al ciclo, mientras que el piruvato puede ser utilizado tanto para la generación de energía como para la síntesis de biomasa.
<i>mldD</i>	Proteína transportadora ABC que mantiene la asimetría de la membrana externa. Realiza el transporte retrógrado de fosfolípidos para mantener la integridad de la membrana externa como una barrera protectora.
<i>prpR</i>	Proteína regulatoria. Activa la expresión de los genes involucrados en el ciclo del 2-metilcitrato.
Región intergénica CH72_RS02970-CH72_RS02975	-----
CH72_RS525570	Acil-CoA deshidrogenasa: involucrada en el catabolismo de los ácidos grasos.
CH72_RS11755	Cataliza la formación de oxalacetato a partir de fosfoenolpiruvato.
<i>prpF</i>	Enzima involucrada en el metabolismo del propionato. Cataliza la conversión de 2-metil- trans aconitato a cis-2 metil aconitato.

Tabla 10. Descripciones de las funciones de las proteínas codificadas por los genes interrumpidos por el transposón mini-Tn5 Tel, que originan un fenotipo incapaz de degradar AF en *B. ambifaria* T16.

11.4. Evaluación de la toxicidad del AF en las cepas de *B. ambifaria* incapaces de degradar AF.

A fin de determinar si la incapacidad de crecer en presencia de AF se debía a un incremento en la sensibilidad a este compuesto en las cepas mutantes de inserción por transposición, decidimos evaluar la concentración mínima inhibitoria (CIM) para el AF en todas las cepas mutantes, a fin de comparar los resultados obtenidos con la cepa salvaje, *B. ambifaria* T16. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 12**.

Cepa	CIM
<i>B. ambifaria T16</i>	1600 µg/ml
<i>B. ambifaria FA2</i>	200 µg/ml
<i>B. ambifaria FA3</i>	200 µg/ml
<i>B. ambifaria FA4</i>	1600 µg/ml
<i>B. ambifaria FA21</i>	1600 µg/ml
<i>B. ambifari aFA84</i>	1600 µg/ml
<i>B. ambifaria FA90</i>	800 µg/ml
<i>B. ambifaria FA91</i>	1600 µg/ml
<i>B. ambifaria FA92</i>	1600 µg/ml

Tabla 12. Determinación de la CIM para AF en la cepa salvaje ***B. ambifaria T16*** y en las cepas incapaces de crecer con AF como única fuente de carbono.

Los resultados indican que existe variación en cuanto a la tolerancia al AF entre las distintas cepas. Las cepas ***B. ambifaria FA4, FA21, FA84, FA91 y FA92*** mostraron una tolerancia al AF similar a la cepa salvaje, ***B. ambifaria T16*** (CIM= 1600µg/ml). Por otro lado, ***B. ambifaria FA90, FA2 y FA3*** resultaron más sensibles al AF, siendo **FA2 y FA3** mucho más sensibles (CIM= 200 µg/ml) que **FA90** (CIM= 800 µg/ml). Podemos concluir que la inserción del mini-Tn5 Tel, afectó en algunos casos la tolerancia al AF en ***B. ambifaria***, y que la incapacidad de crecer en presencia de AF como única fuente de carbono en algunas mutantes es debida a un incremento en la sensibilidad a este compuesto, más que a la incapacidad para degradarlo.

11.5. Evaluación de la utilización de AF como única fuente de nitrógeno en las cepas de *B. ambifaria* incapaces de degradar AF.

Finalmente, se decidió evaluar si las cepas incapaces de utilizar AF como única fuente de carbono eran capaces de utilizar el AF como única fuente de nitrógeno, ya que como se mencionó en la introducción, el AF posee un átomo de nitrógeno en su anillo aromático (**ver**

Figura 2). En la **Tabla 13** se muestra la DO₆₀₀ obtenida al crecer las cepas en medio mínimo con AF como única fuente de nitrógeno.

Cepa	DO ₆₀₀
<i>B. ambifaria T16</i>	1,45
<i>B. ambifaria FA2</i>	0,17
<i>B. ambifaria FA3</i>	0,05
<i>B. ambifaria FA4</i>	0,60
<i>B. ambifaria FA21</i>	0,07
<i>B. ambifaria FA84</i>	1,41
<i>B. ambifaria FA90</i>	0,78
<i>B. ambifaria FA91</i>	0,29
<i>B. ambifaria FA92</i>	0,54

Tabla 13. Evaluación de la utilización de AF como única fuente de nitrógeno en la cepa salvaje ***B. ambifaria T16*** y en las cepas incapaces de crecer con AF como única fuente de carbono.

De la observación de los resultados de la **Tabla 13**, podemos concluir que todas las cepas mutantes de inserción por transposición mostraron un crecimiento menor que la cepa salvaje, lo cual indica que la capacidad para utilizar AF como única fuente de nitrógeno se vio disminuida en distinta medida, como resultado de la interrupción de los genes respectivos. Cabe destacar, que las cepas ***B. ambifaria FA2***, ***FA3*** y ***FA21*** prácticamente no crecieron en medio mínimo con AF como única fuente de nitrógeno.

12. Discusión

El objetivo fundamental de la presente tesis fue la identificación de genes involucrados en la degradación de AF y en la inhibición del hongo *Fusarium oxysporum* en la bacteria *Burkholderia ambifaria T16*. Para cumplir con dicho propósito se construyó una biblioteca de inserciones utilizando un mini-transposón. Dado que la selección de colonias incapaces de inhibir el micelio del hongo es muy engorrosa y difícil a gran escala, decidimos comenzar por evaluar la capacidad de producción de proteasas extracelulares, debido a la facilidad de

visualización del fenotipo en placa y debido a que, como se mencionó en la Introducción, la producción de proteasas extracelulares es un mecanismo que se ha ligado al metabolismo secundario (Pugsley 1991). Tal como se mencionó en la Introducción, el metabolismo secundario en *Burkholderia spp.* es uno de los principales mecanismos de inhibición del crecimiento fúngico.

Para realizar la construcción de la biblioteca de inserciones por transposición, utilizamos un mini-transposón, denominado mini-Tn5 Tel (Sanchez-Romero, Diaz-Orejas et al. 1998) en un plásmido incapaz de replicar en *B. ambifaria*T16, el cual transferimos a esta cepa mediante conjugación. Dado que necesitábamos una biblioteca de transposición lo más representativa posible, probamos dos protocolos de conjugación, biparental y triparental, a fin de determinar cuál de ellos nos proporcionaba el mayor número de colonias que portaban el transposón (colonias Tel^r). Los resultados mostraron que la conjugación triparental era más eficiente que la conjugación biparental (obteníamos un orden más de colonias Tel^r/ml).

Una vez construida la biblioteca de inserciones de transposición, se realizó la selección de las colonias obtenidas a fin de evaluar los dos fenotipos de interés: colonias incapaces de utilizar AF como única fuente de carbono y colonias incapaces de producir proteasas extracelulares. Posteriormente, se identificó el sitio de inserción del mini-transposón en las colonias con los fenotipos de interés, utilizando la técnica de PCR asimétrica para obtener los fragmentos adyacentes al mini-transposón, y posterior secuenciación y análisis de los mismos.

Luego de evaluar el fenotipo de producción de proteasas extracelulares en Agar Leche, obtuvimos varias colonias de *B. ambifaria* que mostraron una disminución en el halo de degradación con respecto a la cepa salvaje, *B. ambifaria* T16. De todas estas colonias seleccionamos tres que mostraron ausencia total de halo (lo cual indicaba la incapacidad total de producción de proteasas extracelulares): *B. ambifaria* P34, P37 y P67. Al realizar la identificación del sitio de inserción del mini-transposón en estas cepas, observamos que en todas ellas, el mini-Tn5 Tel había interrumpido genes que codifican proteínas pertenecientes al sistema de secreción de tipo II (T2SS por *type II secretion system*) o rama terminal del

sistema general de secreción (GSP). El GSP (**Figura 15**) es una forma de traslocación de proteínas extracelulares, en el cual las mismas atraviesan las membranas internas y externas en dos pasos. El primer paso involucra la traslocación a través de la membrana citoplasmática. La proteína transportada es sintetizada como un precursor que contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, el cual es transportado a través de la membrana interna. Este péptido es luego clivado y finalmente la proteína madura es liberada en el periplasma. En el siguiente paso, la proteína plegada es traslocada a través de la membrana externa por la maquinaria proteica de la rama terminal del GSP o T2SS.

