

SECUENCIA Y ANÁLISIS DEL PLÁSMIDO pLG42 DE *Lactococcus garvieae* IPLA 31405

Baltasar Mayo, Lucía Guadamuro, Susana Delgado, Ana Belén Flórez



Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias
baltasar.mayo@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN

La presencia de plásmidos en cepas de la especie *Lactococcus garvieae* es mucho más infrecuente que en las de la especie próxima *Lactococcus lactis*. Solo de forma reciente se ha caracterizado un plásmido conjugativo, pKL0018, relacionado con resistencia múltiple a antibióticos (Maki et al., 2009; Appl. Environ. Microbiol. 75:3370-3372). Más recientemente aún, se han caracterizado, tras su secuenciación genómica, los cinco plásmidos (pGL1 a pGL5) que contiene una cepa de *L. garvieae* de origen clínico (Aguado-Urda et al., 2012; PLoS One 7:e40119); en varios de ellos, se han identificado genes que codifican factores de patogenicidad y virulencia. El análisis de los plásmidos que presentan las cepas de *L. garvieae* puede ayudar a comprender la importancia de estos elementos en la adaptación de la especie a distintos nichos ecológicos y posibilitará su utilización como herramientas biotecnológicas.

Nuestro grupo ha caracterizado cepas de *L. garvieae* procedentes de quesos tradicionales elaborados con leche cruda y sin la adición de fermentos. Una de estas cepas, *L. garvieae* IPLA 31405, se ha visto que contiene una única molécula plasmídica. En este trabajo se da cuenta de la secuencia, organización genética y análisis de dicho plásmido, denominado pGL42.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa *L. garvieae* IPLA 31405 se sometió a secuenciación genómica completa (Flórez et al., 2012; J. Bacteriol. 194:5118-5119). El posterior análisis detectó diversos "contigs" que codificaban posibles secuencias plasmídicas. Estas secuencias se han completado y ordenado mediante reacciones de PCR, secuenciación de amplicones, análisis de las secuencias y corte con endonucleasas de restricción.

RESULTADOS

El plásmido pGL42 es una molécula circular de 42.459 pb con un contenido medio G+C del 36,04%, y un porcentaje de ADN codificante del 65,2%. Se han encontrado 32 pautas abiertas de lectura (ORFs) completas y nueve incompletas (Δ ORFs) con capacidad para codificar péptidos mayores de 99 aminoácidos, incluyendo genes relacionados con la replicación de pGL42 (*repB*, *orfX*) y un operón relacionado con la utilización de lactosa (*lacXGEFDCBA*) por medio de un sistema fosfotransferasa (PTS) y una beta-fosfogalactosidasa (*lacG*). El segmento de ADN que codifica los genes involucrados en la utilización de lactosa es 99% idéntico a nivel nucleotídico al del plásmido pVF50 de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* DPC3901.

