

Proc. 9. 14/89

T
14
93

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de algunas características de los plásmidos no simbióticos de *Rhizobium meliloti* GR4. Análisis genético-molecular de la producción de melanina, ligada al pRmeGR4b, y de la estabilidad y replicación del pRmeGR4a

Jesús Mercado Blanco

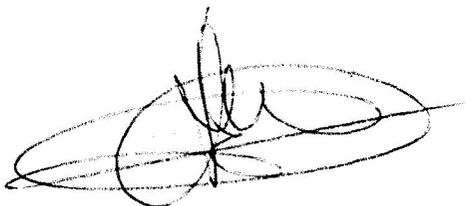
TESIS DOCTORAL

1993

| | |
|---------------------------------|-----------|
| BIBLIOTECA UNIVERSITARIA | |
| GRANADA | |
| Nº Documental | 619620588 |
| Nº Copia | 1218900 |

Estudio de algunas características de los plásmidos no simbióticos de *Rhizobium meliloti* GR4. Análisis genético-molecular de la producción de melanina, ligada al pRmeGR4b, y de la estabilidad y replicación del pRmeGR4a

Memoria que presenta el licenciado en Ciencias Biológicas
D. Jesús Mercado Blanco,
para aspirar al grado de Doctor.

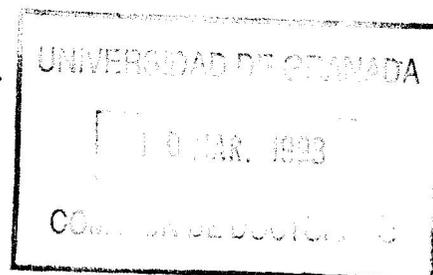


Fdo.: Jesús Mercado Blanco

Vº Bº
El director



Fdo.: José Olivares Pascual
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.



Esta tesis doctoral ha sido realizada en
la U.E.I. de Microbiología de la
Estación Experimental del Zaidín
(C.S.I.C.) de Granada.

Indice

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 4 |
| 1. Introduccion | 5 |
| 2. Plásmidos | 7 |
| 2.1. Sistemas de replicación y mantenimiento de plásmidos | 8 |
| 2.1.1. Sistemas de replicación | 8 |
| 2.1.1.1. Plásmidos del grupo de incompatibilidad P | 9 |
| 2.1.1.2. Plásmidos del grupo de incompatibilidad Q | 12 |
| 2.1.1.3. Plásmidos del grupo de incompatibilidad W | 14 |
| 2.1.1.4. Plásmidos del tipo ColE1 | 16 |
| 2.1.1.5. Plásmidos del grupo de incompatibilidad FII | 16 |
| 2.1.2. Sistemas de estabilidad | 20 |
| 2.1.2.1. Mecanismos estabilizadores | 20 |
| 2.2. Plásmidos en <i>Rhizobium</i> | 25 |
| 2.2.1. Plásmidos simbióticos | 27 |
| 2.2.1. Plásmidos no simbióticos | 30 |
| 2.2.3. Replicación y estabilidad de plásmidos en Rhizobiaceae | 34 |
| 3. Sistemas de transferencia de información génica usadas en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa | 36 |
| 3.1. Vectores de uso no específico derivados de plásmidos de amplio rango de hospedador | 36 |
| 3.1.1. Vectores derivados del grupo IncP | 37 |
| 3.1.2. Vectores derivados del grupo IncQ | 38 |
| 3.1.3. Vectores derivados del grupo IncW | 39 |
| 3.2. Vectores de clonaje de uso específico | 39 |
| 3.3. Problemas en el uso de vectores | 41 |
| 3.4. Utilización de vectores derivados de replicones de Rhizobiaceae | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.5. Sistemas alternativos de transferencia génica | 42 |
| OBJETO DEL TRABAJO | 43 |
| MATERIAL Y METODOS | 47 |
| 1. Razas bacterianas y plásmidos | 48 |
| 2. Medios de cultivo y conservación | 48 |
| 2.1. Medios para Rhizobiaceae | 48 |
| 2.2. Medios para <i>E. coli</i> | 51 |
| 2.3. Medios de conservación | 52 |
| 3. Antibióticos | 52 |
| 4. Selección de mutantes resistentes a antibióticos | 53 |
| 5. Ensayos en planta | 53 |
| 5.1. Planta | 53 |
| 5.2. Solución nutritiva | 53 |
| 5.3. Esterilización y germinación de semillas de alfalfa | 54 |
| 5.4. Cultivo axénico de plantas de alfalfa | 54 |
| 5.5. Ensayos de nodulación y fijación | 54 |
| 6. Métodos de conjugación | 55 |
| 6.1. Cruces simples | 55 |
| 6.2. Cruces triparentales | 55 |
| 7. Electroforesis de ADN | 56 |
| 7.1. Separación e identificación de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa | 56 |
| 7.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa | 56 |
| 7.3. Revelado de geles y fotografía | 56 |
| 7.4. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa | 57 |
| 7.5. Purificación de fragmentos de restricción por transferencia desde geles de agarosa a membranas de DEAE-celulosa | 57 |
| 8. Manipulación enzimática de ADN | 58 |
| 8.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción | 58 |
| 8.2. Relleno de extremos 3' de fragmentos de restricción | 58 |
| 8.3. Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción | 59 |

| | |
|--|----|
| 8.4. Ligación de fragmentos de ligación | 59 |
| 8.5. Creación de mutación por cambio de fase de lectura | 59 |
| 9. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> | 60 |
| 10. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico | 60 |
| 10.1. Aislamiento de plásmidos de peso molecular alto | 60 |
| 10.2. Aislamiento a gran escala de plásmidos de peso molecular bajo | 61 |
| 10.3. Purificación de ADN plasmídico en gradiente de CsCl | 62 |
| 10.4. Minipreparación de plásmidos | 62 |
| 11. Aislamiento de ADN total | 63 |
| 12. Determinación de la concentración de ADN | 64 |
| 13. Experimentos de hibridación de ADN-ADN | 64 |
| 13.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon | 64 |
| 13.2. Marcaje de sondas de ADN para hibridación | 65 |
| 13.3. Hibridación ADN-ADN | 65 |
| 13.4. Detección no radiactiva de bandas de hibridación | 66 |
| 14. Secuenciación de ADN de cadena doble | 66 |
| 14.1. Obtención de los plásmidos de secuenciación. Estrategia | 66 |
| 14.2. Selección y purificación de clones de secuenciación | 68 |
| 14.3. Secuenciación | 70 |
| 14.3.1. Preparación y marcaje del ADN | 70 |
| 14.3.2. Secuenciación de zonas no solapadas y resolución de compresiones | 72 |
| 14.4. Tratamiento del gel y exposición | 73 |
| 15. Producción <i>in vitro</i> y detección de proteínas | 73 |
| 15.1. Sistema de producción <i>in vitro</i> de proteínas | 73 |
| 15.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes | 74 |
| 15.3. Tratamiento de geles y exposición | 75 |
| 16. Obtención de cepas curadas derivadas de GR4 | 75 |
| 17. Medida de estabilidad de plásmidos | 76 |
| 17.1. Medida de la estabilidad en vida libre | 76 |
| 17.2. Medida de la estabilidad en simbiosis | 77 |

| | |
|--|-----|
| 18. Determinación del número de copias de plásmidos | 77 |
| 19. Determinación de la producción de melanina | 78 |
| 20. Detección de actividad tirosinasa en geles | 79 |
| 20.1. Tinción con nitrato de plata de geles nativos | 80 |
| 21. Ensayo de persistencia en suelo | 81 |
| 22. Ensayo de resistencia a metales pesados y a salinidad | 81 |
| 23. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas | 82 |
| 24. Números de acceso al banco de datos | 82 |
| RESULTADOS | 83 |
| 1. Estabilidad y transmisibilidad de los plásmidos no simbióticos de la cepa GR4 de <i>R. meliloti</i> | 84 |
| 1.1. Medida de la estabilidad de los pRmes de GR4 y obtención de cepas derivadas curadas | 84 |
| 1.2. Análisis de los pRmes presentes en GR4 | 85 |
| 1.3. Propiedades conjugativas de los pRmes de GR4 | 88 |
| 2. Localización de regiones implicadas en la replicación y estabilidad de pRmes de GR4 | 92 |
| 2.1. Identificación del fragmento mínimo responsable de la estabilidad de pRmeGR4a | 92 |
| 2.2. Caracterización del plásmido pJM100 | 94 |
| 3. Construcción de plásmidos derivados de pJM100 | 96 |
| 3.1. Construcción del plásmido pJM401 | 96 |
| 3.2. Construcción de los plásmidos pJMB40 y pJMB45 | 97 |
| 4. Estabilidad de los plásmidos derivados de pJM100 | 100 |
| 4.1. Construcción del plásmido pJM4011 y medida de su estabilidad | 105 |
| 5. Estudio de la región implicada en la replicación y estabilización del plásmido pRmeGR4a | 108 |
| 5.1. Secuencia del fragmento <i>Pst</i> I | 108 |
| 5.2. Caracterización del ORF3 | 115 |
| 5.3. Estudio de los restantes ORFs presentes en la región | 120 |
| 5.4. Análisis de los productos de la región <i>ori</i> | 124 |
| 6. Estudio de posibles características asociadas a los plásmidos | |

| | |
|---|-----|
| no simbióticos de la cepa GR4 | 126 |
| 6.1. Ensayos de resistencia metales pesados | 126 |
| 6.2. Ensayo de resistencia a altas concentraciones salinas | 126 |
| 6.3. Ensayo de persistencia en suelo | 127 |
| 6.4. Ensayo de producción de melanina | 129 |
| 6.4.1. Ensayo de expresión de la producción de melanina y comparación con el sistema de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | 131 |
| 6.4.2. Localización del m,ínimo fragmento responsable de la producción de melanina | 133 |
| 6.4.3. Secuenciación del locus <i>mel</i> | 133 |
| 6.4.4. Análisis de los productos del locus <i>mel</i> | 143 |
| 6.4.5. Detección de la actividad tirosinasa | 145 |
| 6.4.6. Homología de <i>mela</i> de GR4 en Rhizobiaceae | 146 |
| DISCUSION | 148 |
| Características asociadas a los pRmes de la cepa GR4 | 149 |
| Características asociadas al plásmido pRmeGR4a | 149 |
| Características asociadas al plásmido pRmeGR4b | 152 |
| Estudio del origen de replicación y regiones adyacentes del plásmido pRmeGR4a | 157 |
| Construcción de vectores que contienen el origen de replicación de pRmeGR4a | 161 |
| Perspectivas futuras | 164 |
| CONCLUSIONES | 165 |
| BIBLIOGRAFIA | 168 |

RESUMEN

La cepa GR4 de *Rhizobium meliloti* es objeto de estudio en el Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín desde hace varios años. Como característica común al resto de cepas de esta especie, tiene dos plásmidos de alto peso molecular donde se localizann los genes esenciales para el establecimiento de la simbiosis con alfalfa, denominados pSyms. GR4 es portadora, además, de otros dos grandes plásmidos, de menor peso molecular, pRmeGR4a (115 Mda) y pRmeGR4b (140 Mda), que son perfectamente prescindibles. Las características que se han asociado hasta ahora a la presencia de estos dos plásmidos, llamados crípticos, son pocas. Sin embargo, el plásmido pRmeGR4b es responsable de la mayor eficiencia de nodulación que presenta la cepa GR4. De este fenotipo son responsables los genes *nfe* que son objeto de estudio intenso en este laboratorio. Hasta el presente trabajo nada más se conocía acerca de las propiedades de estos dos plásmidos, aunque como hecho significativo hay que señalar que poseen unas tasas de estabilidad tan altas, que su pérdida es prácticamente indetectable en condiciones normales por lo que deben poseer unos mecanismos estrictos que aseguren su herencia a las células hijas. Esta alta estabilidad hace pensar que puedan existir características ligadas a su presencia de importancia para la supervivencia del hospedador en determinadas circunstancias.

En este trabajo ha sido posible constatar, por un lado, que la producción de melanina está ligada a la presencia del plásmido pRmeGR4b y, por otro, que existen en estos plásmidos, al menos en el pRmeGR4a, unos mecanismos de replicación y estabilidad que, aunque podrían estar emparentados con los del plásmido Ti de *Agrobacterium*, parecen propios e incluso poco relacionados con los correspondientes a los plásmidos típicos de los grupos de incompatibilidad conocidos.

Se ha localizado en el plásmido pRmeGR4b el *locus* responsable de la producción de melanina en un fragmento *Pst*I de 3,5 kb, y se ha determinado la existencia del gen estructural para la enzima tirosinasa, responsable de la producción de pigmentos melánicos. Esta enzima es portadora de dominios muy bien conservados en otras tirosinasas y proteínas afines, así como hemocianinas, que son responsables de la unión de cobre. Asimismo se ha conseguido la expresión del gen de la tirosinasa de GR4 en células de *Escherichia coli*, independientemente del sistema regulador de NifA/RpoN. Los diversos

resultados obtenidos indican que el sistema presente en GR4 es diferente al existente en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

En relación con el estudio sobre la alta estabilidad de los dos plásmidos no simbióticos de esta cepa, ha sido posible localizar e identificar el mínimo fragmento de ADN responsable de la replicación y mantenimiento estable del plásmido pRmeGR4a. Estas funciones se encuentran en un fragmento de 4,8 kb, en donde se ha podido encontrar un gen, cuyo producto parece imprescindible para la replicación del plásmido. Este gen, *repC*, muestra homologías con otros genes *repC* presentes en plásmidos de *Agrobacterium*. El análisis de esta región también ha permitido localizar otros posibles genes implicados en la estabilización del plásmido, lo que supone, por primera vez, el estudio de una región implicada en replicación/estabilización dentro del género *Rhizobium*.