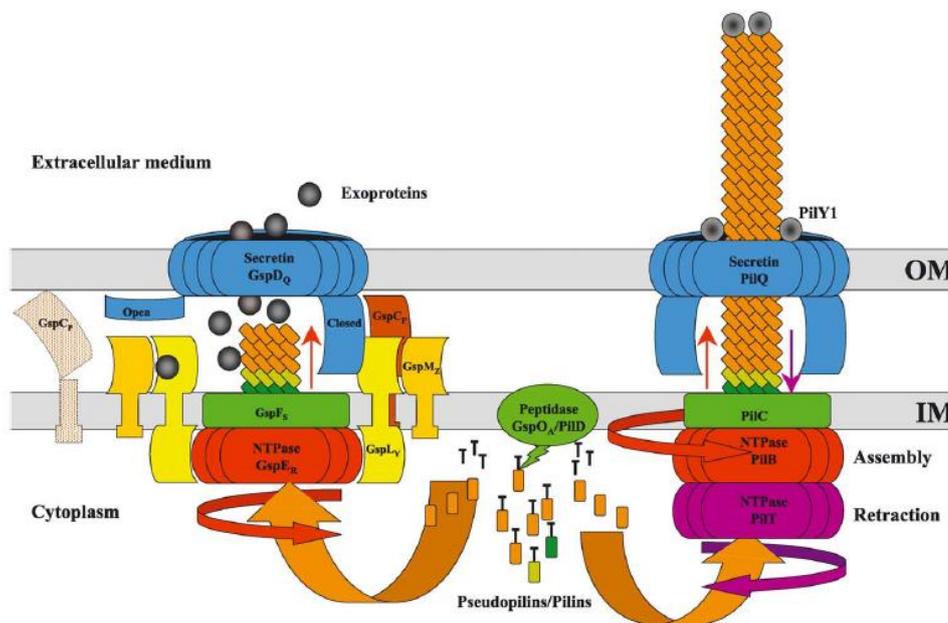


Figura 15. Representación esquemática del Sistema General de Secreción (GSP) tomado de (Filloux 2004)

Los genes que conforman los T2SS consisten en un conjunto de 12 a 16 genes organizados en operones (**Figura 16**). Cada gen *gsp* es esencial para la secreción de proteínas, con excepción de *gspB* y *gspN*, los cuales están ausentes en muchas bacterias.

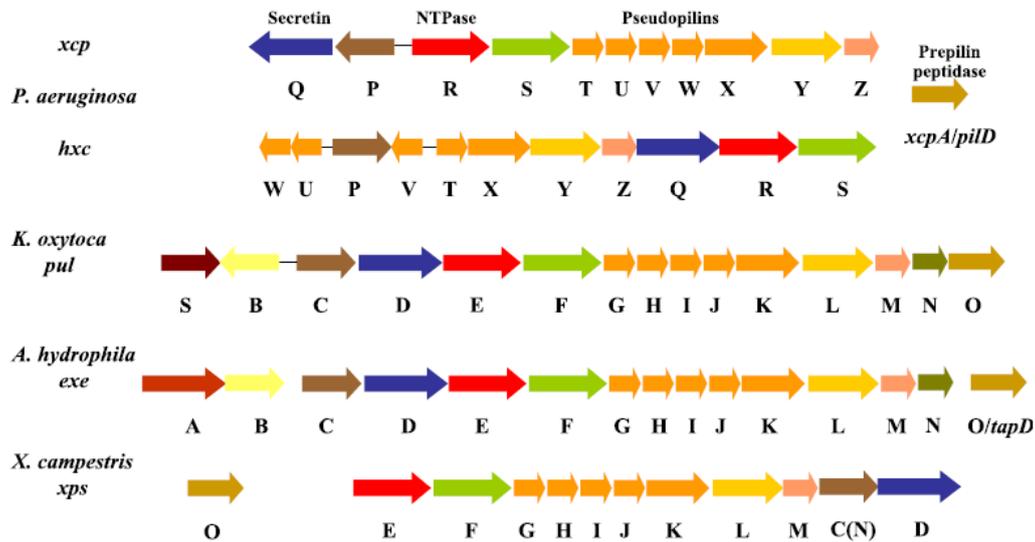


Figura 16. Organización de los genes pertenecientes al *cluster* del sistema de secreción de tipo II en *Pseudomonas aeruginosa* (*xcp* y *hxc*), *Klebsiella oxytoca* (*pul*), *Aeromonas hydrophila* (*exe*) y *Xanthomonas campestris* (*xps*) (Filloux 2004).

En las mutantes de transposición analizadas, el mini-Tn5Tel se había insertado en los genes *gspM* (en *B. ambifaria* P34), *gspL* (en *B. ambifaria* P37) y *gspE* (en *B. ambifaria* P67). Con respecto a la función de las proteínas codificadas por estos genes, se sabe que elT2SS utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP catalizada por GspE para transportar las proteínas desde el periplasma al espacio extracelular a través de GspM (Campos, Cisneros et al. 2013) (Figura 15). Se ha demostrado que mutaciones en *gspE* incapacitan la secreción de proteínas en bacterias (Turner, Lara et al. 1993, Possot and Pugsley 1994, Sandkvist, Bagdasarian et al. 1995, Py, Loiseau et al. 1999). Por otra parte, la secuencia de GspE sugiere que esta proteína es principalmente hidrofílica y no posee ningún dominio hidrofóbico que pueda anclarla a la membrana. Estos datos sugirieron que GspE estaría interactuando con otros componentes del T2SS para formar una maquinaria funcional, y se ha sugerido que GspE está unida a la cara interna de la membrana interna gracias a la interacción con el dominio citoplasmático de la proteína de membrana GspL (Figura 15) (Sandkvist, Bagdasarian et al. 1995, Ball, Chapon-Herve et al. 1999). También se demostró que la interacción GspE-GspL provoca un cambio conformacional en GspL, revelando el

dinamismo del ensamblado y funcionamiento del T2SS (Py, Loiseau et al. 1999). Por otra parte, se ha sugerido que GspM estabiliza a la proteína GspL (Michel, Bleves et al. 1998). El proceso de estabilización es recíproco ya que la abundancia de GspM en la célula depende de GspL, indicando que estos dos componentes del T2SS interactúan entre sí (**Figura 16**) (Sandkvist, Hough et al. 1999, Possot, Vignon et al. 2000, Lee, Tyan et al. 2001). A partir de estos resultados, se ha hipotetizado que la proteína GspM podría determinar la localización en la membrana del sitio de secreción, reclutando a GspL, la cual atraería a GspE (Filloux 2004).

Al evaluar la actividad lecitinasa en *B. ambifaria* **P34**, **P37** y **P67**, se observó que las mismas tampoco presentaban actividad de esta enzima, lo cual es coherente con el genotipo de estas cepas que presentan insertado el mini-transposón en genes pertenecientes al T2SS. En un trabajo realizado con la bacteria *Burkholderia pseudomallei*, se encontró que la secreción de 12 proteasas, 2 fosfolipasas y una quitinasa eran dependientes del T2SS (Burtnick, Brett et al. 2014).

Cuando se evaluó la inhibición del crecimiento del hongo *F. oxysporum* en las cepas mutantes de inserción que presentaban actividad disminuida o nula de proteasas extracelulares, se observó que sólo una de ellas, *B. ambifaria* **P12**, mostró diferencias significativas en la inhibición del hongo en comparación con la cepa salvaje *B. ambifaria* **T16**. En principio, podemos decir que la incapacidad para secretar proteasas extracelulares y la capacidad antagónica del crecimiento de *F. oxysporum* no se encuentran asociadas, aunque ambas se relacionen al metabolismo secundario. Al mapear el sitio de inserción del mini-Tn5 Tel en *B. ambifaria* **P12**, se encontró que el mismo se insertó interrumpiendo el gen *mnmE*, el cual codifica para una proteína GTPasa modificadora de RNA. La proteína MnmE se encuentra conservada en bacterias y eucariotas, y está involucrada en la regulación de una vasta cantidad de procesos celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación y la adaptación a distintas condiciones ambientales (Vetter and Wittinghofer 2001). El rol principal de esta proteína es la modificación de los tRNA, lo cual afecta el proceso de traducción del mRNA. Se ha demostrado que la ausencia de esta modificación produce un

fenotipo pleiotrópico en bacterias (Yim, Moukadiri et al. 2006, Meyer, Scrima et al. 2008, Moukadiri, Prado et al. 2009). Teniendo en cuenta esta información, sería de esperar que la pérdida de función de MnmE afecte varios procesos celulares, entre los cuales se incluirían la producción de proteasas extracelulares y el antagonismo contra *F. oxysporum* en *B. ambifaria*.

Luego de analizar el genotipo de las mutantes mini-Tn5 Tel incapaces de degradar AF, se comprobó que, en muchos casos, el mini-transposón se había insertado en distintos genes involucrados en el ciclo del 2-metilcitrato (**Figura 17**), una vía anaplerótica del carbono, que convierte propionil-CoA en piruvato, proporcionando intermediarios capaces de acoplarse al ciclo del ácido cítrico (Textor, Wendisch et al. 1997). Los genes interrumpidos fueron:

- a) *prpB* (en *B. ambifaria*FA2), el cual codifica para la enzima 2-metil isocitrato liasa
- b) *prpR*, que codifica el regulador positivo del operón involucrado en el catabolismo del propionato (en *B. ambifaria* FA4 y *B. ambifaria*FA92). En *S. entérica*, se ha demostrado que PrpR responde a la concentración intracelular de 2-metilcitrato (Palacios and Escalante-Semerena 2004)
- c) *prpF* (en *B. ambifaria* FA91), el cual codifica para la enzima 3-metilaconitato isomerasa.