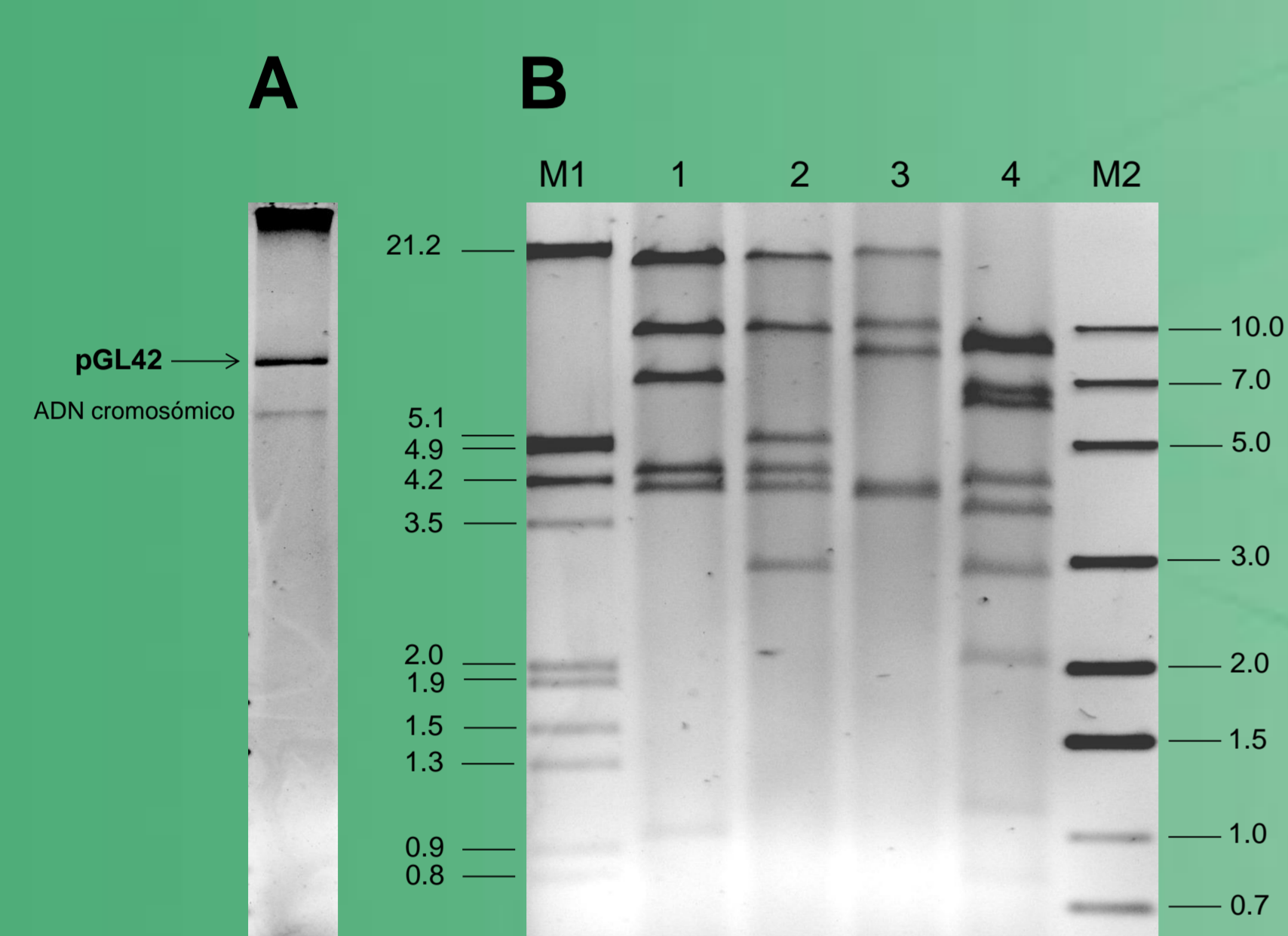


Figura 1.- Análisis plasmídico de la cepa *L. garvieae* IPLA 31405 (Panel A) y digestión de pGL42 con la combinación de enzimas de restricción XhoI/BamHI (1), XhoI/StuI (2), XhoI/NheI (3) y XhoI/PstI (4) (Panel B). Tamaño de los marcadores en kb.