Desde un punto de vista práctico, se han construido una serie de plásmidos recombinantes con un doble origen de replicación, que permiten asentar la base para la mejora de futuros vectores para Rhizobiaceae. Los estudios sobre transferencia y estabilización del plásmido pRmeGR4a y sus plásmidos derivados han permitido establecer un rango de hospedador relativamente amplio dentro de esta familia. pRmeGR4a presenta la característica de ser autotransmisible y la capacidad de movilizar a su compañero, pRmeGR4b. Estas propiedades le conceden un gran interés desde el punto de vista evolutivo y de la transferencia intra e interespecífica de material genético.

INTRODUCCION

1.-Introducción.

El nitrógeno constituye el 80% del contenido total de la atmósfera terrestre pero a la vez es uno de los principales factores limitantes de la productividad vegetal. La causa directa de este contrasentido es la incapacidad de los organismos eucarióticos de utilizar directamente el nitrógeno molecular o dinitrógeno (N_2) a pesar de su abundancia. Las plantas sólo pueden usar formas de nitrógeno combinado (principalmente amonio o nitrato), derivados en parte, de la fijación de nitrógeno abiótica o biológica. Los óxidos de nitrógeno se producen por procesos físico-químicos naturales o inducidos por el hombre, mientras que la formación de amonio es consecuencia, mayoritariamente, de la actuación de procesos biológicos. La fijación biológica de nitrógeno es el proceso cuantitativamente más importante de todos ellos, responsable de las 2/3 partes del nitrógeno fijado en la biosfera, y llevado a cabo por ciertos organismos procarióticos.

La capacidad para fijar nitrógeno se debe a la actividad de un complejo enzimático llamado dinitrogenasa, de estructura y propiedades muy similares en todas las especies en las que se ha estudiado y sensible al oxígeno, por lo que los distintos fijadores han debido desarrollar diferentes estrategias para la protección de la enzima en condiciones aerobias (Gallon, 1981). La reducción biológica de nitrógeno es, por otra parte, un proceso muy exigente en energía y poder reductor, sometido, por tanto, a una estricta regulación cuando no se dan las condiciones ambientales adecuadas para el mejor aprovechamiento de la energía disponible (Sanjuán y Olivares, 1991b).

Son bastantes los organismos, pertenecientes a muy diferentes grupos microbianos, en los que se ha podido detectar el carácter fijador (Young, 1992), en vida libre, o en íntima asociación con plantas. Entre estos últimos son de destacar las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae que se establecen en simbiosis mutualista con plantas leguminosas. La importancia de esta asociación estriba en los altos niveles de nitrógeno fijado, la eficiencia del proceso y en el interés de las plantas implicadas, de gran significación económica, social y ecológica.

El proceso de fijación llevado a cabo por esta simbiosis tiene lugar en unas estructuras especializadas denominadas nódulos originadas, generalmente, en las raíces de las leguminosas como consecuencia de la infección por parte del microsimbionte. En tales

nódulos se produce la transformación de las bacterias en unas formas especializadas, los bacteroides, que utilizan los compuestos fotosintetizados por la planta como fuente de energía, electrones y esqueleto carbonado, para llevar a cabo la reducción del N_2 a amonio y su incorporación al metabolismo de la planta.

Todo el proceso simbiótico requiere unos complejos mecanismos de interacción entre los dos participantes de la simbiosis, y aunque el conocimiento a nivel molecular de los genes bacterianos responsables de cada una de las etapas simbióticas (resumidas en las tres características simbióticas: especificidad, infectividad y efectividad), está bastante avanzado, todavía existen algunas lagunas en lo referente a cómo se lleva a cabo la comunicación de la bacteria con la planta para que tenga lugar la infección y la formación del nódulo fijador efectivo. Sin embargo, a pesar de la identificación de bastantes nodulinas (proteínas propias del nódulo o relacionadas con la infección (ver Fraussen *et al.*, 1992)), son prácticamente desconocidos los genes de la planta que intervienen en el establecimiento de la simbiosis.

Un hecho característico de las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* es la presencia de plásmidos de elevado peso molecular. En ellos se localizan la mayor parte de los genes implicados en el desarrollo del proceso simbiótico, aunque por otra parte son perfectamente prescindibles para la supervivencia de la célula. No obstante, constituyen un elevado porcentaje de su material genético, según Kündig *et al.*, (1993) de aproximadamente 8.700 kb para *Bradyrhizobium japonicum*, que, en algunos casos puede suponer más de la tercera parte del mismo. A pesar de la enorme cantidad de información, en su mayor parte desconocida, aportada por estos elementos genéticos, los plásmidos en Rhizobiaceae son mantenidos de una forma prácticamente estable a través de las sucesivas generaciones, lo que pone de manifiesto la presencia de unos adecuados mecanismos que aseguren el reparto a las células hijas, y una serie de ventajas a sus hospedadores que los hacen mantenerse en la población a pesar del enorme gasto metabólico que conlleva para la célula.

La presencia de la información necesaria para el establecimiento de la simbiosis y de otros fenotipos que día a día se van adjudicando a estos plásmidos es objeto de estudio de numerosos grupos de investigación, lo que ha permitido avanzar notablemente a lo largo

de la última década en los conocimientos sobre la implicación de los plásmidos tanto en los procesos simbióticos, como en los que puedan desarrollarse en la vida libre de estos microorganismos.

2.- Plásmidos.

Los plásmidos bacterianos son ADNs extracromosómicos capaces de replicarse autónomamente como un componente estable del genoma celular. Por definición no son esenciales para la supervivencia celular, excepto en ciertos ambientes especializados en donde los genes localizados en plásmidos confieren ventajas selectivas, tales como los de resistencia a antibióticos o los que forman parte de rutas metabólicas degradativas.

La presencia de plásmidos está bastante extendida entre los procariotas. Normalmente son circulares, aunque existen excepciones en forma lineal como ciertos plásmidos encontrados en *Streptomyces rochei* (Hirochika *et al.*, 1984), especies de *Borrelia* (Barbour y Garon, 1987), y *Thiobacillus versutus* (Włodarczyk y Nowicka, 1988). Varían en cuanto a su tamaño, desde unas pocas kilobases a varios cientos o incluso a más de mil, y también en cuanto el número de copias, de una a varios cientos por genoma. Esta característica es propia de cada plásmido bajo condiciones constantes y está controlada por un sistema codificado por el propio plásmido que determina el ritmo de iniciación de su replicación (Novick, 1987).

La mayoría de los plásmidos son crípticos por no determinar una función conocida, pero a menudo proporcionan al hospedador importantes características fenotípicas. Por ello representan un importante factor en la evolución bacteriana pues, además de ser transferidos intra o interespecíficamente, proporcionan a la bacteria una rápida adaptación a condiciones ambientales cambiantes y confieren amplificación génica (Kües y Stahl, 1989).

Una característica de cada plásmido es la capacidad de poder residir en la misma célula con otro diferente, es decir de ser compatibles. La incompatibilidad de plásmidos se define como la incapacidad de que dos plásmidos corresidentes puedan ser establemente heredados en ausencia de selección externa. Un grupo de incompatibilidad está compuesto

de plásmidos que son incapaces de persistir en la misma línea celular. Los plásmidos que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad suelen mostrar homologías de ADN (Datta, 1979).

Aunque los plásmidos no son normalmente esenciales para sus hospedadores, pueden ser establemente mantenidos en las poblaciones bacterianas, incluso bajo condiciones no selectivas (Nordström y Aagard-Hansen, 1984). Esto supone una carga energética que enlentece el crecimiento celular (Cheah *et al.*, 1987; Zünd y Lebek, 1980) y la existencia de determinados mecanismos que deben asegurar el mantenimiento estable de dichos plásmidos. Las estrategias empleadas son diversas y serán discutidas posteriormente con brevedad.

Los plásmidos pueden agruparse en dos categorías atendiendo a su número de copias. Los de alto número de copia (generalmente de pequeño tamaño) pueden ser heredados sobre la base exclusiva de una segregación al azar según la ecuación,

$$P_0 = 2^{1-n}$$

donde P_0 es la probabilidad de que aparezca una célula libre de plásmido por división y n es el número de copias del plásmido por célula (Willians y Thomas, 1992). Esto no es válido, sin embargo, para los plásmidos grandes de bajo número de copias, donde deben existir mecanismos que aseguren la herencia a células hijas, ya que la pérdida de estos plásmidos es prácticamente indetectable.

2.1.- Sistemas de replicación y mantenimiento de plásmidos.

2.1.1.- Sistemas de replicación.

Los mecanismos que poseen los diferentes plásmidos para la replicación y mantenimiento estable en diferentes hospedadores son diversos. Existen numerosas revisiones a este respecto (Scott, 1984; Kües y Stahl, 1989), y aquí solamente se va a hacer una breve presentación sobre los grupos plasmídicos más representativos, haciendo hincapié en los plásmidos de amplio rango de hospedador tanto replicativo como conjugativo, ya que de ellos se han derivado vectores que han sido ampliamente usados en *Rhizobium*.

Igualmente, y para cada caso, se hará una breve exposición de sus capacidades conjugativas, también explotadas en la tecnología de vectores.

2.1.1.1.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad P.

Este grupo constituye un conjunto extensamente estudiado de los que sus elementos más representativos son los plásmidos idénticos RP1 (Lowbury *et al.*, 1969), RP4 (Datta *et al.*, 1971), R68 (Stanisich y Holloway, 1971) y RK2 (Ingram *et al.*, 1973).

El plásmido mejor caracterizado y más representativo es RK2/RP4, cuyas regiones implicadas en la replicación y su regulación se representan en la Figura 1. Es un plásmido autotransmisible de 60 Kb que confiere resistencia a Ap, Km y Tc (Lanka *et al.*, 1983), con un número de copia estimado de 4 a 7 por cromosoma en *E. coli* (Figurski *et al.*, 1979). Para la replicación son necesarios dos *loci* plasmídicos: el origen de replicación en *cis* (*oriV*) y un sitio de actuación en *trans* constituido por los productos del gen *trfA* (Stalker *et al.*, 1981; Kornacki *et al.*, 1984). El *oriV* tiene como características más relevantes la presencia de 8 iterones de 17 pb en dos grupos de tres y cinco, un posible promotor rodeado de sitios de unión de DnaA y de un sitio de posible unión de IHF ("integration host factor"), una región de 49 pb rica en AT (74%) seguida de una caja DnaA, y otra de 67 pb rica en GC (79%). Por su parte el gen *trfA* codifica dos proteínas de 44 y 33 kDa (Trf-44 y Trf-33, respectivamente) como resultado de traducciones independientes a partir de dos codones de iniciación dentro de la misma fase de lectura (Kornacki *et al.*, 1984; Lin y Helinski, 1992). La proteína Trf-33 es suficiente para la replicación del plásmido en diversos hospedadores (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *R. meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Azotobacter vinelandii*), sin embargo, el papel de la proteína Trf-44 no está tan claro, aunque es crítico para la replicación o mantenimiento de RK2 en *P. aeruginosa* (Durland y Helinski, 1987). Por otra parte, la replicación en diferentes hospedadores puede verse afectada por alteraciones en los distintos componentes del *oriV*, como la ausencia o presencia de determinados iterones, de las cajas DnaA, etc.