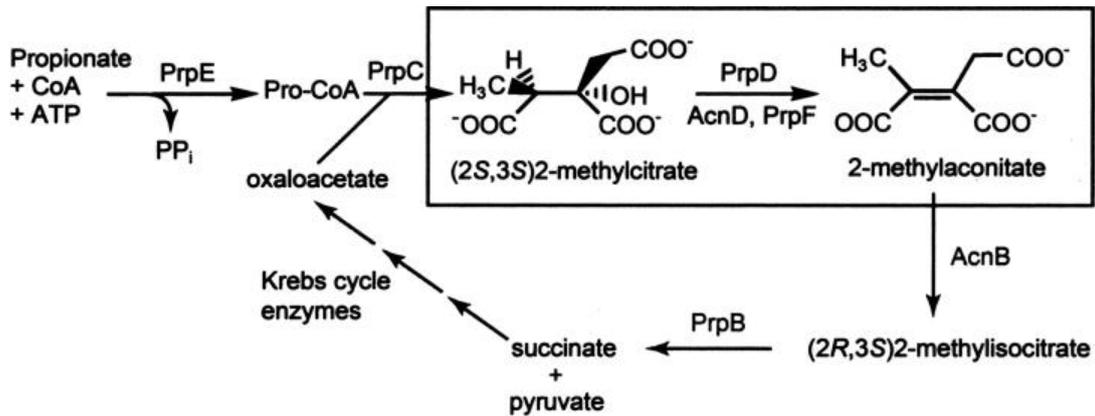


Figura 17. Ciclo del 2-metilcitrato. La enzima metilcitrato sintasa (PrpC) cataliza la condensación del propionil-CoA y oxalacetato en 2-metilcitrato (Horswill and Escalante-Semerena 1999). La deshidratación del 2-metilcitrato a 2-metilaconitato es catalizado por PrpD o por una enzima llamada AcnD. Las bacterias que utilizan AcnD requieren de la función de PrpF que lleva a la isomerización de trans-metil aconitato a cis-metil aconitato (Garvey, Rocco et al. 2007). La enzima aconitasa (AcnB) cataliza la reacción de 2-metilaconitato a 2-metilisocitrato, y por último, la enzima metilisocitrato liasa (PrpB) completa el ciclo produciendo el clivaje del 2-metilisocitrato a piruvato y succinato (Brock, Darley et al. 2001). El succinato generado por esta vía puede incorporarse al ciclo del ácido cítrico, mientras que el piruvato puede ser utilizado directamente para generación de energía y producción de biomasa (Brock, Darley et al. 2001).

La **Figura 18** muestra la organización de los genes mencionados en la bacteria *B. ambifaria* AMMD.

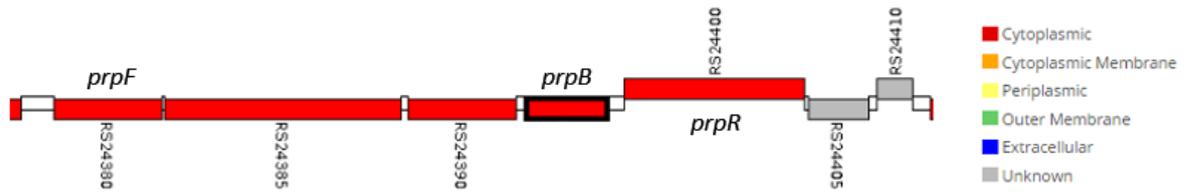


Figura 18. Organización genética del operón involucrado en el ciclo del 2-metilcitrato (catabolismo del propionato) en *B. ambifaria* AMMD.

Hasta el momento, se ha demostrado que el propionil-CoA utilizado en el ciclo del 2-metilcitrato puede derivar tanto de la activación directa del propionato a propionil-CoA, como de la degradación de ácidos grasos de cadenas impares y de aminoácidos como isoleucina, valina y metionina. Asimismo, la degradación de algunos compuestos aromáticos como el 2,4,-dinitrotolueno (2,4-DNT) en *Burkholderia* sp. cepa DNT genera propionil-CoA, el cual es degradado por el ciclo del 2-metilcitrato (Haigler, Johnson et al. 1999, Johnson, Jain et al. 2002).

Además de generar intermediarios del ciclo de Krebs, el ciclo del 2-metilcitrato detoxifica propionato, el cual posee efectos nocivos en las células, tales como acidificación del citosol, disrupción de la homeostasis de CoA y en algunos casos inhibición de las enzimas aconitasa y citrato sintasa debido a la formación de 2-metilcitrato (Brock and Buckel 2004, Limenitakis, Oppenheim et al. 2013). En un trabajo previo se confirmó que la actividad de la enzima 2-metilisocitrato liasa (MCL, codificada por *prpB*) es necesaria para la eliminación de metabolitos tóxicos generados durante el crecimiento en medios que contenían propionato (Upton and McKinney 2007).

Al analizar la tolerancia al AF, en las cepas incapaces de usar AF como fuente carbonada, encontramos que *B. ambifaria* FA2, que presenta una inserción del mini-Tn5 Tel en *prpB*, presentó una elevada sensibilidad al AF (CIM 200µg/ml), indicando que dicho

compuesto es tóxico para esta cepa. Este resultado, junto con el hecho de que la degradación de algunos compuestos aromáticos, como el 2,4-DNT genera propionil-CoA nos permite hipotetizar que probablemente la degradación de AF genere propionil-CoA, el cual ingresaría en el ciclo del 2- metilcitrato para su conversión a piruvato y succinato. Una mutación en *prpB* durante el crecimiento con AF, tendría como resultado la acumulación de metabolitos tóxicos, lo cual provocaría la muerte de la bacteria. Esto es consistente con el hecho de que ***B. ambifaria* FA2** no puede crecer cuando se agrega AF como única fuente de carbono o nitrógeno.

Cabe destacar que inserciones del mini-transposón en los genes *prpR*, regulador positivo de los genes del catabolismo del propionato (cepas ***B. ambifaria* FA4** y ***B. ambifaria* FA92**) y *prpF*, que codifica para la enzima 3-metil aconitato isomerasa (***B. ambifaria* FA91**), no alteraron la tolerancia al AF, ya que estas cepas mostraron la misma tolerancia al AF que la cepa salvaje (CIM 1600 µg/ml). Además, si bien no se observó crecimiento con AF como única fuente de carbono, se observó un crecimiento moderado cuando se agregó AF como única fuente de nitrógeno. En un estudio realizado con la bacteria *Mycobacterium smegmatis* donde compararon el efecto de la ausencia de distintos genes involucrados en el metabolismo del propionato, paradójicamente se observó que la ausencia de *prpB* era más perjudicial que la ausencia de todos los genes del operón del ciclo del 2-metilcitrato (Upton and McKinney 2007), debido a la toxicidad del metabolito 2-metilisocitrato, el cual se acumularía en ausencia de la enzima 2-metil isocitrato liasa, codificada por *prpB*. Estos resultados coinciden con lo observado en las cepas ***B. ambifaria* FA2** (inserción en *prpB*), ***B. ambifaria* FA4** (inserción en *prpR*), ***B. ambifaria* FA91** (inserción en *prpF*) y ***B. ambifaria* FA92** (inserción en *prpR*), ya que la inserción en *prpB* disminuyó notablemente la tolerancia al AF, pero no la inserción en el resto de los genes. En este punto, es importante mencionar que debido a que los genes están organizados en un operón (**Figura 18**), inserciones en *prpB* podrían afectar también la transcripción de los genes ubicados río abajo. Adicionalmente, para corroborar los resultados obtenidos, debería realizarse una complementación génica, suministrando en *trans* los genes interrumpidos y evaluando el fenotipo resultante.

Para el caso de la mutante *B. ambifaria* FA84, se identificó que el mini-Tn5Telse insertó en un gen que codifica para una enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa. Esta enzima participa en la vía de la gluconeogénesis, específicamente catalizando la reacción de fosfoenolpiruvato a oxalacetato, metabolito que se encuentra en varias vías metabólicas, y utilizado en la vía del 2- metilcitrato para formar 2-metilcitrato a partir de propionil-CoA. Al analizar la tolerancia al AF y la utilización de este compuesto como única fuente de nitrógeno en esta cepa, no se observaron cambios con respecto a la cepa salvaje, indicando que en *B. ambifaria* FA84 sólo se ve alterada la utilización de AF como única fuente carbonada. Teniendo en cuenta el rol de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la generación de oxalacetato y el requerimiento de oxalacetato en el ciclo del 2-metil citrato, podemos suponer que una mutación en esta enzima imposibilita el funcionamiento del ciclo del 2-metilcitrato, y así la generación de succinato y piruvato para la generación de energía y/o biomasa a partir de la degradación de propionil-CoA o compuestos que generen este intermediario (como podría ser el AF). De todas formas, considerando que existen varias fosfoenolpiruvato carboxilasas en el genoma de *Burkholderia ambifaria*, serían necesarios muchos más estudios para confirmar esta hipótesis.