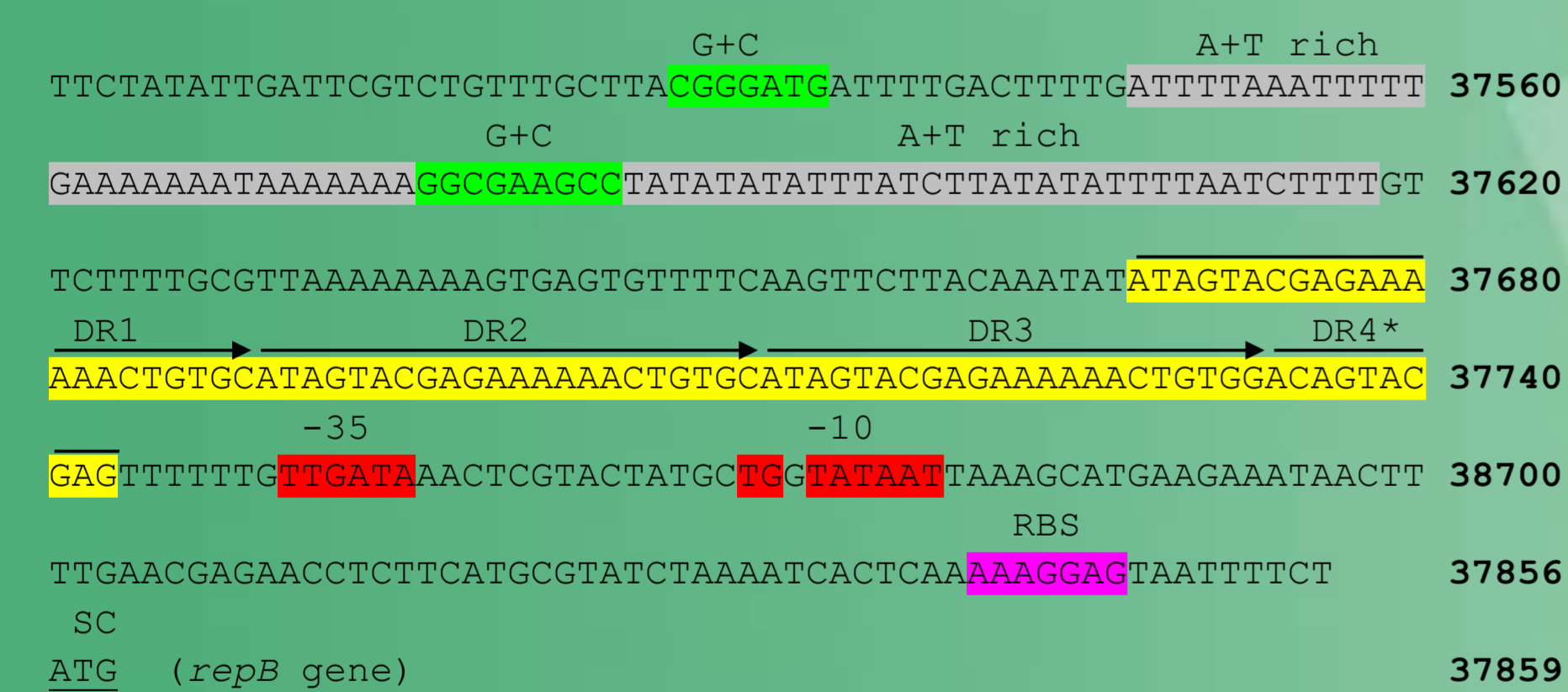


Figura 3.- Secuencia nucleotídica delante del gen que codifica la proteína de replicación (ORF30) con la organización típica de un origen de replicación (sitio *ori*).

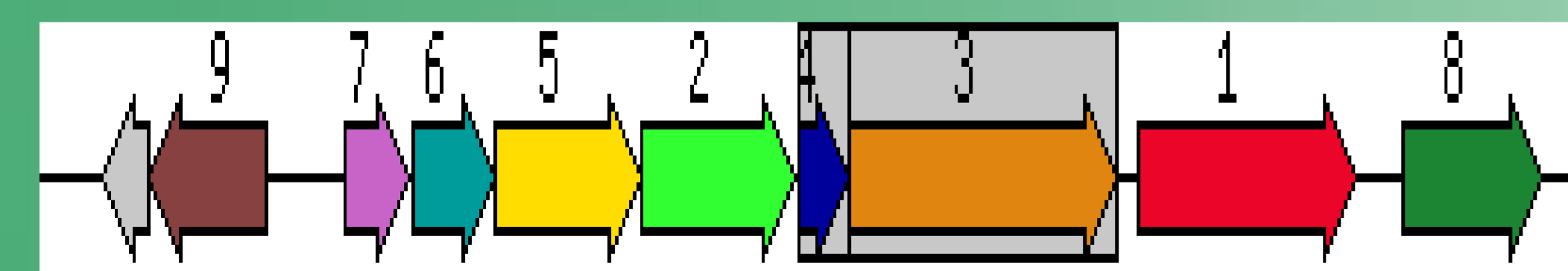


Figura 4.- Esquema detallado de la organización genética del operón de la lactosa en pLG42 (ORFs 13 al 20) y el represor transcrito en sentido inverso (ORF21). Orden genético: 1, β -fosfo-galactosidasa (*lacG*); 2, tagatosa-1,6-difosfato aldolasa (*lacD*); 3, componente PTS específico para lactosa (*lacE*); 4, componente IIA del sistema PTS de la lactosa (*lacF*); 5, tagatosa-6-fosfato quinasa (*lacC*); 6, galactosa-6-fosfato isomerasa (*lacB*); 7, galactosa-6-fosfato isomerasa (*lacA*); 8, *lacX*; 9, represor del operón de la lactosa (*lacR*). Como en pVF50 el operón está flanqueado en ambos extremos por secuencias de inserción.