La replicación de RK2 parece estar relacionada con los niveles intracelulares de las proteínas TrfA, además de la implicación de proteínas del hospedador, como la DnaA, DnaB, DnaG, girasa y ADN polimerasa III (Pinkney *et al.*, 1988). Aparentemente, la síntesis de TrfA está regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Así los

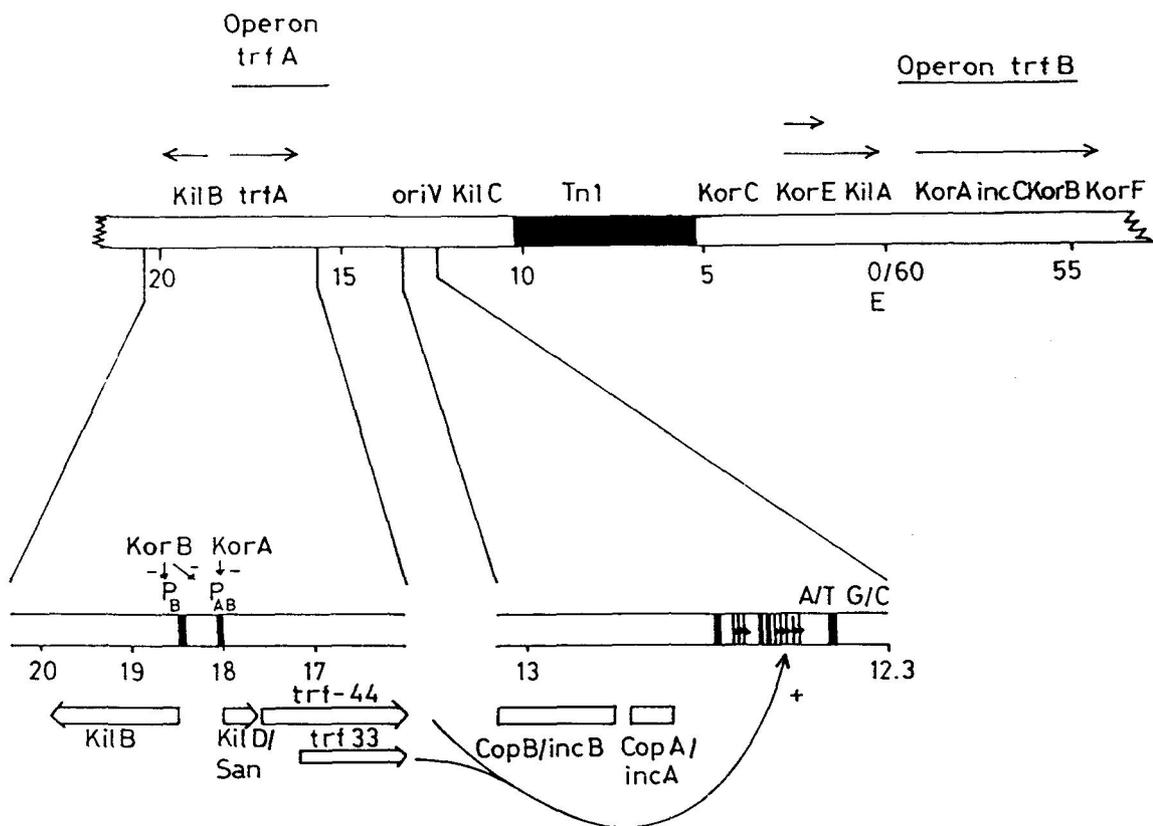


Figura 1.- Esquema de la región que contiene el origen de replicación y funciones relacionadas del plásmido RK2. *trf*, funciones de replicación que actúan en *trans. inc*, determinantes de incompatibilidad. *kil* y *kor*, forman parte de un complejo sistema de replicación, aunque no se descarten otras funciones. P_B , promotor con operador *KorB*. P_{AB} , promotor con operadores *KorA* y *KorB*. Las flechas horizontales indican dirección de transcripción de genes u operones. Los números representan coordenadas en kilobases. En la región que esquematiza al origen, se han intentado representar algunas de las estructuras significativas presentes: A/T G/C, zonas ricas en A+T y G+C; () cajas DnaA; () repeticiones directas; () posible sitio de unión de IHF. Signos + y - representan interacciones positivas o negativas. (Compilado de diversas fuentes).

productos de los genes *korA* y *korB* (que forman parte del operon *trfB* junto a *korF* e *incC*) (Thomas y Smith, 1986) reprimen la transcripción a partir del promotor del operon *trfA* (*ptrfA*) probablemente mediante la unión a dos repeticiones invertidas situadas en el promotor (Bechhofer *et al.*, 1986; Schereiner *et al.*, 1985; Shingler y Thomas, 1984; Young *et al.*, 1985). Por otro lado, el gen *kilD*, que es el primer gen del operon *trfA*, puede modular la actividad de *korA* y *korB* previniendo la sobrerrepresión de *ptrfA* (Schereiner *et al.*, 1985). Este gen parece codificar una proteína de 116 aminoácidos con homología a proteínas de unión a cadena sencilla de ADN de *E. coli* (Thomas y Sherlock, 1990; Jovanovic *et al.*, 1992). Los determinantes *kor* forman parte de una compleja red de regulación de la replicación de RK2 consistentes en determinantes *kil*, potencialmente letales para la célula, y determinantes *kor* ("kill override") que previenen la acción letal de los *kil* (Young *et al.*, 1983, 1987). No obstante, parece ser que los genes *kil* pueden estar implicados en una variedad de funciones plasmídicas (como *kilA* que forma parte de un operon que confiere resistencia a telurito (Walter *et al.*, 1991) o como el caso de *kilB*, que está implicado en la transferencia conjugativa entre cepas de *E. coli*), y que dichos genes no se ocupan específicamente de la herencia vertical del plásmido (Motallebi-Veshareh, *et al.*, 1992). En definitiva los estudios realizados llevan a pensar que la replicación de RK2 está primariamente controlada mediante el mantenimiento en cantidades limitadas de las proteínas TrfA. Esto se consigue en parte através de una represión transcripcional por *korA* y *korB*, aunque otros loci como *kilD*, *incC*, *korE* y *korF* también pueden estar implicados (Schereiner *et al.*, 1985; Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1984).

Por otra parte, es interesante hacer referencia al sistema de transferencia conjugativa que este grupo posee, que es incluso de mayor espectro de hospedador que su sistema de replicación. Aparte de autotransmisibles, los plásmidos del grupo de incompatibilidad P son capaces de movilizar a plásmidos no conjugativos como ColE1, pSC101 y RSF1010 (Simon y Prieffer, 1990). Las regiones implicadas en transferencia ocupan extensas zonas del plásmido. Los grupos de genes Tra1, Tra2 y Tra3 codifican regiones conjugativas transactivas, *oriT* es el origen de transferencia y *pri* codifica una primasa que está implicada en el cebado de la cadena sencilla de ADN transferida durante la conjugación.

2.1.1.2.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad Q.

Los más representativos de este grupo son los plásmidos casi idénticos RSF1010 (Guerry *et al.*, 1974), R300B (Barth y Grinter, 1974) y R1162 (Meyer *Et al.*, 1982; Bryan *et al.*, 1972). Son plásmidos pequeños de 8,7 kb con un número de copias que oscila entre 10-50 en *E. coli*, que codifican resistencias a Sm y Su (Barth y Grinter, 1974; Guerry *et al.*, 1974). No son autotransmisibles aunque sí pueden ser movilizados con eficiencia variable por plásmidos, por ejemplo del grupo de incompatibilidad I. La replicación de RSF1010 puede proceder de forma uni o bidireccional (De Graaff *et al.*, 1978), y unidas al *oriV* se encuentran determinantes de incompatibilidad y de control del número de copias (Meyer *et al.*, 1982). El replicón básico se compone de una región en *cis* y dos en *trans*, separadas por el *oriT* y genes movilizadores (Figura 2A). El origen contenido en la región *cis* se compone de dos segmentos, uno mayor, de 220 pb, regula la replicación y determina incompatibilidad (Meyer *et al.*, 1985; Persson y Nodström, 1986) y consta de tres repeticiones y media de 21 pb, una secuencia de 40 pb rica en AT (68%) y otra de 60 pb rica en GC (68%) (Lin y Meyer 1984, 1986). Esta estructura es similar a las regiones existentes en el grupo de incompatibilidad P y existen fuertes homologías en la secuencia de iterones entre ambos (Meyer *et al.*, 1985). Este hecho parece ser de poca importancia en lo que se refiere a la característica de amplio rango de hospedador, pues las similitudes encontradas en las repeticiones directas aparecen en plásmidos de *E. coli* de seis grupos de incompatibilidad diferentes (Smith y Thomas, 1985). El segundo fragmento, de 210 pb, contiene una extensa repetición invertida que puede dar lugar a una estructura cruciforme con un tallo de 40-60pb y un lazo de 37 pb (Lin *et al.*, 1987).

La iniciación de la replicación depende de las proteínas RepA, RepB y RepC, codificadas por las dos regiones en *trans* (Díaz y Staudenbauer, 1982; Scherzinger *et al.*, 1984). RepC reconoce el origen uniéndose a los iterones del fragmento de 220 pb (Haring *et al* 1985), RepA es una proteína con actividades ATPasa, de unión a ADN de cadena sencilla dependiente de ATP, y helicasa (Scholz *et al.*, 1989) y RepB tiene una actividad primasa específica de RSF1010 (Bagdasarian *et al.*, 1986).

En la Figura 2B se representa un posible esquema de iniciación de la replicación para este grupo. En él las proteínas Rep formarían un replisoma análogo al primosoma, que opera en el inicio de la replicación, sustituyendo a las proteínas del primosoma (DnaB,

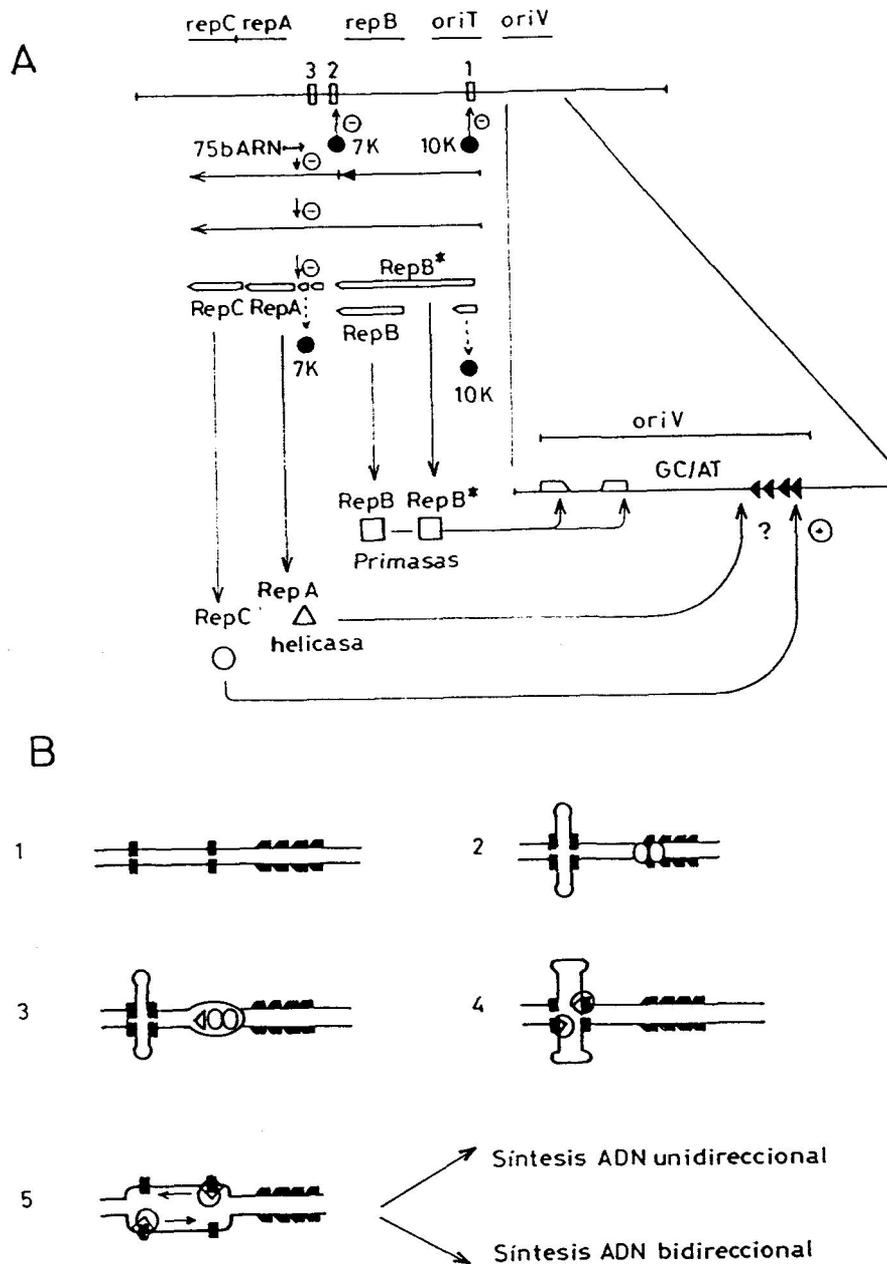


Figura 2.- (A) Esquema de las funciones requeridas en *cis* y en *trans* para la replicación del plásmido RSF1010. Las flechas horizontales indican transcritos y la dirección de los mismos. 1,2 y 3 definen promotores *rep*. Los rectángulos inferiores representan productos derivados de los genes *rep*. () repeticiones de 21 pb; () repeticiones invertidas; () productos 7K y 10k; () proteína RepA; () proteína RepB; () proteína RepC. El signo - representa interacción netgativa. (B) Modelo propuesto para la replicación de RSF1010. 1, origen de replicación; 2, formación de la estructura cruciforme y unión de RepC; 3, RepC migra hacia la estructura cruciforme quizás ayudado por RepA; 4, se une la primasa RepB e inicio de la replicación; 5, despliegue de la estructura cruciforme y migración del primosoma. (Modificado de Kües y Sthal, 1989)

DnaC, DnaG), pues se ha visto que su replicación es independiente de ellas, aunque no de la ADN pol III y la girasa (Díaz y Staudenbauer, 1982; Haring *et al.*, 1985; Bagdasarian *et al.*, 1986; Pinkney y Thomas, 1987).