Otro de los genes interrumpidos por el mini-transposón que generó un fenotipo incapaz de crecer con AF como única fuente carbonada (*B. ambifaria*FA21) fue CH72_RS525570, el cual codifica una enzima acil-CoA deshidrogenasa, la cual participa en la primera reacción de la vía

a de la β -oxidación de los ácidos grasos (**Figura 19**), catalizando la deshidrogenación de los carbonos 2 y 3 de un acil-CoA graso. Los ácidos grasos saturados que ingresan a esta vía son procesados hasta dejar 2 o 3 carbonos en la cadena.

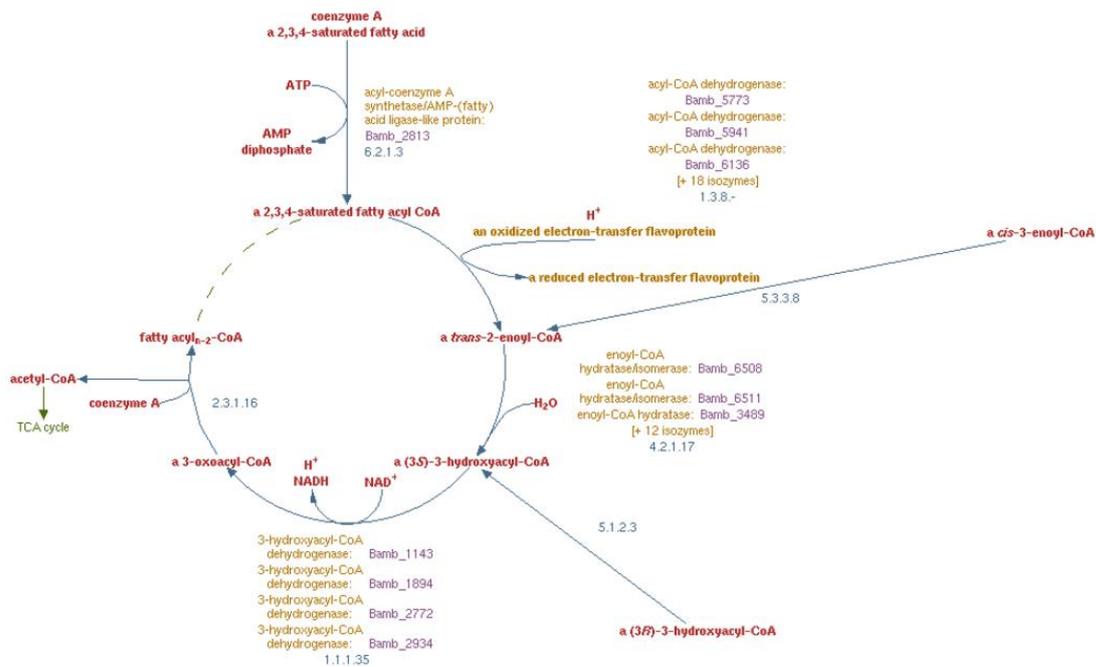


Figura 19. Representación gráfica de la β-oxidación de ácidos grasos.

Cuando los ácidos grasos de cadenas pares son degradados, el producto final es acetyl-CoA, el cual es un clásico intermediario del metabolismo central y puede ingresar tanto al ciclo del ácido cítrico como al ciclo del glioxalato, para su uso en biosíntesis. Cuando un ácido graso de cadena impar es degradado, el producto final de esta vía es el propionil-CoA (Clark 1981). Por otro lado, cabe destacar que inmediatamente río arriba de CH72_RS525570 se encuentra un gen perteneciente a la familia de reguladores LysR con un dominio de reconocimiento de compuestos nitro aromáticos (Lopez-Sanchez, Rivas-Marin et al. 2009, Sainsbury, Lane et al. 2009), los cuales modulan la expresión de genes involucrados en vías de degradación de compuestos aromáticos (Lonneborg and Brzezinski 2011). Por este motivo, suponemos que esta enzima debe poseer un rol importante en la degradación del AF. Asimismo, si bien la tolerancia al AF no se vio afectada en *B. ambifaria*FA21, esta cepa fue incapaz de crecer con AF como única fuente de nitrógeno, lo cual es otro dato a favor del rol de este gen en la degradación de AF.

En la mutante *B. ambifaria*FA3 se observó la interrupción del gen *m1aD*, el cual codifica para una lipoproteína de membrana externa que forma parte del complejo

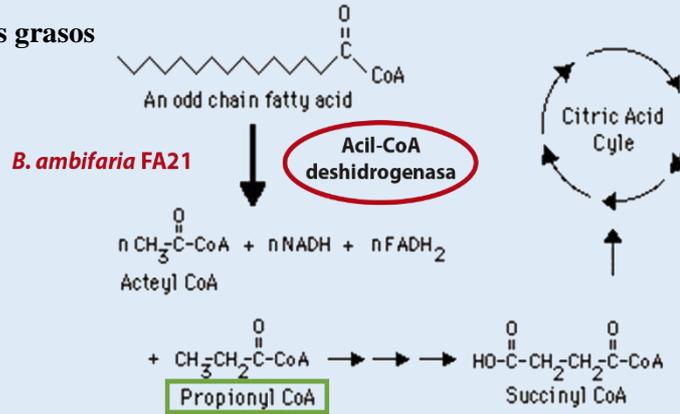
denominado Mla, el cual está involucrado en preservar la asimetría lipídica de la membrana externa en bacterias Gram negativas mediante un sistema de transporte de lípidos. Se ha demostrado que la proteína MlaD es importante para prevenir la exposición de fosfolípidos en la superficie de la membrana externa, y así evitar la sensibilidad a moléculas tóxicas (C., Malinverni et al. 2009). *B. ambifaria* FA3 fue incapaz de crecer con AF como única fuente de carbono y nitrógeno, además de ser muy sensible a la presencia de AF. Estos resultados coinciden con el genotipo de esta cepa, ya que la ausencia de esta proteína incrementaría marcadamente la sensibilidad al AF, provocando la muerte de la célula. Este resultado estaría indicando la importancia de MlaD y del sistema Mla en la tolerancia al AF en bacterias.

Finalmente, se observó que para la mutante *B. ambifaria* FA90, el mini-transposón interrumpió una región intergénica ubicada entre los locus genéticos CH72_RS02970 y CH72_RS02975. Esta cepa fue incapaz de utilizar AF como fuente de carbono, mostró un crecimiento disminuido al crecer con AF como fuente de nitrógeno y una tolerancia menor al AF en comparación con la cepa salvaje. En el caso de esta inserción, podemos presuponer que se estarían afectando secuencias reguladoras y/o promotoras del *locus* genético adyacente (*locus* ubicado río abajo: CH72_RS02975), el cual codifica para la proteína Ribonucleasa E. Esta endoribonucleasa juega un papel central en la maduración de las subunidades 5S y 16S de ARN ribosomales y de la mayoría de los ARN de transferencia. Además, está involucrada en la degradación de ARN mensajeros en *E. coli* y otras Proteobacterias (Mudd, Krisch et al. 1990, Li, Pandit et al. 1999, Walsh, Tock et al. 2001, Li and Deutscher 2002, Marcaida, DePristo et al. 2006). Por lo tanto, cabe esperar que la pérdida total o parcial de la función de la ribonucleasa E tenga efectos pleiotrópicos, afectando una gran cantidad de procesos celulares entre los cuales podría encontrarse la degradación y/o tolerancia del/al AF.

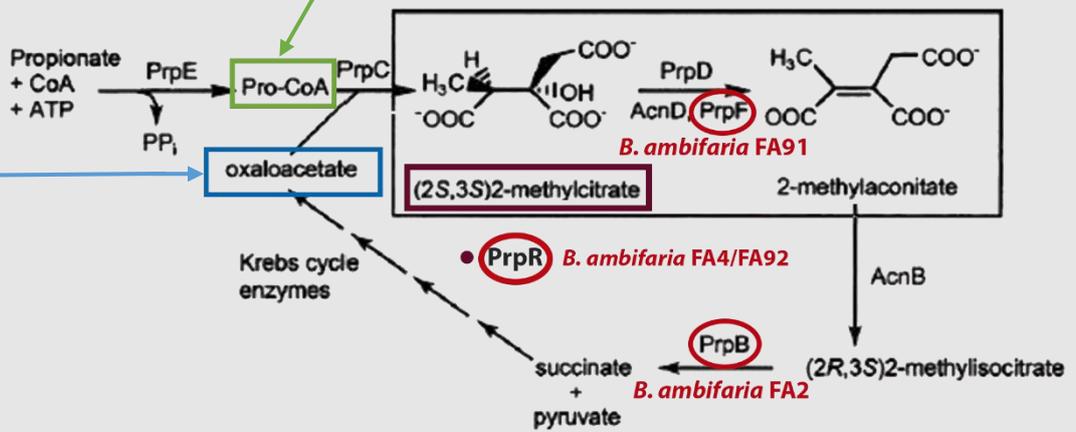
Como se mencionó en la Introducción, los mecanismos de degradación y tolerancia al AF en bacterias se desconocen hasta la fecha. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron identificar genes potencialmente necesarios para la degradación y/o tolerancia de/al AF en *Burkholderia ambifaria* T16 (Figura 20). Si bien estos resultados deberán ser

confirmados por análisis posteriores, parece ser clara la importancia de los genes involucrados en el catabolismo del propionato en la degradación del AF, ya que hemos obtenido varias mutantes de inserción en estos genes incapaces de utilizarlo como única fuente carbonada, algunas de las cuales resultaron más sensibles al AF que la cepa salvaje. Con estos datos, podemos suponer que el propionato es un subproducto de la degradación del AF en ***Burkholderia ambifaria*T16**. Asimismo, la inserción del mini-transposón en el gen *mIaD* sugiere que este gen resulta de suma importancia para la tolerancia al AF en ***Burkholderia ambifaria***.