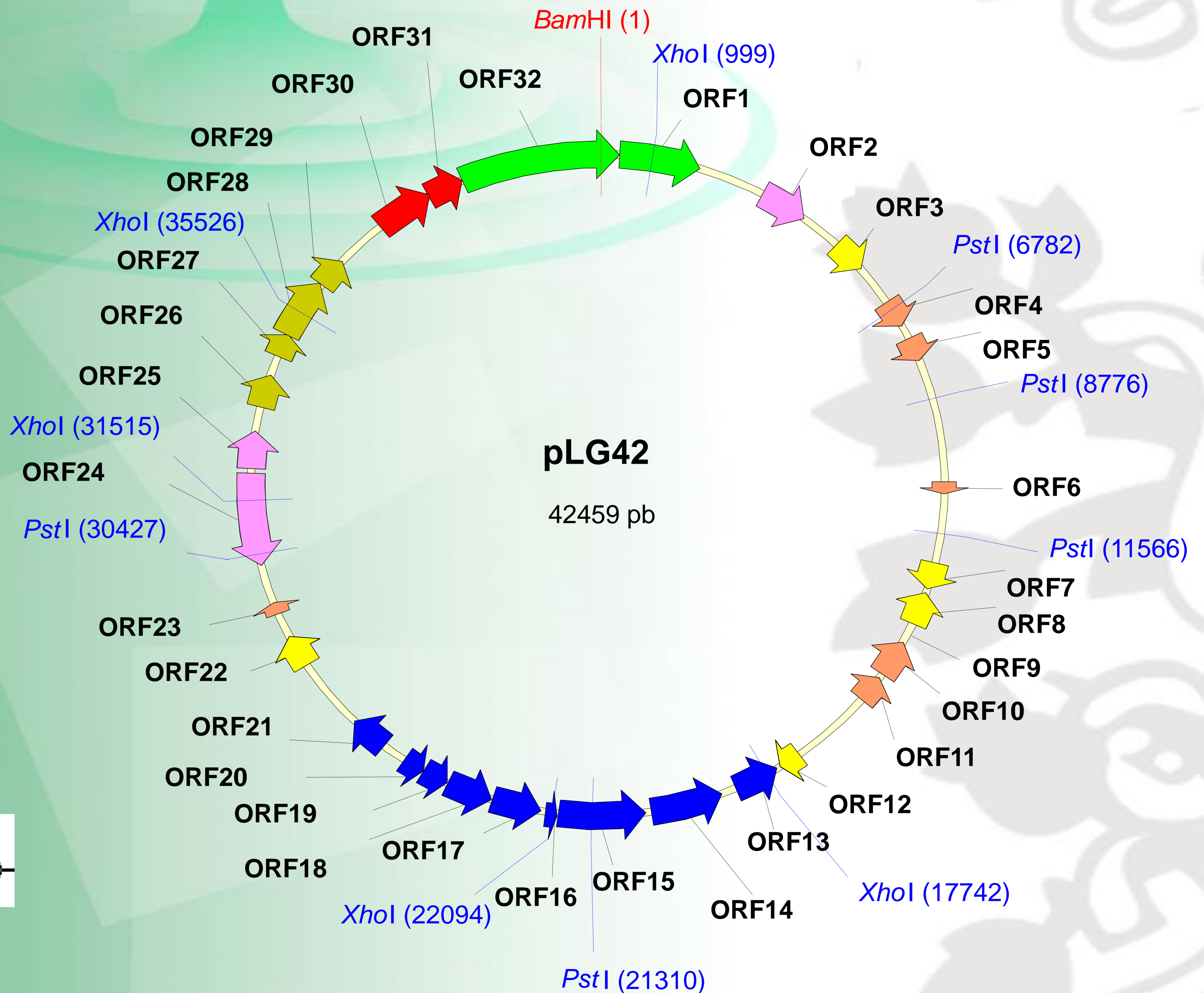


Figura 2.- Organización genética de pLG42, incluyendo la posición de enzimas de restricción relevantes. En rojo, genes involucrados en la replicación: *repB* (ORF30) y *repX-like* (ORF32). En amarillo, ORFs pertenecientes a distintas secuencias de inserción. En verde, genes componentes de un sistema de restricción modificación de tipo I. En morado, genes involucrados en el transporte de metales pesados (Cd, Hg, Pb). En marrón, ORFs de un sistema de movilización plasmídica. En azul (ORF13-ORF20) operón de la lactosa y represor del sistema (ORF21), incluyendo un gen que codifica la beta-fosfogalactosidasa (ORF14). En color teja, ORFs de otros genes.

CONCLUSIONES

- pLG42 muestra una estructura modular como otros muchos plásmidos de bacterias lácticas, con los módulos separados por secuencias de inserción.
- El módulo de replicación es similar al de diversos plásmidos de *L. lactis*.
- El equipamiento enzimático del operón de la lactosa es elemento adaptativo principal de pGL42 para el desarrollo de *L. garvieae* en leche y productos lácteos.