Tanto las proteínas Rep, implicadas en la formación del cebador independiente de las enzimas del hospedador, como la regulación de la expresión de los genes *rep*, son responsables del amplio rango de hospedador que muestran los plásmidos del grupo IncQ (Bagdasarian, *et al.* 1986). Cada unidad transcripcional está autorregulada por pequeños productos génicos, 7k y 10k, localizados frente a las secuencias codificantes de los genes *rep*. Pero aparte existe un factor de regulación negativo a nivel traduccional, ejercido por un ARN antisentido de 75 bases que previene la síntesis de RepA, y probablemente RepC (Kim *et al.*, 1987) (Figura 2A).

2.1.1.3.- Plásmidos del grupo IncW.

Forman este grupo plásmidos conjugativos de amplio espectro de unos 30 a 35 kb cuyos representantes más estudiados son pSa (Watanabe *et al.*, 1968), R388 (Datta y Hedges, 1972) y R7K (Coetzee *et al.*, 1972). Se ha podido comprobar que poseen regiones homólogas de unas 20 Kb implicadas en funciones de replicación y transferencia (Gorai *et al.*, 1979). En la Figura 3 se representa el mapa físico-genético del plásmido pSa.

Los sistemas implicados en replicación no están tan estudiados como los de IncP e IncQ, y se refieren sobre todo a pSa. Este plásmido se encuentra en número de copias de 3 a 5 y confiere resistencia a Cm, Km, Gm, Tm, Sm, Sp y Su. El aislamiento del origen de replicación fue realizado por Tait *et al.*, (1982a), y son pocos los datos significativos de su mecanismo de replicación. El mínimo fragmento capaz de replicación autónoma en *E. coli* y otros hospedadores se haya localizado en un fragmento de 1,9 kb, que consta de un origen bidireccional de replicación incluido en un fragmento de 480 pb, y una proteína de replicación transactiva de unos 35 kDa denominada RepA.

En cuanto a las funciones de transferencia se encuentran separadas por el gen de resistencia a Cm, siendo su participación en procesos conjugativos cuantitativamente diferente, ya que la región TraI es indispensable para la transferencia, mientras que la delección de la Tra II sólo supone una pérdida de eficiencia del 40-60%. Como resultado destacable habría que citar el efecto supresor de la tumorigenicidad en cepas de

Introducción

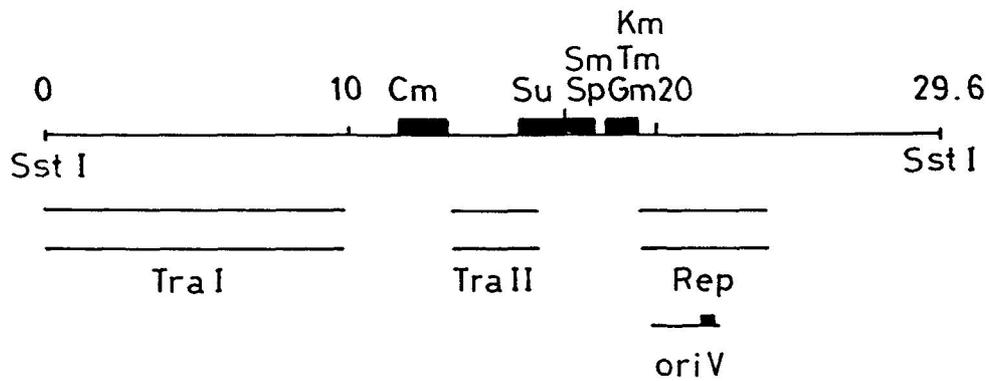


Figura 3.- Representación física del plásmido pSa definida por el fragmento *SstI* de 29,6 kb. TraI y TraII son regiones implicadas en la transferencia del plásmido. La línea más inferior representa el fragmento de 1,9 kb suficiente para la replicación autónoma. Asimismo se indican las regiones que codifican las resistencias a antibióticos. (Modificado de Simon y Priefer, 1990).

Agrobacterium tumefaciens cuando portan el plásmido pSa, que podría estar relacionado con la región Tra I (Farrand *et al.*, 1981; Tait *et al.*, 1982b).

2.1.1.4.- Plásmidos del tipo ColE1.

En este caso se trata de plásmidos de alto número de copia. ColE1 forma parte de un grupo de pequeños plásmidos que pueden replicarse en ausencia de síntesis *de novo* de proteínas (Veltkamp y Stuitje, 1981). ColE1 se replica *in vivo* e *in vitro* en ausencia de proteínas codificadas por el plásmido (Tomizawa *et al.*, 1974). Sin embargo los miembros de este grupo requieren enzimas codificadas por el hospedador, como la ADN polimerasa I, ARN polimerasa dependiente de ADN, ADN polimerasa III (*dnaE*), así como los productos de los genes *dnaB*, *dnaC*, *dnaG* y *dnaZ* (Scott, 1984). Plásmidos pertenecientes a este grupo son RSF1030, pMB1, CloDF13 (que codifica una cloacina) y el plásmido críptico p15A. Son portadores de un gen de colicina, otro de inmunidad y otro cuya expresión es necesaria para la liberación de la colicina (Luria y Suit, 1987).

La replicación comienza unidireccionalmente en el *oriV* (Figura 4) mediante la síntesis de un cebador de ARN de 555 nucleótidos (ARN II) a partir del cual se sintetizan las primeras 500 pb de ADN con el concurso de la ADN pol I. Existe un control negativo de la actuación de ARN II como cebador a partir de un ARN represor (ARN I) de 108 nucleótidos (Lacatena y Cesareni, 1981), codificado por la cadena complementaria a la que codifica el ARN II. El ARN I tiene como diana la porción 5' del ARNII y los complejos formados impiden el procesamiento necesario para producir el cebador activo, previniendo la formación del duplex ARN/ADN en el *oriV*. Adicionalmente la represión por ARN I se hace más efectiva con el concurso del gen *rom* ("repressor of modulator") que codifica una proteína de 63 aminoácidos, y que actúa aumentando catalíticamente la interacción inicial entre los ARN I y II, si bien la base molecular de esta interferencia no está tan clara (Twigg y Sherrat, 1980; Tomizawa y Som, 1984; Helmer-Citterich *et al.*, 1988).

2.1.1.5.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad FII.

El plásmido de bajo número de copias R1 es quizás el más representativo y mejor estudiado de este grupo al que también pertenecen R6-5 y R100 (Meynell y Datta, 1967). Para la replicación de este grupo de plásmidos se necesitan determinadas funciones

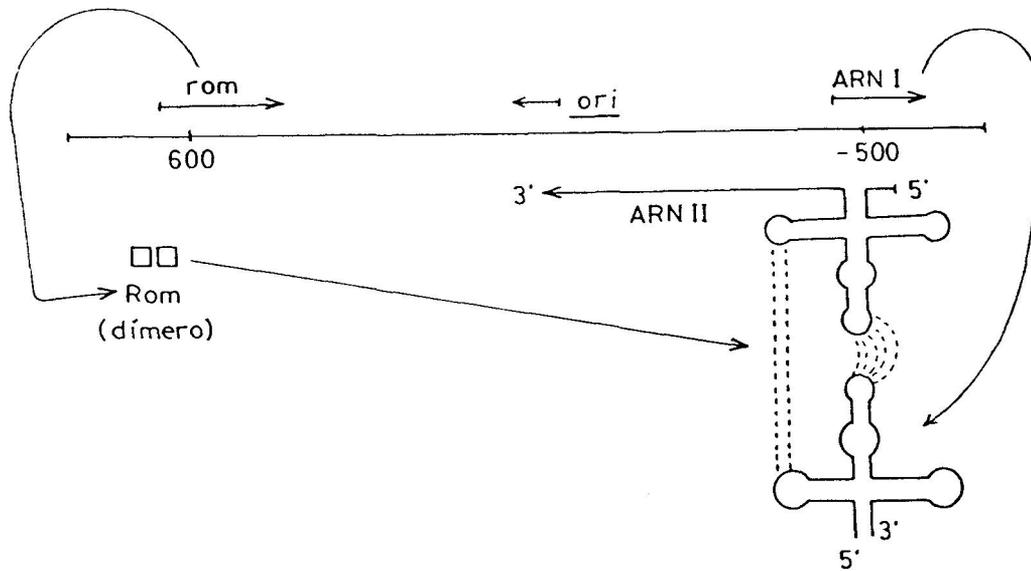


Figura 4.- Origen de replicación del plásmido ColE1. Se muestran los transcritos de los ARN I y ARNII, así como la región codificante para la proteína Rom. Las líneas continuas representan lugares de intervención y las de puntos indican las interacciones entre pares de bases de los ARN I y ARNII. La numeración corresponde a bases respecto al origen de replicación. (Modificado de Cesareni y Banner, 1985).

codificadas por el hospedador, tales como *dnaB*, *dnaC*, *dnaE*, *dnaF* y *dnaG*, aunque no *dnaA*, ni ADN polimerasa I (Rownd, 1978). La proteína implicada en el inicio de la replicación es RepA (Figura 5). Su síntesis está regulada por un ARN antisentido, CopA, que interacciona con la secuencia líder del ARNm de RepA, CopT, resultando en la formación de un duplex ARN-ARN (Nordström *et al.*, 1984). La unión de los dos ARNs se produce a unos 80 nucleótidos del sitio de unión a ribosoma de *repA* por lo que se han postulado varios mecanismos de inhibición indirecta por CopA. Uno de ellos propone que la formación del duplex CopA-CopT induce un cambio en la estructura secundaria del ARNm de RepA que secuestra el sitio de unión a ribosoma (rbs) de *repA* (Dong *et al.*, 1987). Otra posibilidad es que la unión de CopA a CopT durante la transcripción, induzca la formación de un terminador transcripcional en el ARNm, aunque diversos estudios (Öhman y Wagner, 1991) no han encontrado evidencias de mecanismos atenuadores en la regulación de la replicación de R1. Por último existe la posibilidad de que la formación del ARN dúplex facilite indirectamente el deterioro del ARNm.

Recientemente, se ha postulado un nuevo mecanismo para la regulación de la replicación de R1 (Blomberg *et al.*, 1992), donde la frecuencia de replicación está controlada por el ARN CopA y por la traducción de un pequeño péptido líder. La concentración intracelular de CopA y la tasa de unión a CopT determinan la cinética de formación del dúplex de ARN. Si CopA no se une, los ribosomas traducen un pequeño ORF que codifica un polipéptido líder de 24 aminoácidos (Tap, "translational activator peptide"), cuyo códon de terminación se encuentra dos nucleótidos después del codon de iniciación de *repA*, que facilitaría la reinicialización de la lectura por los ribosomas y la unión al rbs de *repA* (traducción directa acoplada). Si se produce la unión de CopA y CopT, se forma el dúplex, impidiéndose la traducción de *tap*. Bajo estas condiciones la estructura tallo-lazo del ARN secuestra el rbs de *repA* previniendo la traducción del mismo, con lo que no hay síntesis de RepA y por lo tanto no se produce inicio de replicación. El funcionamiento de Tap como péptido líder se ha comparado con un sistema análogo descrito para el plásmido ColIb-P9 del grupo de incompatibilidad F α (Hama *et al.*, 1990), donde se describió por primera vez que la expresión de un gen *rep* requiere la traducción de un péptido líder. Parece, por tanto, que no es la inhibición de la traducción lo que regulan los ARNs antisentido, sino el suceso de activación mediado por dichos péptidos líderes.

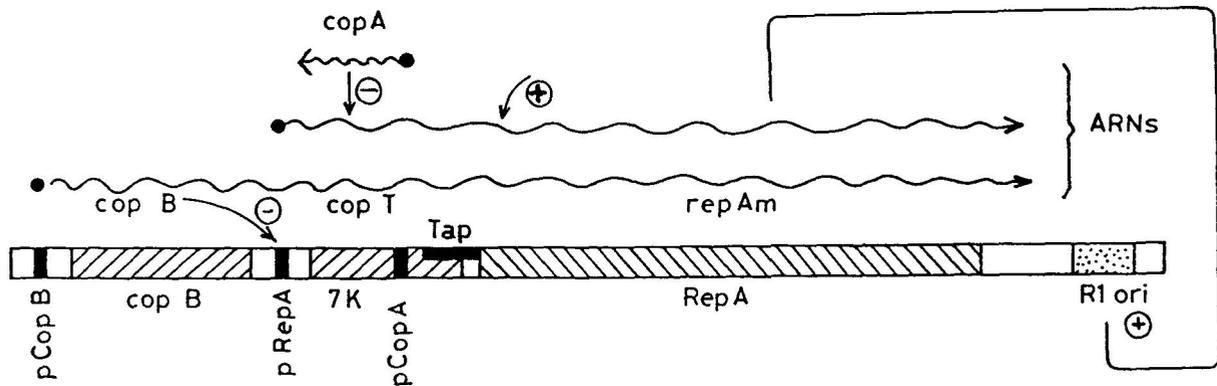


Figura 5.- Estructura del replicón básico del plásmido R1. En rectángulos se indican ORFs de traducción demostrada. Los rectángulos verticales negros representan promotores. Las líneas onduladas de la parte superior muestran transcritos de ARN. Los signos + y - indican interacciones positivas o negativas, respectivamente. Para más detalle ver texto. (Compilado y modificado de Berzal-Herranz *et al.*, 1991 y Blomberg *et al.*, 1992).