β-oxidación de ácidos grasos



Ciclo del 2-metilcitrato



Gluconeogénesis



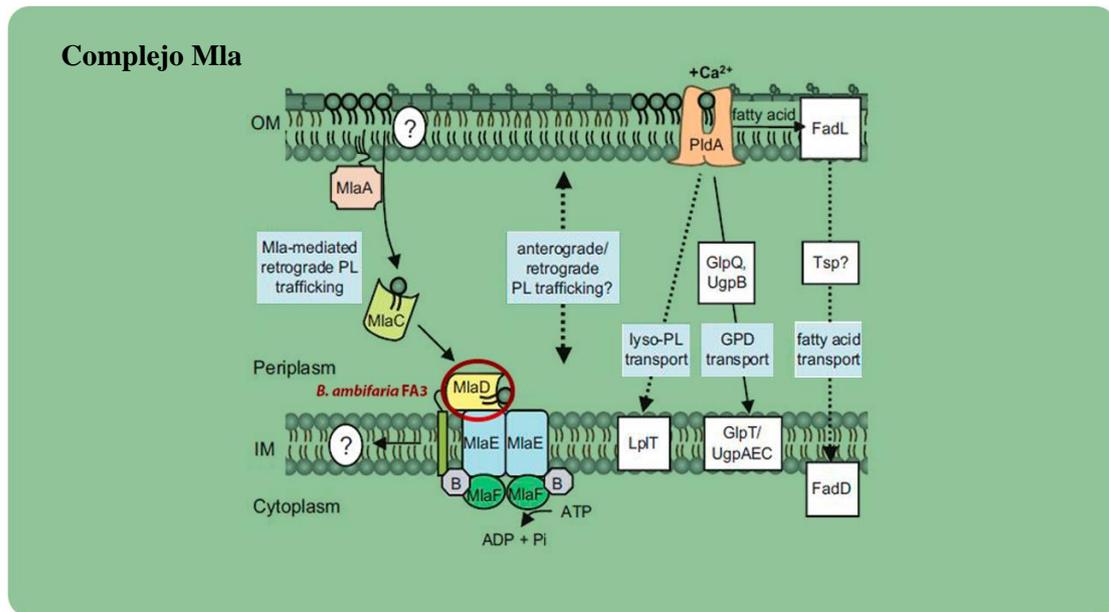


Figura 20. Esquema de proteínas y vías metabólicas que estarían afectadas en las mutantes de inserción de *B. ambifaria* T16 incapaces de crecer con AF como única fuente carbonada. Se indican con un círculo rojo las proteínas en las cuales se insertó el mini-Tn5 Tel en cada mutante.

13. Conclusiones

En resumen, se puede concluir que:

Mutaciones en los genes involucrados en la vía del 2-metilcitrato y otros relacionados con el catabolismo del propionato afectan la tolerancia y/o degradación del AF. De acuerdo con este resultado, se puede suponer que el propionato sería un intermediario en la degradación del AF en *Burkholderia ambifaria* T16.

El gen *miaD* es necesario para la tolerancia al AF en *Burkholderia ambifaria* T16.

14. Perspectivas Futuras

Sería interesante seguir investigando los mecanismos de degradación y tolerancia al AF en *Burkholderia ambifaria* T16. En primer lugar, los resultados obtenidos con las mutantes de inserciones por transposición en la degradación y tolerancia al AF deberán confirmarse mediante análisis de complementación génica con los genes correspondientes a fin de definir el rol de los mismos en el mecanismo de degradación del AF.

15. Potencial aplicación biotecnológica

Los hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Fusarium* causan epidemias muy destructivas que afectan una gran variedad de cultivos, entre los que se encuentran gramíneas, leguminosas, solanáceas y cucurbitáceas. Las especies de *Fusarium* producen diversos compuestos con toxicidad entre media y elevada para bacterias, plantas, animales y humanos. Entre estos compuestos, se encuentra el ácido fusárico (AF). Junto con los tricotecenos y las fumonicinas, el AF es una de las principales micotoxinas contaminantes en granos de cereales y en forrajes a nivel mundial, lo cual constituye un problema de seguridad alimentaria. Asimismo, el AF también puede encontrarse en frutos de plantas infectadas, como banana o tomate.

En las últimas décadas se ha observado un aumento de la incidencia de la fusariosis de espiga en trigo y cebada en Argentina. En el caso del cultivo de maíz, las especies de *Fusarium* más importantes en semilla son *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. equiseti*. La importancia de controlar la presencia del patógeno en la semilla radica en el riesgo de contaminación de los suelos al momento de la siembra, además del riesgo alimentario, ya que los patógenos presentes en las semillas son los que ocasionan posteriormente la pudrición de raíz y tallo y las que generan micotoxinas en semillas y frutos.

Los efectos económicos de las plagas y enfermedades en cultivos pueden ser complejos y exceder el efecto inmediato en los productos agrícolas directamente afectados. En la **Figura 21** se ilustran algunos de los posibles efectos. El mayor efecto económico es la pérdida de la

producción o la menor eficiencia de la misma, lo que reduce los ingresos agrícolas. Los efectos de una menor productividad de los cultivos pueden ser de larga duración. Las infestaciones de las plagas pueden afectar las tasas de fertilización o la recuperación de las semillas, mientras que las aplicaciones plaguicidas pueden dañar la fertilidad del suelo y el agua. Aunque la pérdida de producción puede parecer fácil de identificar, resulta no obstante difícil medirla en términos económicos precisos (Food and Agriculture Organization of the United Nations - <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s16.htm>).



Figura 21. Efecto económico potencial de las plagas y enfermedades en cultivos.

En nuestro país la agricultura se basa en la aplicación de plaguicidas sintéticos, los cuales tienen efectos nocivos en el medio ambiente y contribuyen al surgimiento de patógenos resistentes. Por este motivo, uno de los desafíos en el campo de la agricultura es investigar e implementar alternativas sustentables basadas en los mecanismos que tienen lugar en la naturaleza para el control de plagas. Entre estas alternativas se encuentra la utilización de bacterias como agentes de biocontrol de fitopatógenos. Si bien existen cepas bacterianas con capacidad de biocontrol de enfermedades causadas por *Fusarium spp.*, se ha demostrado que el AF disminuye la viabilidad y la producción de sustancias antifúngicas en estas

rizobacterias, afectando negativamente su capacidad de supervivencia y competencia en el suelo. El conocimiento generado en este trabajo podría ser aplicado en el biocontrol de enfermedades causadas por *Fusarium spp.*, así como también en procesos de detoxificación de la micotoxina.

16. Bibliografía

- Astrom, S. U. and A. S. Bystrom (1994). "Rit1, a tRNA backbone-modifying enzyme that mediates initiator and elongator tRNA discrimination." *Cell***79**(3): 535-546.
- Bacon, C. and D. Hinton (1996). "Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a nonobligate pathogen of corn." *Adv. Exp. Med. Biol.***59**: 1391-1395.
- Bacon, C., J. Porter and W. Norred (1995). "Toxic interaction of fumonisin B1 and fusaric acid measured by injection into fertile chicken egg." *Mycopathologia* **129**: 29-35.
- Bacon, C. W., D. M. Hinton and A. Hinton, Jr. (2006). "Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavenis* and other biocontrol *Bacillus* species." *J Appl Microbiol***100**(1): 185-194.
- Bacon, C. W., J. K. Porter, W. P. Norred and J. F. Leslie (1996). "Production of fusaric acid by *Fusarium* species." *Appl Environ Microbiol***62**(11): 4039-4043.
- Ball, G., V. Chapon-Herve, S. Bleves, G. Michel and M. Bally (1999). "Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol***181**(2): 382-388.
- Ballard, R. W., N. J. Palleroni, M. Doudoroff, R. Y. Stanier and M. Mandel (1970). "Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliicola* and *P. caryophylli*." *J Gen Microbiol***60**(2): 199-214.
- Bosland, P. W. (1998). "*Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species." *Advances in plant pathology***6**: 281-289.
- Brock, M. and W. Buckel (2004). "On the mechanism of action of the antifungal agent propionate." *Eur J Biochem***271**(15): 3227-3241.
- Brock, M., D. Darley, S. Textor and W. Buckel (2001). "2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes." *Eur J Biochem***268**(12): 3577-3586.
- Burkhead, K. D., D. A. Schisler and P. J. Slininger (1994). "Pyrrolnitrin Production by Biological Control Agent *Pseudomonas cepacia* B37w in Culture and in Colonized Wounds of Potatoes." *Appl Environ Microbiol***60**(6): 2031-2039.
- Burkholder, W. (1950). "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." *Phytopathology***64**: 468-475.
- Burtneck, M. N., P. J. Brett and D. DeShazer (2014). "Proteomic analysis of the *Burkholderia pseudomallei* type II secretome reveals hydrolytic enzymes, novel proteins, and the deubiquitinase TssM." *Infect Immun***82**(8): 3214-3226.

- C., J., J. Malinverni, J. Thomas and Silhavy (2009). "An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane." *Proc Natl Acad Sci USA***106**: 8009-80014.
- Campos, M., D. A. Cisneros, M. Nivaskumar and O. Francetic (2013). "The type II secretion system - a dynamic fiber assembly nanomachine." *Res Microbiol***164**(6): 545-555.
- Cimermancic, P., M. H. Medema, J. Claesen, K. Kurita, L. C. Wieland Brown, K. Mavrommatis, A. Pati, P. A. Godfrey, M. Koehrsen, J. Clardy, B. W. Birren, E. Takano, A. Sali, R. G. Linington and M. A. Fischbach (2014). "Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters." *Cell***158**(2): 412-421.
- Claes, W. A., A. Puhler and J. Kalinowski (2002). "Identification of two prpDBC gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle." *J Bacteriol***184**(10): 2728-2739.
- Clark, D. (1981). "Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: analysis by operon fusion." *J Bacteriol***148**(2): 521-526.
- Coenye, T., E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. P. Speert and P. Vandamme (2001). "*Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates." *Int J Syst Evol Microbiol***51**(Pt 4): 1481-1490.
- Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay and P. Vandamme (2001). "*Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient." *Int J Syst Evol Microbiol***51**(Pt 5): 1729-1735.
- Chul-Hoon, L., M. Kim and K. H. (2004). "An antifungal property of *burkholderia ambifaria* against *erysiphe graminis* and *puccinia recondite*." *Journal of Microbial Biotechnology***16**: 465-468.
- Das, S., J. C. Noe, S. Paik and T. Kitten (2005). "An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites." *J Microbiol Methods***63**(1): 89-94.
- de Lorenzo, V. and K. N. Timmis (1994). "Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons." *Methods Enzymol***235**: 386-405.
- Depoorter, E., M. J. Bull, C. Peeters, T. Coenye, P. Vandamme and E. Mahenthiralingam (2016). "*Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers." *Appl Microbiol Biotechnol***100**(12): 5215-5229.
- Desjardins, A. E. (2006). "Fusarium micotoxins." *Chemistry, Genetics and Biology*.
- Duffy, B., C. Keel and G. Defago (2004). "Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection." *Appl Environ Microbiol***70**(3): 1836-1842.

- el-Banna, N. and G. Winkelmann (1998). "Pyrrolnitrin from Burkholderia cepacia: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes." *J Appl Microbiol***85**(1): 69-78.
- El-Banna, N. and G. Winkelmann (1998). "Pyrrolnitrin from Burkholderia cepacia: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes." *Journal of Applied Microbiology***85**: 69-78.
- El-Hassan, K. I., M. G. El-Saman, A. A. Mosa and M. H. Mostafa (2007). "Variation among Fusarium spp. the causal of potato tuber dry rot in their Pathogenicity and Mycotoxins production." *J. Phytopathol.***35**: 53-68.
- Elsas, J. D. V., J. K. Jansson and J. T. Trevors (2007). "Modern soil microbiology." CRC Press**2nd edition**.
- Fernandez-Tresguerres, M. E., M. Martin, D. Garcia de Viedma, R. Giraldo and R. Diaz-Orejas (1995). "Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range." *J Bacteriol***177**(15): 4377-4384.
- Filloux, A. (2004). "The underlying mechanisms of type II protein secretion." *Biochim Biophys Acta***1694**(1-3): 163-179.
- Fiore, A., S. Laevens, A. Bevivino, C. Dalmastrì, S. Tabacchioni, P. Vandamme and L. Chiarini (2001). "Burkholderia cepacia complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy." *Environ Microbiol***3**(2): 137-143.
- Fislage, M., L. Wauters and W. Versee (2016). "Invited review: MnmE, a GTPase that drives a complex tRNA modification reaction." *Biopolymers***105**(8): 568-579.
- Fries, M. (1997). "Phenol- and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred." *Appl Environ Microbiol***63**: 1523-1530.
- Gaetán, S., M. Madia and A. Curioni (2007). "Especies del género Fusarium asociadas al declinamiento del orégano en la Argentina." *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Medic. Aromat.***6**: 342-343.
- Garvey, G. S., C. J. Rocco, J. C. Escalante-Semerena and I. Rayment (2007). "The three-dimensional crystal structure of the PrpF protein of Shewanella oneidensis complexed with trans-aconitate: insights into its biological function." *Protein Sci***16**(7): 1274-1284.
- Gaumann, E. (1958). "The mechanism of fusaric acid injury." *Nat Rev Microbiol***3**: 307-319.
- Gillis, M., T. Vanvan, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin and M. P. Fernandez (1995). "Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to an emended description of the genus and proposition of Burkholderia vietnamiensis sp. nov. for N2-fixing isolates from rice in Vietnam." *Int. J. Syst. Bacteriol.***45**(274-289).

- Groenhagen, U., R. Baumgartner, A. Bailly, A. Gardiner, L. Eberl, S. Schulz and L. Weisskopf (2013). "Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains." *J Chem Ecol***39**(7): 892-906.
- Haas, D. and G. Defago (2005). "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads." *Nat Rev Microbiol***3**(4): 307-319.
- Hagedorn, C., W. D. Gould, T. R. Bardinelli and D. R. Gustavson (1987). "A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil." *Appl Environ Microbiol***53**(9): 2265-2268.
- Haigler, B. E., G. R. Johnson, W. C. Suen and J. C. Spain (1999). "Biochemical and genetic evidence for meta-ring cleavage of 2,4, 5-trihydroxytoluene in *Burkholderia* sp. strain DNT." *J Bacteriol***181**(3): 965-972.
- Hall, C., J. Busch, K. Shippy, C. Allender, M. Kaestli, M. Mayo, J. W. Sahl, J. M. Schupp, R. E. Colman, P. Keim, B. Currie and D. M. Wagner (2015). "Diverse *Burkholderia* Species Isolated from Soils in the Southern United States with No Evidence of *B. pseudomallei*." *PLoS One***10**: e0143254.
- Hamdane, D., M. Argentini, D. Cornu, H. Myllykallio, S. Skouloubris, G. Hui-Bon-Hoa and B. Golinelli-Pimpaneau (2011). "Insights into folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase mechanism: role of two highly conserved cysteines in catalysis." *J Biol Chem***286**(42): 36268-36280.
- Hansen, L. H., S. J. Sørensen and L. B. Jensen (1997). "Chromosomal insertion of the entire *Escherichia coli* lactose operon, into two strains of *Pseudomonas*, using a modified mini-Tn5 delivery system." *Gene***186**(2): 167-173.
- Herrero, M., V. de Lorenzo and K. N. Timmis (1990). "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." *J Bacteriol***172**(11): 6557-6567.
- Horswill, A. R., A. R. Dudding and J. C. Escalante-Semerena (2001). "Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth." *J Biol Chem***276**(22): 19094-19101.
- Horswill, A. R. and J. C. Escalante-Semerena (1999). "*Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle." *J Bacteriol***181**(18): 5615-5623.
- Hwang, J., W. S. Chilton and M. Benson (2002). "Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of rhizoctonia stem rot of poinsettia." *Biological control***25**(1): 56-63.
- Isles, A., I. Maclusky, M. Corey, R. Gold, C. Prober, P. Fleming and H. Levison (1984). "*Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem." *J Pediatr***104**(2): 206-210.
- Jiang, C. Y., X. F. Sheng, M. Qian and Q. Y. Wang (2008). "Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and

its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil." *Chemosphere***72**(2): 157-164.

Johnson, G. R., R. K. Jain and J. C. Spain (2002). "Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway." *J Bacteriol***184**(15): 4219-4232.

Kalyanasundaram, R. (1958). "Production of fusaric acid by *Fusarium lycopersici* sacc. in the rhizosphere of tomato plants." *J. Phytopathol.***32**: 25-34.

Kalyanasundaram, R. and C. Venkata Ram (1956). "Production and systemic translocation of fusaric acid in *Fusarium* infected cotton plants." *J. Indian Bot. Soc.***44**: 322-340.

Koehler, K. and F. Bentrup (1983). "The effect of fusaric acid upon electrical membrane properties and ATP level in photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*." *Mycotoxins and Phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety.***4**: 355-361.

Kuiper-Goodman, T. (1998). *Mycotoxins and Phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety.*

Kuzniak, E. (2001). "Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures." *J. Phytopathol.***149**: 575-582.

Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink and B. Witholt (1988). "Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates." *Appl Environ Microbiol***54**(12): 2924-2932.

Landa, B. B., J. M. Cachinero-Diaz, P. Lemanceau, R. M. Jimenez-Diaz and C. Alabouvette (2002). "Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*." *Can J Microbiol***48**(11): 971-985.

Lee, H. M., S. W. Tyan, W. M. Leu, L. Y. Chen, D. C. Chen and N. T. Hu (2001). "Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-xpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus." *J Bacteriol***183**(2): 528-535.