2.1.2.- Sistemas de estabilidad.

Como se ha indicado anteriormente, la presencia de plásmidos implica un mayor gasto metabólico para la célula hospedadora. No obstante, en la mayoría de los casos muestran unas estabilidades muy altas, lo que sugiere que han desarrollado una serie de estrategias para asegurar su herencia a la población bacteriana, incluso en la ausencia de condiciones no selectivas. Así, puede ser de considerable importancia en los plásmidos de alto número de copia como ColE1 el haber desarrollado pautas tales como la sobrerreplicación o incremento de la frecuencia en la iniciación de la replicación que aumenta el número total de copias discretas disponibles para la distribución al azar, estabilizando, de esta manera, el plásmido en la población bacteriana (Campbell, 1981). Otro tipo de estrategias incluyen mecanismos tales como los sistemas de partición (Austin, 1988), la eliminación de segregantes libres de plásmidos (Gerdes *et al.*, 1986, Hiraga *et al.*, 1986; Rasmunssen *et al.*, 1987), las transferencias conjugativas infecciosas (Levin, 1986; Lundquist y Levin, 1986) y la exclusión superficial conjugativa contra la entrada de ADN relacionado (van der Hoeven 1985, 1986).

En los plásmidos de bajo número de copias es donde se pone más de manifiesto la existencia de este tipo de mecanismos, pues si bien su menor número de copias es beneficioso para el mantenimiento del plásmido al disminuir la demanda metabólica del hospedador, se incrementa a la vez la probabilidad de que el plásmido se pierda por azar durante la división celular (Davis *et al.*, 1992). Esto sugiere la presencia de elementos codificados por el plásmido que aseguren la fidelidad segregacional, incluidos en mecanismos de estabilización que pueden actuar bien por sí solos o en combinación con otros.

2.1.2.1- Mecanismos estabilizadores.

Algunos de los mecanismos propuestos para el mantenimiento estable de plásmidos son los siguientes:

a) Resolución de multimeros a monomeros (*mrs*):

Este sistema incrementa el número de copias individuales disponibles para la segregación entre las células hijas. Se piensa que es una estrategia utilizada por aquellos plásmidos que se replican a través de un intermediario "theta". No se ha demostrado que

los plásmidos que se replican según el modelo del "circulo rodante" posean esta actividad. Este tipo de mecanismo parece que se ha detectado para el plásmido F (sitio *rsfF* y el producto del gen D)(Lane *et al.*, 1986); para el plásmido R46 (Dodd y Bennett, 1986); la familia del plásmido ColE1 (sitio *cer* y la recombinasa codificada por el gen hospedador *xer*) (Summers y Sherrat, 1984; Stirling *et al.*, 1988); el plásmido pSDL2 de *Salmonella* (Krause y Guiney, 1991); el plásmido pIP404 de *Clostridium perfringens* (Garnier *et al.*, 1987); el plásmido CloDF13 (Hakkaart *et al.*, 1984); y el gen *parA* que codifica para una recombinasa en el plásmido RK2 (RP4), aunque como se verá más adelante, este plásmido posee un sistema mixto *mrs* y de partición (Gerlitz *et al.*, 1990; Roberts *et al.*, 1990).

b) Eliminación de células segregantes libres de plásmido (sistema "killer").

Este tipo de mecanismo elimina mediante muerte o disminución de la tasa de crecimiento aquellas células libres de plásmido aparecidas en una población que originalmente es portadora de dicho plásmido. Son sistemas que codifican determinados productos letales al hospedador e inhibidores específicos para ellos. La muerte de los segregantes libres de plásmidos depende de la inestabilidad relativa del inhibidor. Las células mueren por acción del gen letal cuando no poseen el plásmido y no pueden producir el inhibidor. Así actúa el sistema *ccd* del plásmido F que determina la síntesis de una proteína citotóxica (CcdB) que afecta al crecimiento y/o la viabilidad celular, y una segunda proteína (CcdA) que es un antagonista de este efecto (Ogura y Hiraga, 1983; Jaffé *et al.*, 1985). Los genes *ccdA* y *ccdB* forman un operon que es regulado negativamente por el producto de dichos genes (Tam y Kline, 1989). El sistema actúa estabilizando el plásmido por inhibición de la división celular cuando el número de copia del plásmido se reduce a uno por célula y/o contraseleccionando segregantes que aparecen como consecuencia de fallos en la replicación o partición del plásmido (Hiraga *et al.*, 1986). Se han encontrado similitudes entre este sistema y el sistema *parD* del plásmido R1 aunque ambos no son intercambiables (Ruíz-Echevarría, *et al.*, 1991). *parD* codifica los genes *kis/kid* (Bravo *et al.*, 1987), actuando la proteína Kid como citotóxica y la Kis como antagonista. Este sistema "killer" está exactamente conservado en el sistema *pem* (plasmid emergency maintenance) del plásmido R100 (Tsuchimoto *et al.*, 1988). En este caso cuando la lábil proteína inhibidora (PemI) disminuye en las células libres de plásmido, la proteína citotóxica PemK mata la célula inhibiendo en un primer momento la división

celular (Tsuchimoto y Ohtsubo, 1989). El plásmido R1 posee otro sistema de este tipo, el *parB*, que contiene los genes *hok/sok*. En este caso la acción moduladora de la proteína letal Hok la ejerce un ARN antisentido (*Sok-Rna*) (Gerdes *et al.*, 1986). Aunque estos sistemas ejecutan acciones similares, no existen homologías significativas entre los sistemas *pem* y *ccd*, ni a nivel de ADN ni de proteínas, aunque los polipéptidos codificados son de tamaño similar (Tsuchimoto *et al.*, 1988). Se puede decir que los plásmidos que utilizan este sistema "pagan" por aumentar su estabilidad en la población con una reducción de la tasa de crecimiento celular, causado por la muerte de células que han perdido el plásmido (Jaffé *et al.*, 1985).

c) sistemas verdaderos de partición (*par*).

Estos sistemas se diferencian de los anteriores en que aseguran que cada célula hija recibe una copia plasmídica por división, es decir existe una separación física de copias plasmídicas a cada célula hija. Los ejemplos en donde se ha detectado este tipo de mecanismo son varios: el plásmido F (Austin y Wierzbicki, 1983; Ogura y Hiraga, 1983), las formas plasmídicas de los fagos P1 y P7 (Abeles *et al.*, 1985; Ludtke y Austin, 1987), la familia R1 (Tabuchi *et al.*, 1988; Gerdes y Molin, 1986) o el plásmido pTAR de *Agrobacterium* (Gallie y Kado, 1987). Todos ellos tienen como característica común conferir una mejor estabilidad al plásmido que lo lleva sin afectar por ello al número de copias o inducir una menor tasa de crecimiento debido a la eliminación de las células segregantes (Willians y Thomas, 1992). Por otra parte, estos sistemas deben de ser capaces de estabilizar replicones heterólogos y actuar como determinantes de incompatibilidad, es decir dos plásmidos que comparten el mismo sistema activo de partición, o específicamente el sitio activo en *cis* que va asociado con él, interferirán uno con otro en la capacidad de ser repartidos correctamente, mostrando así incompatibilidad (incompatibilidad mediada por partición) (Austin y Nordström, 1990). Dicho de otra forma, se debe demostrar que una población inicial que contiene ambos plásmidos tenderá a segregarse individuos con uno u otro plásmido, pero no con los dos. Los sitios en *cis* necesarios para la partición han sido denominados secuencias análogas a centrómeros, por su analogía con las secuencias requeridas en la segregación de los cromosomas eucarióticos.

Existen dos sistemas de partición bien estudiados (para revisión Willians y Thomas, 1992). Uno es mixto y por un lado interviene un sistema de partición/resolución, muy bien

caracterizado en los plásmidos RK2/RP4 y localizado en el denominado fragmento *PstI* C de 6,2 kb (Gerlitz *et al.*, 1990; Roberts *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1992; Eberl *et al.*, 1992). Es conocido como locus *par* y codifica dos operones divergentes, uno formado por *parC*, *parB* y *parA* y otro por *parD* (Figura 6). Sus promotores (*PparCBA* y *PparD*) se localizan dentro de un segmento de 200 pb, y se encuentran autorregulados por las proteínas ParA y ParD, respectivamente (Davis *et al.*, 1992; Eberl *et al.*, 1992). Asimismo, esta región incluye el sitio de actuación en *cis* para la actividad *mrs* (Roberts *et al.*, 1990). El producto del gen *parA* parece implicado en el sistema de resolución de multimeros específico de sitio e independiente de la composición del vector (Grinter *et al.*, 1989), ya que codifica una resolvasa relacionada con Tn3 y Tn1721, reconociendo en *cis* un segmento de 140 pb en la region promotora. En este fragmento se localizan dos secuencias directas repetidas y otras dos inversas imperfectas cuya función biológica se desconoce, pero que pudieran ser importantes en el reconocimiento de resolvasas por analogía con sitios de actuación en *cis* para recombinasas que poseen a menudo dichas repeticiones (Heffron y McCarthy, 1979; Sherrat *et al.*, 1984). Sin embargo, el sistema de resolución por sí sólo no explica la alta estabilidad conferida por todo el locus. Así, el mecanismo actuaría también como un verdadero sistema de partición, y en el estarían implicados los productos del operón *parD* (cuya ausencia reduce la estabilización). El sistema funciona en varios hospedadores, mostrando sólo débil incompatibilidad y ninguna homología con otros sistemas implicados en partición (Roberts *et al.*, 1990). De esta forma, una región de 0,8 kb que contiene dicho operón confiere estabilidad en un amplio rango y bajo diferentes condiciones. Recientemente se ha comprobado la existencia de un nuevo gen, *parE*, situado inmediatamente posterior a *parD* (Roberts y Helinski, 1992), que codifica una proteína de 103 aminoácidos. Ambos genes se han mostrado esenciales para la estabilización de plásmidos. Parece ser que la estabilización de RK2 por la región *par* es debida a un sistema multifuncional en donde el operón *parDE* es esencial, y el sistema de resolución de multimeros un elemento condicionalmente dispensable. Por último, hay que indicar que este sistema (tanto el fragmento de 3,2 kb como el de 0,8 kb) es capaz de estabilizar plásmidos derivados de RK2 en células de *R. meliloti* aisladas de nódulos de alfalfa (Weinstein *et al.*, 1992).

El otro sistema de partición propiamente dicho se ha caracterizado para los plásmidos R1 (*parA*) o R100 (*stbA/B*) del grupo de incompatibilidad FII, para el plásmido

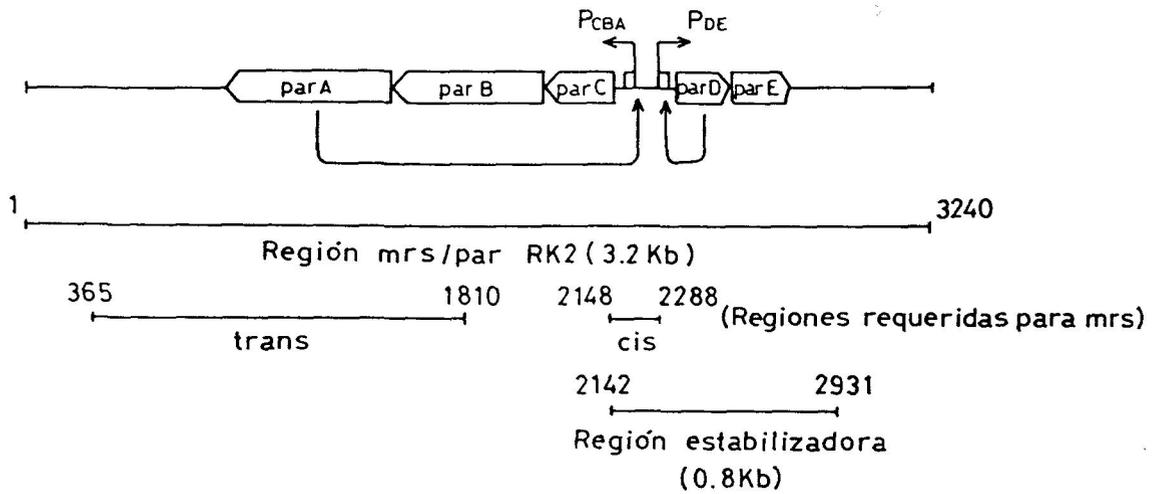


Figura 6.- Esquema de la región de 3,2 kb que contiene el *locus mrs/par* del plásmido RK2. Las flechas indican dirección de transcripción y lugares de interacción sobre los promotores *pCBA* y *pDE*. La numeración indica longitud en pb. Para más detalle ver texto. (Modificado de Roberts y Helinski, 1992)

F (*sop*) y el profago P1 (*par*). Quizás sea este último el mejor estudiado. De modo breve se caracterizan porque ambos tienen una organización genética similar, codificando dos tipos de proteínas, A y B, y un sitio análogo a centrómero, siendo los tres esenciales para la partición. El análisis de las proteínas A (Friedman y Austin, 1988; Mori *et al.*, 1989) muestra que hay homología entre ellas y con el consensus de los motivos de unión a ATP del tipo 1 (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990). Hoy se sabe que ParA de P1 es una ATPasa y que su actividad está estimulada por ParB y por ADN. Por ello parte de la energía empleada en los mecanismos de partición puede derivar de la hidrólisis de ATP por las proteínas ParA que muestran homología con la proteína IncC de RK2, que utiliza, igualmente, actividad ATPasa dirigida a la partición de plásmidos (Motallebi-Veshareh, *et al.*, 1990). Las proteínas B tienen como característica común su unión a sus respectivas secuencias análogas a centrómeros (Davis y Austin, 1988; Mori *et al.*, 1989), pudiendo promover la unión del plásmido a sitios de membrana del hospedador implicados en la partición. Estas proteínas muestran homología con la proteína KorB de RK2. El par *incC/korB* muy probablemente forme parte de un sistema de partición adicional para RK2. Si éste o el descrito previamente *mrs/par* juegan un mayor o menor papel en estabilización de RK2 es desconocido y puede variar de una especie a otra. El último elemento presente en los sistemas de partición es el sitio de actuación en *cis*. Para F es *sopC* (12 repeticiones directas de 43 pb) (Helsberg y Eichenlaub, 1986), para P1 *parS*, que incluye una región rica en AT que contiene una repetición invertida de 20 pb.

2.2.- Plásmidos en *Rhizobium*.

Las bacterias del género *Rhizobium* son portadoras de un número variable de grandes plásmidos, cuyos pesos moleculares son generalmente superiores a los 100 Md. Con las técnicas de detección de plásmidos en gel (Eckhardt, 1978) y sus posteriores modificaciones (Banfalvi *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1982) fue posible detectar en *Rhizobium* la presencia de grandes plásmidos, junto a otros más pequeños ya observados por los procedimientos de lisis alcalina (Casse *et al.*, 1979; Jouanin *et al.*, 1981). Los plásmidos grandes han recibido el nombre de megaplásmidos. En el caso concreto de *R. meliloti* alcanzan tamaños superiores a 1000 kb (Rosenberg *et al.*, 1981, 1982). Aunque en un principio se pensaba que la banda mayor (común en los perfiles de las especies de *R.*

meliloti) correspondía a un sólo plásmido, posteriormente se comprobó que en realidad englobaba a dos (Banfalvi *et al.*, 1985), adjudicándoles unos tamaños de 1200 y 1500 kb (Burkhardt *et al.*, 1987). En los megaplásmidos se han venido caracterizando genes implicados en la fijación simbiótica de nitrógeno, por lo que han recibido la denominación de plásmidos simbióticos o pSyms (Huguet *et al.*, 1983). Al resto de plásmidos se les dio el nombre de pRme. Esta característica común para *R. meliloti* no aparece, sin embargo, para otras especies de *Rhizobium*, donde los perfiles plasmídicos son más variables. Ligados a los pRmes (o sus equivalentes en las otras especies), que aparecen en número variable, sólo se han detectado escasas funciones, por lo que tradicionalmente han recibido el nombre de plásmidos crípticos. Como norma general los plásmidos son denominados por el nombre de la especie y el número de cepa, seguido por una letra minúscula que empieza con la denominación "a" para el plásmido más pequeño (Demerec *et al.*, 1966).

El tamaño molecular de los pSyms de otras especies varía considerablemente oscilando entre las 50 y 600 kb para *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Harrison *et al.*, 1988) y para las otras biovariedades y especies de *Rhizobium*, como *R. hedysari* (Mozo *et al.*, 1988). En *R. loti* (Pankhurst *et al.*, 1986), *Rhizobium* spp. (Cajanus) (Sharma y Laxminarayana, 1989) y en *Bradyrhizobium* (Haugland *et al.*, 1984) también ha sido posible detectar la presencia de plásmidos grandes, aunque no son portadores de genes simbióticos. En las especies del género *Azorhizobium* no se han detectado plásmidos grandes (Van den Eede *et al.*, 1987), lo que hace pensar que en este caso, como en las últimas especies, los genes simbióticos se encuentran localizados en el cromosoma.

En definitiva, y como norma general, es característica dentro de la familia Rhizobiaceae la presencia de plásmidos grandes, muchos de ellos de funciones no conocidas. Como se ha indicado, algunos de ellos son esenciales para el establecimiento de la simbiosis, pero otros son perfectamente prescindibles. Algunos muestran la capacidad de ser autotransmisibles, si bien este hecho se ha constatado en muy escasas ocasiones para los pSyms (Pretorius-Güth *et al.*, 1990), y de forma relativamente frecuente para los "crípticos" (Huguet *et al.*, 1983; Jonhston *et al.*, 1982) lo que resulta interesante desde el punto de vista de la dispersión entre cepas y especies de determinadas características fenotípicas. Como hecho significativo a destacar es la presencia de amplias regiones con homología entre algunos de ellos, que puede indicar relaciones de parentesco, así como la

posibilidad de establecer grupos de incompatibilidad entre los mismos, que además se puede hacer extensiva a plásmidos de *Agrobacterium* (Huguet *et al.*, 1983; Tepfer *et al.*, 1988).

2.2.1.- Plásmidos simbióticos.

Como se ha indicado anteriormente, la denominación de plásmido simbiótico (pSym) alude a la presencia de genes implicados en la fijación simbiótica de nitrógeno. La curación, o delección de parte de ellos abole total o parcialmente aspectos relacionados con el establecimiento de una simbiosis efectiva.

La primera comprobación de este hecho se obtuvo cuando se detectó en dichos plásmidos la presencia de regiones homólogas a los genes estructurales de la nitrogenasa *nifD* y *nifH* de *Klebsiella* en plásmidos de *R. leguminosarum* (Nutí *et al.*, 1979). Esto se confirmó posteriormente para *R. meliloti*, situando estos genes en la banda megaplasmídica (Huguet *et al.*, 1983). También fue posible la localización en estos plásmidos de los genes implicados en los procesos de nodulación, estudiando delecciones en los mismo (Banfalvi *et al.*, 1981). En general los plásmidos portadores de genes *nod*, *nif*, *exo*, *fix*, y otros genes simbióticos son los que se denominan pSyms.

Los genes simbióticos han sido localizados en plásmidos de diferentes especies de *Rhizobium* mediante procedimientos de hibridación de genes *nif*, *nod* u otros o por restauración o alteración de las propiedades simbióticas mediante la transferencia de plásmidos (Prakash y Atherly, 1986; Innes *et al.*, 1988; Martínez *et al.*, 1990). Los genes simbióticos no siempre se encuentran situados en el mismo plásmido, así los genes implicados en la síntesis de exopolisacáridos (EPS) están localizados en el pSym mayor de *R. meliloti*, mientras que los genes *nod* y *nif* se hayan en el pSym de menor tamaño molecular (Finan *et al.*, 1986; Hynes *et al.*, 1986).

Por otra parte, también se localizan en estos plásmidos simbióticos otros genes no implicados en la simbiosis. Así ha sido posible determinar la presencia de los genes *trc* ("trigonelline catabolism") en una región muy proxima a genes simbióticos del pSym de *R. meliloti* 412 (Boivin *et al.*, 1990). La trigonelina es una betaína, como son la colina y la glicinbetaína, que igualmente son catabolizadas por *R. meliloti* (Le Rudulier y Bernard, 1986). Es muy probable que esté implicado el pSym en el catabolismo de estos

compuestos, como lo demuestra el hecho de que una cepa con una importante delección en el pSym no pueda usar ninguno de los tres como única fuente de carbono y nitrógeno (Boivin *et al.*, 1990). Asimismo estos metabolitos ejercen un papel como osmoprotectores, siendo no obstante el de la trigonelina mucho menos potente (Bernard *et al.*, 1986; Le Rudulier y Bernard, 1986).

Los genes *mos* y *moc*, responsables de la síntesis y catabolismo de la rhizopina (3-o-metil-escilo-inosamina), se encuentran también localizados en el plásmido simbiótico b de la cepa L5.30 de *R. meliloti*. La síntesis y utilización de este análogo a las opinas proporcionan ciertas ventajas metabólicas que se manifiestan en una mayor competitividad de las cepas portadoras de estos genes, que en el caso de los *mos* son regulados en paralelo con los genes *nif*, al tener promotores reconocidos por RpoN y NifA (Murphy y Saint, 1992).

Otro tipo de genes localizados en pSyms, aunque no siempre, con una implicación desconocida en la simbiosis, son los genes productores de melanina, que forman una familia de pigmentos pardo-negros, ampliamente distribuidos entre animales, hongos, plantas superiores y bacterias. La biosíntesis de melanina se produce por la acción de la enzima tirosinasa, que es una monooxigenasa que contiene cobre y que posee actividades cresolasa y catecolasa (Lerch, 1981). La enzima cataliza la ortohidroxilación de monofenoles y aminas aromáticas a o-difenoles que posteriormente son oxidados a o-quinonas. La melanina negra (eumelanina) se sintetiza *in vivo* a partir de tirosina y forma un heteropolímero compuesto de unidades de 5,6-dihidroxiindol y ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico. Actúan como absorbentes de UV, intercambiadores catiónicos, semiconductores amorfos, heteropolímeros con capacidad para secuestrar drogas, etc (della-Cioppa *et al.*, 1990). En la Figura 7 se representa un esquema de los primeros pasos de la síntesis de melanina.

La producción de melanina por cepas de *Rhizobium* es un hecho relativamente frecuente, si bien en un principio se asoció como una característica diferenciadora de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. La producción de melanina se observa tras una prolongada incubación en medio TY de forma que las colonias productoras se tornan pardas a negras así como el medio que las rodea. Este proceso se puede acelerar por lisis de las colonias jóvenes (2-3 días) al agregar a las placas una solución de SDS. La pigmentación se

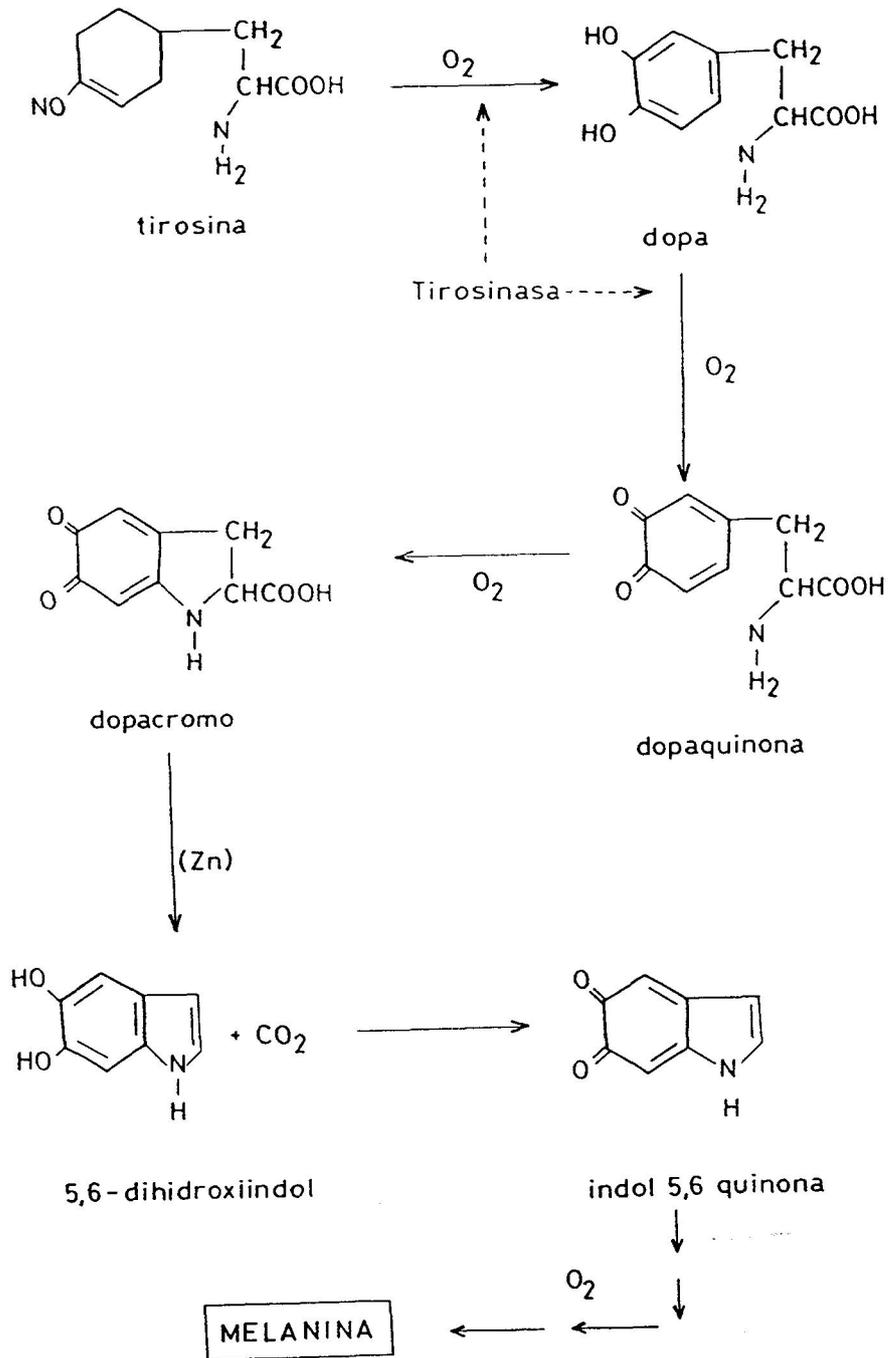


Figura 7.- Ruta propuesta para la biosíntesis de melanina (modificado de Cubo, 1988).

aumenta en colonias crecidas en medio suplementado con L-tirosina y con Cu_2SO_4 . Esto parece indicar una separación física entre la enzima y el sustrato, ya que la pigmentación sólo ocurre en células viejas donde la autólisis libera la tirosinasa o bien cuando dicha lisis es inducida mediante SDS (Hawkins y Johnston, 1988).