Li, C., C. Zuo, G. Deng, R. Kuang, Q. Yang, C. Hu, O. Sheng, S. Zhang, L. Ma, Y. Wei, J. Yang, S. Liu, M. K. Biswas, A. Viljoen and G. Yi (2013). "Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*." *PLoS One***8**(7): e70226.

Li, W., D. P. Roberts, P. D. Dery, S. L. F. Meyer, S. Lohrke, R. D. Lumsden and K. P. Hebbar (2002). "Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* bc-f. Crop protection." *Crop Prot.***21**: 129-135.

Li, Z. and M. P. Deutscher (2002). "RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors." *RNA***8**(1): 97-109.

Li, Z., S. Pandit and M. P. Deutscher (1999). "RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA." *EMBO J***18**(10): 2878-2885.

- Limenitakis, J., R. D. Oppenheim, D. J. Creek, B. J. Foth, M. P. Barrett and D. Soldati-Favre (2013). "The 2-methylcitrate cycle is implicated in the detoxification of propionate in *Toxoplasma gondii*." *Mol Microbiol***87**(4): 894-908.
- Lonneborg, R. and P. Brzezinski (2011). "Factors that influence the response of the LysR type transcriptional regulators to aromatic compounds." *BMC Biochem***12**: 49.
- Lopez-Sanchez, A., E. Rivas-Marin, O. Martinez-Perez, B. Floriano and E. Santero (2009). "Co-ordinated regulation of two divergent promoters through higher-order complex formation by the LysR-type regulator ThnR." *Mol Microbiol***73**(6): 1086-1100.
- Lori, G., I. Malbrán, C. Mourellos and S. Wolcan (2016). "First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* Race 2 causing *Fusarium* yellows on celery in Argentina." *Plant Disease***100**: 1020.
- Lori, G. A., M. N. Sisterna, M. Haidukowski and I. Rizzo (2003). "*Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina." *Microbiol Res***158**(1): 29-35.
- Lu, S. E., J. Novak, F. W. Austin, G. Gu, D. Ellis, M. Kirk, S. Wilson-Stanford, M. Tonelli and L. Smith (2009). "Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*." *Biochemistry***48**(35): 8312-8321.
- Mahenthalingam, E., L. Song, A. Sass, J. White, C. Wilmot, A. Marchbank, O. Boaisa, J. Paine, D. Knight and G. L. Challis (2011). "Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* Genomic Island." *Chem Biol***18**(5): 665-677.
- Malbrán, I., C. Mourellos, M. Mitidieri, L. Ronco and G. Lori (2014). "*Fusarium* wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Argentina." *Plant Disease***98**: 1281.
- Maniatis, T. J. (1982). "Molecular cloning: a laboratory manual." In C. S. Laboratory **New York: Cold Spring Harbor**.
- Mao, W., R. D. Lunmsden, J. A. Lewis and K. P. Hebbar (1998). "Seed treatment using pre-infiltration and biocontrol agents to reduce damping-off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*." *Plant Disease***82**: 294-299.
- Marcaida, M. J., M. A. DePristo, V. Chandran, A. J. Carpousis and B. F. Luisi (2006). "The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution." *Trends Biochem Sci***31**(7): 359-365.
- Marré, M. T., P. Vergani and F. Albergoni, G. (1993). "Relation-ship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration." *Physiol. Mol. Plant Pathol.***42**(2): 141-157.
- Martinez-Garcia, E., B. Calles, M. Arevalo-Rodriguez and V. de Lorenzo (2011). "pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes." *BMC Microbiol***11**: 38.

- Meyer, S., A. Scrima, W. Versees and A. Wittinghofer (2008). "Crystal structures of the conserved tRNA-modifying enzyme GidA: implications for its interaction with MnmE and substrate." *J Mol Biol***380**(3): 532-547.
- Michel, G., S. Bleves, G. Ball, A. Lazdunski and A. Filloux (1998). "Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology***144** (Pt 12): 3379-3386.
- Miller, J. M. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, S. C., J. J. LiPuma and J. L. Parke (2002). "Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments." *Appl Environ Microbiol***68**(8): 3750-3758.
- Moukadiri, I., S. Prado, J. Piera, A. Velazquez-Campoy, G. R. Bjork and M. E. Armengod (2009). "Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions." *Nucleic Acids Res***37**(21): 7177-7193.
- Mudd, E. A., H. M. Krisch and C. F. Higgins (1990). "RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that rne and ams are the same genetic locus." *Mol Microbiol***4**(12): 2127-2135.
- Muller , A., J. Schmidhuber , J. Hoogeveen and P. Steduto (2008). "Some insights in the effect of growing bio-energy demand on global food security and natural resources." *Water Policy***10**: 83-94.
- Nelson, P. E., M. C. Dignani and E. J. Anaissie (1994). "Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species." *Clin Microbiol Rev***7**(4): 479-504.
- Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach, D. Haas and G. Defago (2002). "Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat." *Appl Environ Microbiol***68**(5): 2229-2235.
- Ottaviano (2015). *Aislamiento y caracterización de una rizobacteria capaz de degradar ácido fusárico y de inhibir el crecimiento de hongos del género Fusarium*, Universidad de Buenos Aires.
- Palacios, S. and J. C. Escalante-Semerena (2004). "2-Methylcitrate-dependent activation of the propionate catabolic operon (prpBCDE) of *Salmonella enterica* by the PrpR protein." *Microbiology***150**(Pt 11): 3877-3887.
- Palleroni, N., R. Kunisawa, R. Contopoulou and M. Doudoroff (1973). "Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*." *Int J Syst Bacteriol***23**(333-339).
- Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman (2001). "Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains." *Annu Rev Phytopathol***39**: 225-258.

- Parker, W. L., M. L. Rathnum, V. Seiner, W. H. Trejo, P. A. Principe and R. B. Sykes (1984). "Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*." *J Antibiot (Tokyo)***37**(5): 431-440.
- Parmeggiani, A., I. M. Krab, T. Watanabe, R. C. Nielsen, C. Dahlberg, J. Nyborg and P. Nissen (2006). "Enacyloxin IIa pinpoints a binding pocket of elongation factor Tu for development of novel antibiotics." *J Biol Chem***281**(5): 2893-2900.
- Pavlovkin, J., I. Mistrik and M. Prokop (2004). "Some aspects of the phytotoxic action of fusaric acid on primary *Ricinus* roots."
- Pedersen, E. A., R. M.S. and P. Chakravarty (1999). "Effect of three species of bacteria on damping-off, root rot development, and ectomychorrhizal colonization of lodgepole pine and white spruce seedlings." *European Journal of For. Path.***29**: 123-134.
- Pegg, G. F. (1981). *Fungal Wilt Diseases of Plants*. New York.
- Pioli, R. N., L. Mizzoni and E. N. Morandi (2004). "First report about pathogenic association between *F. graminearum* and Soybean." *Plant Disease Note*.
- Possot, O. and A. P. Pugsley (1994). "Molecular characterization of PuleE, a protein required for pullulanase secretion." *Mol Microbiol***12**(2): 287-299.
- Possot, O. M., G. Vignon, N. Bomchil, F. Ebel and A. P. Pugsley (2000). "Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PuleE." *J Bacteriol***182**(8): 2142-2152.
- Pugsley, A. P. (1991). "The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria." *American Society for Microbiology***57**: 50-108.
- Putz, J., C. Florentz, F. Benseler and R. Giege (1994). "A single methyl group prevents the mischarging of a tRNA." *Nat Struct Biol***1**(9): 580-582.
- Py, B., L. Loiseau and F. Barras (1999). "Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL." *J Mol Biol***289**(3): 659-670.
- Ramette, A., J. J. LiPuma and J. M. Tiedje (2005). "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." *Appl Environ Microbiol***71**(3): 1193-1201.
- Reik, R., T. Spilker and J. J. Lipuma (2005). "Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis." *J Clin Microbiol***43**(6): 2926-2928.
- Reynoso, M. and K. S. N. Chulse (2009). "Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina." *European Journal of Plant Pathology*: 123-207.