No obstante y a pesar de ser un carácter bastante extendido, la capacidad de producir melanina no es requerida para la fijación simbiótica de nitrógeno, aunque se ha obtenido algún mutante *Mel*⁻ que también es *Fix*⁻ (Lamb *et al.*, 1982). Posteriormente fue posible localizar en el plásmido simbiótico pRP2JI de la cepa 8002 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* dos regiones implicadas en la producción de melanina. Una de ellas con los genes *mel* de clase I (*mela*) parece que codifica el gen estructural de la tirosinasa, y otra con los genes *mel* de clase II que se encuentra lejos de la anterior y muy cercana a otros genes previamente identificados (*nif*, *nod*, *psi* y *psr*) implicados en la fijación simbiótica de nitrógeno y que precisamente complementan a la cepa mutante *Fix*⁻*Mel*⁻. Posteriormente se pudo saber que estos últimos dieron señales de homología con *nifA*, y que éste producía la activación transcripcional del gen estructural *mela* (Borthakur *et al.*, 1987; Hawkins y Johnston, 1988), lo cual no excluía cierta relación entre la producción de melanina y la simbiosis, aunque todavía no bien definida. Más recientemente se ha detectado un nuevo locus que parece implicado en síntesis de melanina, aunque igualmente relacionado con otros aspectos tales como la fijación de nitrógeno y una menor tasa de crecimiento en medios con succinato como fuente de carbono o nitrato como fuente de nitrógeno (Hawkins *et al.*, 1991). Se postula un posible efecto regulador para este gen, aunque queda por determinar cuál es la conexión entre los cuatro fenotipos encontrados para los mutantes *Mel*⁻. Los autores apuntan la posibilidad de cierta similitud entre *melC* y *rpoN* (que codifica para el factor σ^{54} esencial para la fijación de nitrógeno), basados en las semejanzas fenotípicas existentes entre mutantes *ntrA* y *melC*, ya que mutantes *ntrA* en *R. meliloti* se encuentran afectados en genes activados por *nifA*, y en la utilización de succinato y nitrato (Ronson *et al.*, 1987).

2.2.2.- Plásmidos no simbióticos.

Aparte de lo indicado para los plásmidos simbióticos, una enorme cantidad de material genético presente en *Rhizobium* se encuentra en otros plásmidos en los que

tradicionalmente no se han encontrado funciones relacionadas con los procesos simbióticos ni con otras características que pudieran conferir ventajas fenotípicas. Hoy en día se conoce bastante poco acerca de las posibles misiones a desempeñar por tal ADN "silencioso" aunque se empieza a asociar determinadas características con la presencia de los mismos.

En general se puede hacer una división arbitraria sobre las funciones determinadas por dichos plásmidos, de manera que un grupo de las mismas englobe a aquellas que, si bien no son esenciales para la simbiosis, sí pueden estar involucradas en algunos aspectos de la misma. Por otra parte un segundo grupo estaría formado por genes localizados en los plásmidos no simbióticos cuya función, hoy por hoy, no se puede asociar a características simbióticas o cuya implicación puede ser poco clara.

En cuanto al primer grupo se pueden citar varios ejemplos. Así plásmidos grandes no simbióticos y autotransmisibles son responsables de la síntesis de bacteriocinas, compuestos probablemente importantes en la competencia intraespecífica (Hirsch, 1979; Johnston *et al.*, 1982). También ha sido posible relacionar la formación de nódulos fijadores con la presencia de determinados genes localizados en dos plásmidos crípticos de una cepa de *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Hynes y McGregor, 1990). Igualmente se ha determinado que la presencia de plásmidos crípticos puede afectar de una manera negativa la efectividad simbiótica de cepas de *R. leguminosarum*, como ocurre con la presencia del plásmido bacteriocinogénico pRL3JI que disminuye la efectividad de la cepa portadora (DeJong *et al.*, 1981). Este tipo de efecto también se ha observado para cepas de *R. loti*, en donde derivados curados de plásmido muestran capacidades competitivas y efectivas mayores que la cepas silvestres (Pankhurst *et al.*, 1986). Más recientemente Selbitschka y Lotz (1991) han encontrado que determinada información genética presente en plásmidos no simbióticos de cepas de *R. leguminosarum* bv. *viceae* puede reducir la eficiencia de la fijación simbiótica de nitrógeno con *P. sativum* aunque no con *V. faba*. Ellos mismos han postulado que dichas secuencias son portadoras de determinantes *hrf* ("host-dependent reduction of nitrogen fixation") que contribuyen a la desigual eficiencia simbiótica que las cepas estudiadas tienen con diferentes hospedadores.

La posible implicación de los plásmidos no simbióticos en la asociación con la planta va incluso más allá, puesto que se han encontrado reiteraciones de genes *nod* o *nif*. Así el plásmido pSV1 de *R. meliloti* 1076 muestra reiteraciones con los genes *nodB* y

nodC, si bien sólo este último es funcional. Igualmente existen reiteraciones para los genes *nifE* y *nifD*, aunque sólo es funcional el primero (Rastogi *et al.*, 1991). La reiteración de genes es un hecho igualmente constatado para los pSyms. Las posibles explicaciones que pueden darse a este hecho son dos. Por una parte que los plásmidos crípticos con reiteraciones puedan representar captaciones de pSym procedentes de otra especie debidas a fenómenos, ya constatados, de transmisión de plásmidos simbióticos (Young y Wexler, 1988), y por otra, la presencia de secuencias simbióticas reiteradas de pVS1 pueden haberse originado a partir del pSym de *R. meliloti* mediante recombinación (Brom *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1991). No es raro el fenómeno de las reiteraciones, ya que han sido encontrados para numerosas cepas (Flores *et al.*, 1987), y se ha postulado que dichas regiones reiteradas pueden estar implicadas en la generación de reorganizaciones génicas (Kaluza *et al.*, 1985; Hahn y Hennecke, 1987), que algunas veces ocurren a un alta frecuencia como es el caso de los plásmidos de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Brom *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1991). Las reorganizaciones debidas a la presencia de secuencias reiteradas pueden resultar en amplificación, delección o cointegración de plásmidos.

Por último, y dentro de este apartado de genes localizados en plásmidos no simbióticos, pero que de alguna manera afectan a las características simbióticas, hay que citar las implicaciones del plásmido pRmeGR4b de la cepa GR4 de *R. meliloti*. Dicho plásmido fue relacionado con una mayor capacidad de nodulación de la cepa GR4 (Toro y Olivares, 1986a). Posteriormente ha sido posible identificar un locus génico implicado en competitividad que poseía secuencias homólogas a promotores *nif* y que ha recibido el nombre de *nfe* ("nodule formation efficiency") (Sanjuán y Olivares, 1989), y cuya expresión está directamente controlada por el sistema regulador NifA-RpoN (Sanjuán y Olivares, 1991), no habiéndose encontrado análogos, por el momento, en otras cepas de *R. meliloti* comunmente usadas. Estudios muy recientes efectuados en este laboratorio han permitido localizar en esta región al menos dos ORFs cuyos promotores muestran, altamente conservados, los sitios de reconocimiento para NifA-RpoN, otro cuyo producto presenta homología con la ornitinciclodeaminasa (*ocd*) de *A. tumefaciens*, enzima que podría estar relacionada con la capacidad de la cepa GR4 de utilizar exudados radicales tales como la ornitina, lo que posibilitaría ventajas metabólicas en determinados momentos del proceso de infección y nodulación (Toro *et al.*, 1992). Y por último la presencia de

secuencias de inserción (IS), una casi idéntica a *ISRm3* (Wheatcroft y Laberge, 1991), y otra no descrita hasta ahora y que se ha denominado *ISRm4* (Soto *et al.*, 1992a, 1992b). Asimismo no se descarta que en el transcurso de la investigación aparezcan otras IS nuevas, lo que permite sugerir la hipótesis de que estos elementos hayan podido jugar algún papel en el desarrollo de la región *nfe* con una clara implicación en la simbiosis y que al ser un hecho muy general en *Rhizobium* determine muchas de las reiteraciones citadas anteriormente.

También, y como se indicó al principio de este apartado, otro grupo de genes localizados en plásmidos no simbióticos no parecen tener, por el momento, alguna implicación con propiedades simbióticas. Un ejemplo bastante bien estudiado es el que implica al plásmido pRme41a de la cepa 41 de *R. meliloti* con el metabolismo de las calisteginas (Tepfer *et al.*, 1988; Boivin *et al.*, 1990), un grupo de catabolitos secundarios presentes en exudados radicales de determinadas plantas que pueden ser utilizados ventajosamente por esta cepa adquiriendo por ello ventajas selectivas en la rizosfera de estas plantas. Los genes *cac* ("calystegin catabolism") se localizaron en el plásmido pRme41a, comprobándose además que esta cepa era capaz de crecer en medio mínimo suplementado únicamente con calisteginas, y que cepas curadas del mismo no lo hacían. Sin embargo estos genes no tienen implicación en procesos simbióticos y más parece que las bacterias con fenotipo *Cac*⁺ exhiban ventajas selectivas permitiendo la supervivencia de las poblaciones de *Rhizobium* durante su vida saprofitica en ausencia de la leguminosa hospedadora (Boivin *et al.*, 1990). Por este hecho se puede atribuir a algunos de estos plásmidos no simbióticos su implicación en el catabolismo de exudados radicales.

Otra característica asociada a plásmidos no simbióticos que ha sido bastante estudiada es la producción de melanina, aunque como se ha indicado antes, también puede estar ligada a plásmidos simbióticos en algunas cepas (Lamb *et al.*, 1982), lo que demuestra la distribución desigual que se da para ciertos caracteres. La primera vez que se detectó la producción de pigmentos melánicos asociada a plásmidos no simbióticos fue la constatada para el plásmido pRleVF39a de *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Hynes *et al.*, 1988). El hecho de que la autotransferencia de dicho plásmido a otras cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* no determine siempre la producción de melanina en estos receptores hace pensar que toda la información necesaria no se encuentre en dicho plásmido, lo que estaría

en conexión con el sistema de genes *mel* descrito para la cepa 8002 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur *et al.*, 1987; Hawkins y Johnston, 1988; Hawkins *et al.*, 1991), si bien en este caso, su localización es en el plásmido simbiótico. Además parece existir, tal como se indicó anteriormente, la implicación de *nifA* que no se ha investigado en el plásmido pRleVF39a. Según Hawkins y Johnston (1988), un posible efecto de la producción de melanina en *Rhizobium* es que la tirosinasa funcionase como detoxificante de compuestos polifenólicos que pudieran acumularse en nódulos senescentes.

Una mejor caracterización de las cepas productoras en diversos géneros de *Rhizobium* fue realizada por Cubo *et al.*, (1988). Los resultados de este estudio mostraron que la producción de melanina se extiende a cepas de *R. leguminosarum* bvs. *viceae*, *trifolii* y *phaseoli*, *R. meliloti*, y *R. fredii*. Como ya se ha visto, la localización física de estos genes es variable y, aparte de los señalados en el apartado anterior, se localizan en el plásmido simbiótico de las cepas CFN42 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* o GRO15 de *R. meliloti*. Sin embargo, se sabe que en la cepa RS24 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se haya en uno no simbiótico, aunque porta al menos un gen *nod*, e igual ocurre para el plásmido pRfr205a de la cepa USDA205 de *R. fredii*.

Como conclusión hay que señalar que a pesar de la gran cantidad de material genético que portan, son pocos los caracteres ligados tanto a los pSyms como a los plásmidos no simbióticos, pero es indudable que se trata de un material que se mantiene de una forma muy estable, lo que sugiere por una parte, la presencia de mecanismos estabilizadores, y por otra, su implicación en propiedades hoy por hoy no conocidas que bien pueden estar relacionadas con la vida libre de las cepas, o con su asociación con la planta.

2.2.3.- Replicación y estabilidad de plásmidos en Rhizobiaceae.