- Roberts, I. N., C. Ottaviano, M. Muschietti and J. A. Ruiz (2013). Caracterización de una cepa de Burkholderia sp. aislada de la rizósfera de plantas de cebada con capacidad de degradar ácido fusárico. IX Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos y 1er Congreso Nacional de Biología de Suelos. Santiago del Estero. Argentina.
- Roberts, I. N., C. Ottaviano, M. Muschietti and J. A. Ruiz. (2014). Aislamiento de una rizobacteria con capacidad de prevenir el efecto tóxico del ácido fusárico en plántulas de cebada. Cuarta Jornada del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales: aportes de la microbiología a la producción de cultivos. . Facultad de Agronomía, BuenosAires.: 145 - 151.
- Ruiz, J. A., E. M. Bernar and K. Jung (2015). "Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in Pseudomonas protegens Pf-5." PLoS One **10**(1): e0117040.
- Sainsbury, S., L. A. Lane, J. Ren, R. J. Gilbert, N. J. Saunders, C. V. Robinson, D. I. Stuart and R. J. Owens (2009). "The structure of CrgA from Neisseria meningitidis reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators." Nucleic Acids Res **37**(14): 4545-4558.
- Sambrook, J. and M. R. Green (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual." Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sanchez-Romero, J. M., R. Diaz-Orejas and V. de Lorenzo (1998). "Resistance to Tellurite as a Selection Marker for Genetic Manipulations of Pseudomonas Strains." Applied and Environmental Microbiology **64**: 4040-4046.
- Sandkvist, M., M. Bagdasarian, S. P. Howard and V. J. DiRita (1995). "Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in Vibrio cholerae." EMBO J **14**(8): 1664-1673.
- Sandkvist, M., L. P. Hough, M. M. Bagdasarian and M. Bagdasarian (1999). "Direct interaction of the EpsL and EpsM proteins of the general secretion apparatus in Vibrio cholerae." J Bacteriol **181**(10): 3129-3135.
- Schellenberg, B., L. Bigler and R. Dudler (2007). "Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium." Environ Microbiol **9**(7): 1640-1650.
- Schenzel, J., H. R. Forrer, S. Vogelgsang, K. Hungerbuhler and T. D. Bucheli (2012). "Mycotoxins in the environment: I. Production and emission from an agricultural test field." Environ Sci Technol **46**(24): 13067-13075.
- Schlomann, M., E. Schmidt and H. J. Knackmuss (1990). "Different types of diene lactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria." J Bacteriol **172**(9): 5112-5118.
- Schnider-Keel, U., A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. Gigot-Bonnefoy, C. Reimann, R. Notz, G. Defago, D. Haas and C. Keel (2000). "Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens CHA0

and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin." *J Bacteriol***182**: 1215-1225.

Schweizer, H. P. (2003). "Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions." *Genet. Mol. Res.***2**: 48-62.

Selim, E. and N. El-Gammal (2015). "Role of Fusaric Acid Mycotoxin in Pathogenesis Process of Tomato Wilt Disease Caused by *Fusarium oxysporum*." *J. Bioprocess Biotech.* **5**: 255.

Sermiswan, R. W., P. Royros, N. Khakhum, S. Wongratanacheewin and A. Tuanyok (2015). "Direct detection of *Burkholderia pseudomallei* and biological factors in soil." *Trans R Soc Trop Med Hyg***109**(7): 462-468.

Shibata, T. F., T. Maeda, N. Nikoh, K. Yamaguchi, K. Oshima, M. Hattori, T. Nishiyama, M. Hasebe, T. Fukatsu, Y. Kikuchi and S. Shigenobu (2013). "Complete Genome Sequence of *Burkholderia* sp. Strain RPE64, Bacterial Symbiont of the Bean Bug *Riptortus pedestris*." *Genome Announc***1**(4).

Silvestro, L. B., S. A. Stenglein, H. Forjan, M. I. Dinolfo, A. M. Arambarri, L. Manso and M. V. Moreno (2013). "Occurrence and distribution of soil *Fusarium* species under wheat crop in zero tillage " *J. Agric***11**: 72-79.

Simonetti, E., N. M. Montecchia, N. P. Viso, C. Zilli and K. Balestrasse (2013). "Isolation and characterization of bacterial strains from soybean rhizosphere as biopesticides." 32 nd New Phytologist Smposium.

Smith, T. (1992). "Recent advances in the understanding of *Fusarium* trichothecene mycotoxicoses." *J. Anim. Sci.***70**: 3989-3993.

Speert, D. P. (2001). "Understanding *Burkholderia cepacia*: epidemiology, genomovars, and virulence." *Infect. Med.***18**: 49-56.

Stenglein, S. (2009). "*Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention." *Journal of Plant Pathology***91**(1): 25-36.

Stopnisek, N., N. Bodenhausen, B. Frey, N. Fierer, L. Eberl and L. Weisskopf (2014). "Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations." *Environ Microbiol***16**(6): 1503-1512.

Stopnisek, N., D. Zühlke, A. Carlier, A. Barberán, N. Fierer, D. Becher, K. Riedel, L. Eberl and L. Weisskopf (2016). "Molecular mechanisms underlying the close association between soil *Burkholderia* and fungi." *ISME J.***10**: 253 - 264.

Suarez-Moreno, Z. R., J. Caballero-Mellado, B. G. Coutinho, L. Mendonca-Previato, E. K. James and V. Venturi (2012). "Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*." *Microb Ecol***63**(2): 249-266.

- Tago, K., H. Itoh, Y. Kikuchi, T. Hori, Y. Sato, A. Nagayama, T. Okubo, R. Navarro, T. Aoyagi, K. Hayashi and M. Hayatsu (2014). "A fine-scale phylogenetic analysis of free-living Burkholderia species in sugarcane field soil." *Microbes Environ***29**(4): 434-437.
- Tawfik, K. A., P. Jeffs, B. Bray, G. Dubay, J. O. Falkinham, M. Mesbah, D. Youssef, S. Khalifa and E. W. Schmidt (2010). "Burkholdines 1097 and 1229, potent antifungal peptides from Burkholderia ambifaria 2.2N." *Org Lett***12**(4): 664-666.
- Textor, S., V. F. Wendisch, A. A. De Graaf, U. Muller, M. I. Linder, D. Linder and W. Buckel (1997). "Propionate oxidation in Escherichia coli: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria." *Arch Microbiol***168**(5): 428-436.
- Toyoda, H., K. Katsuragi, T. Tamai and S. Ouchi (1991). "DNA sequence of genes for detoxification of fusaric acid, a wilt-inducing agent produced by Fusarium species." *J Phytopathology***133**: 265-277.
- Tran, V., O. Berge, S. Ngo Ke, J. Balandreau and T. Heulin (2000). "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." *Plant Soil***218**: 273-284.
- Trân Van, V., O. Berge, S. Ngô Kê, J. Balandreau and T. Heulin (2000). "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." *Plant Soil***218**: 273-284.
- Turner, L. R., J. C. Lara, D. N. Nunn and S. Lory (1993). "Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in Pseudomonas aeruginosa." *J Bacteriol***175**(16): 4962-4969.
- Upton, A. M. and J. D. McKinney (2007). "Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in Mycobacterium smegmatis." *Microbiology***153**(Pt 12): 3973-3982.
- Urakami, T., C. Itoyoshida, H. Araki, T. Kijima, K. I. Suzuki and K. Komagata (1994). "Transfer of Pseudomonas plantarii and Pseudomonas glumae to Burkholderia as Burkholderia spp. and description of Burkholderia vandii sp.nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.***44**: 235-245.
- Utsumi, R., T. Yagi, S. Katayama, K. Katsuragi, K. Tachibana, H. Toyoda, S. Ouchi, K. Obata, Y. Shibano and M. Noda (1991). "Molecular cloning and characterization of the fusaric acid-resistance gene from Pseudomonas cepacia." *Agric Biol Chem***55**(7): 1913-1918.
- van Rij, E. T., G. Girard, B. J. Lugtenberg and G. V. Bloemberg (2005). "Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of Pseudomonas chlororaphis strain PCL1391." *Microbiology***151**(Pt 8): 2805-2814.
- van Rij, E. T., M. Wesselink, A. W. T. F. Chin, G. V. Bloemberg and B. J. Lugtenberg (2004). "Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by Pseudomonas chlororaphis PCL1391." *Mol Plant Microbe Interact***17**(5): 557-566.

Vandamme, P., K. Opelt, N. Knochel, C. Berg, S. Schonmann, E. De Brandt, L. Eberl, E. Falsen and G. Berg (2007). "Burkholderia bryophila sp. nov. and Burkholderia megapolitana sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties." *Int J Syst Evol Microbiol***57**(Pt 10): 2228-2235.

Vermis, K., M. Brachkova, P. Vandamme and H. Nelis (2003). "Isolation of Burkholderia cepacia complex genomovars from waters." *Syst Appl Microbiol***26**(4): 595-600.

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science***294**(5545): 1299-1304.

Vial, L., M. C. Groleau, V. Dekimpe and E. Deziel (2007). "Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products." *J Microbiol Biotechnol***17**(9): 1407-1429.

Walsh, A. P., M. R. Tock, M. H. Mallen, V. R. Kaberdin, A. von Gabain and K. J. McDowall (2001). "Cleavage of poly(A) tails on the 3'-end of RNA by ribonuclease E of Escherichia coli." *Nucleic Acids Res***29**(9): 1864-1871.

Wang, H. and T. B. Ng (1999). "Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylpicolinic acid)." *Life Sci***65**(9): 849-856.

Weisskopf, L., S. Heller and L. Eberl (2011). "Burkholderia species are major inhabitants of white lupin cluster roots." *Appl Environ Microbiol***77**(21): 7715-7720.

Whitlock, G. C., D. M. Estes and A. G. Torres (2007). "Glanders: off to the races with Burkholderia mallei." *FEMS Microbiol Lett***277**(2): 115-122.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakawa (1992). "Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov." *Microbiol Immunol***36**(12): 1251-1275.

Yim, L., I. Moukadiri, G. R. Bjork and M. E. Armengod (2006). "Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of Escherichia coli." *Nucleic Acids Res***34**(20): 5892-5905.