Ya se ha destacado la elevada estabilidad mostrada por los plásmidos presentes en las diferentes especies y géneros de *Rhizobium*. Sin embargo, no se conoce nada acerca de los mecanismos implicados en el alto nivel de mantenimiento de dichos plásmidos. Hasta ahora sólo se han efectuado los aislamientos de regiones implicadas en la replicación autónoma de un plásmido de la cepa G1027 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* como un fragmento de 15 kb en un plásmido de tipo ColE1 (Neilan *et al.*, 1986) y otro de 5,4 kb

responsable del mantenimiento estable del plásmido críptico pHc23a de la cepa UPM-Hc23 de *Rhizobium* sp. (*Hedysarum*) (Mozo *et al.*, 1990). El primero no se ha caracterizado en detalle y del segundo se han derivado varios plásmidos con un doble origen de replicación (ColE1 y el propio del plásmido) con uso potencial como vectores de clonaje, que parecen comportarse de una forma bastante estable en los diversos hospedadores ensayados. En este fragmento los autores localizan, aparte del *oriV*, las posibles funciones de replicación y estabilidad así como los determinantes de incompatibilidad.

Por el contrario, los estudios efectuados sobre plásmidos de *Agrobacterium* han aportado más datos, si bien tampoco son tan exhaustivos como los conocidos para otros plásmidos. De esta forma ha sido posible determinar con bastante detalle las regiones implicadas en replicación y mantenimiento estable de los plásmidos pTiB6S3 de *A. tumefaciens* (Tabata *et al.*, 1989) y pRiA4b de *A. rhizogenes* (Nishiguchi *et al.*, 1987). En estos plásmidos se ha detectado la presencia de proteínas RepA y RepB que guardan homología con las proteínas de tipo A y B, respectivamente, relacionadas con la partición (Williams y Thomas, 1992). Asimismo presentan otra proteína implicada en replicación denominada RepC. Sin embargo, aunque estos plásmidos son perfectamente compatibles y el tamaño, organización y posible función de los genes encontrados son prácticamente idénticos y codifican además secuencias de amino ácidos relativamente bien conservadas, no es posible detectar complementación entre las funciones Rep, lo que sugiere que quizás dichas proteínas están funcionalmente muy especializadas como para poder complementarse (Tabata *et al.*, 1989). El plásmido pTiC58 también ha sido estudiado y en él se han podido diferenciar la presencia del origen de replicación unido a los determinantes de incompatibilidad así como una región implicada en estabilidad (*par*) y otra en el número de copia (*cop*) (Gallie *et al.*, 1985).

Igualmente se encuentra bastante caracterizada una región implicada en la replicación y mantenimiento del plásmido pTAR de *A. tumefaciens* (Gallie *et al.*, 1984; Gallie y Kado, 1987). Consta del origen de replicación incluido en un fragmento de 1,3 kb, y de una región de 1,2 kb situada a unos 800 pb relacionada con la estabilización. Esta región permite que pTAR se mantenga de forma estable en una o dos copias por célula. El sistema de estabilización parece ser de partición y codifica una proteína de 23,5 kDa, ParA, que muestra homología con la familia de proteínas A de los sistemas de partición

(Willians y Thomas, 1992). También parecen implicadas en partición otras dos regiones localizadas fuera de la zona codificante para *parA*, una constituida por 12 repeticiones de 7 pb separadas entre sí por 10 pb, que constituye un determinante de incompatibilidad (*incP*) asociado a partición, el sitio *en cis* para la partición y la región promotora a la que se une ParA para autorregular su propia transcripción, y otra región de 125 pb cuya función se desconoce (Gallie y Kado, 1987).

3.- Sistemas de transferencia de información génica usados en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

El estudio del ADN clonado requiere conocer la función génica de dicho fragmento bajo las condiciones particulares en que aquella se desarrolla, como ocurre con los organismos fijadores de nitrógeno. Para ello es necesario la utilización de sistemas de vectores que en algunos casos son de muy estrecho rango de hospedador y en otros se desarrollaron para otro tipo de bacterias. Este problema queda solucionado cuando se utilizan vectores derivados de plásmidos indígenas de las cepas a estudiar, si bien el rango de hospedador sigue restringido a un número limitado de especies. El estado ideal reside, por lo tanto, en disponer de sistemas de clonaje con un rango de establecimiento amplio, ya que es usual estudiar genes y sus funciones en organismos diferentes, y que puedan ser, además, fácilmente transmitidos de unos a otros de forma controlada, disponiendo a este efecto, de sistemas de conjugación efectivos. Existen de forma natural plásmidos con estos requisitos y, convenientemente manipulados, han servido y sirven como vectores de clonaje transferibles a un amplio número de especies.

3.1.- Vectores de uso no específico derivados de plásmidos de amplio rango de hospedador.

Existen plásmidos con capacidades replicativas y de mantenimiento estables en un amplio número de hospedadores que se usan extensamente en bacterias Gram-negativas. Dichos plásmidos pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad, siendo los más representativos los pertenecientes a los grupos IncP, IncQ e IncW, de los que ya se ha dado una breve explicación de lo más representativo de sus mecanismos replicativos y de

mantenimiento. Se expondrán ahora las ventajas prácticas más sobresalientes que se han obtenido de ellos en tecnología de vectores.

Aunque los plásmidos citados en el apartado 2 de esta Introducción, poseen características que los hacen interesantes para su uso como vectores de clonaje, como sus propiedades de replicación y mantenimiento en un amplio rango de hospedador, son necesarias algunas modificaciones para su mejor aprovechamiento. Así, deben tener un tamaño pequeño, que facilite su aislamiento y procedimientos de clonaje, poseer sitios únicos de restricción, contar con la presencia uno o varios marcadores que faciliten su selección en diferentes organismos, y por último, la posibilidad de detección de moléculas recombinantes por inactivación insercional (Simon y Prierer, 1990). Obviamente deben ser altamente efectivos en introducirse en células hospedadoras, por lo que es útil aprovechar las propiedades conjugativas que poseen los plásmidos de los que derivan. Para reducir el riesgo de propagación incontrolada, es preferible mantener separados los sistemas replicativos y conjugativos, prefiriéndose, por tanto, los vectores movilizables a los autotransmisibles. De esta forma se han desarrollado sistemas binarios de vectores constituídos por el vector propiamente dicho y un plásmido movilizador (ayudador) que proporciona las funciones necesarias para la transferencia. Hay también que tener en cuenta que para evitar efectos indeseables es interesante sustituir los marcadores de resistencia a antibióticos por otras características sin implicaciones ecológicas, como podría ser la resistencia a metales pesados.

3.1.1.- Vectores derivados del grupo de IncP.

Posiblemente el más usado y conocido en *Rhizobium* sea pRK290, que mantiene de su plásmido progenitor, el marcador de resistencia a tetraciclina, el origen de transferencia (*oriT*) y las regiones esenciales para la replicación en un amplio espectro de hospedadores (Ditta *et al.*, 1980). Posee sitios únicos de restricción aunque sin capacidad de inactivación insercional. Este plásmido y su derivado pRK292, han servido para construir genotecas, y para el clonaje y caracterización de genes simbióticos en *R. meliloti* y *Bradyrhizobium* (Corbin *et al.*, 1983; Scott, 1986).

El cósmido pLAFR1 es un derivado de pRK290, consistente en la inserción del sitio *cos* del fago lambda (Friedman *et al.*, 1982). pLAFR3 aporta además la presencia de un

sitio de clonaje múltiple, y el *lacZ* que permite la selección de transformantes en presencia de X-gal. Como el plásmido original, estos derivados han servido fundamentalmente para la construcción de bancos génicos de diferentes especies.

La principal desventaja de los plásmidos pRK290 y pLAFR1 es su limitado número de sitios de clonaje así como su carencia de inactivación insercional. Por ello se han construido derivados con marcadores y sitios de clonaje adicionales como pRK293, pRK310 y pRK311 (Ditta *et al.*, 1985) y la serie pVK (Knauf y Nester, 1982). Estos últimos, tales como el pVK101 y los cósmidos pVK100 y pVK102 incorporan el gen de resistencia a Km, lo que no sólo ofrece inactivación insercional, sino que proporciona sitios de clonaje adicionales.

El gran tamaño de pRK290 (unas 20Kb) y sus derivados, dificulta el trabajo por su baja eficiencia de transformación por lo que se han construido algunos de menor tamaño, como pRK2501 de 11 Kb con Tc y Km (Kahn *et al.*, 1979), o el pHK17 (Klee *et al.*, 1982) que además lleva el sitio *cos*. No obstante, estos plásmidos son Mob⁻ y Tra⁻, aunque algunos derivados como pGS65 o pRK252 (Ditta *et al.*, 1985; Selvaraj e Iyer, 1985) llevan clonado el *oriT* de RK2. Los intentos de mejorar dichos vectores mediante la adición de un sitio de clonaje múltiple y el gen *lacZ* produjeron el vector pRK404 (10,6 Kb), aunque los resultados de estabilidad obtenidos decrecieron notablemente con respecto a pRK290 (Ditta *et al.*, 1985).

3.1.2.- Vectores derivados del grupo IncQ.

El pequeño tamaño de los plásmidos pertenecientes a este grupo, su alto número de copia y sus capacidades conjugativas han hecho derivar vectores bastante versátiles y de gran utilidad en *Rhizobium*, una vez mejoradas sus dos principales desventajas: sitios de restricción limitados y marcadores de selección poco apropiados, como Sm y Su.

Quizás los más ampliamente utilizados son los de la serie pKT, derivados de RSF1010 (Bagdasarian *et al.*, 1981, 1982; Bagdasarian y Timmis, 1982), siendo el más usado pKT230, que ofrece múltiples sitios únicos de clonaje y marcadores como Sm y Km, además de ser el resultado de la fusión de dos replicones, pACYC177C y RSF1010. Existen asimismo cósmidos como pMMB33 y pMMB34 (13,75 Kb) que ofrecen como ventajas frente a pLAFR1 su mayor capacidad de clonaje (30-35 Kb) y la inhibición de la

formación de policósmidos en el proceso de clonaje sin defosforilar mediante la generación de brazos cósmicos (Frey *et al.*, 1983). Las propiedades de replicación y mantenimiento de amplio rango de hospedador de RSF1010 también han sido incorporadas a conocidos vectores de clonaje de *E. coli* para extender su rango de hospedador, resultando en la serie de vectores pSUP (vectores de clase II) (Prierer *et al.*, 1985).

3.1.3.- Vectores derivados del grupo IncW.

La construcción de vectores derivados de pSa se ha conseguido fácilmente mediante la recircularización del pequeño fragmento que contiene las funciones de replicación, consiguiéndose así el plásmido pGV1106 y diversos derivados (Leemans *et al.*, 1982). No obstante, al no poseer las funciones conjugativas quedan limitados en su uso. Para ello se han desarrollado sistemas binarios, mediante el clonaje en pBR322 de las funciones de transferencia, capaces de movilizar plásmidos como pSa151 o pSa727 a diversas bacterias entre las que se incluye *Rhizobium* (Tait *et al.*, 1983).

3.2.- Vectores de clonaje de uso específico.

En algunos casos no sólo basta con el simple clonaje de determinado gen, sino que se hace necesario el disponer de mecanismos que permitan el estudio de la expresión y regulación de los mismos, sobre todo cuando están sujetos a complejos circuitos reguladores como es el caso de los genes implicados en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Para ello se han desarrollado vectores que atienden fundamentalmente a dos objetivos, por un lado, mejorar la expresión del ADN clonado (vectores de expresión), y por otro, permitir la identificación de promotores (vectores sonda para promotores).

En el primero de los casos se coloca el gen a estudio bajo el control de un promotor conocido, generalmente de fuerte expresión, lo que permite su transcripción y posterior traducción, bien desde su extremo N o bien como una proteína de fusión. Alguno de los citados anteriormente se han usado como tales en la investigación con fijadores, como pKT230, con los promotores de Km o Sm (Rossen *et al.*, 1985; Kennedy y Robson, 1983; Better *et al.*, 1985), o pRK290, aprovechando el promotor de Tc (Ditta *et al.*, 1985). Pero lo normal es usar vectores contruídos a tal efecto mediante la inserción de promotores bien caracterizados como los de *trp*, *tac* o los promotores de lambda. Así se utiliza el

derivado de pRK290, pTE3, con el promotor de *trp* (Egelhoff y Long, 1985), los plásmidos pMMB22 y pMMB24 derivados de RSF1010 con el promotor de *tac* (fusión de la región -35 de *trp* y la -10 del promotor de *lacUV5*) (Bagdasarian *et al.*, 1983)) o el pKT240 con el promotor p_L del fago lambda. Todos ellos han sido o son potencialmente utilizables en una gran variedad de Gram negativas y por tanto en el estudio con Rhizobiaceae.

Los vectores que permiten la identificación de actividades de promotores facilitan el estudio de elementos controladores y la investigación de funciones reguladoras. Algunos de los vectores ya citados se han utilizado a tal efecto, así pSUP106 permite controlar la expresión de la región codificante de la Tc introduciendo promotores o elementos reguladores exógenos (Ronson *et al.*, 1987), o pKT230, utilizando el gen de la Km de la misma forma (Kennedy y Robson, 1983; Santero *et al.*, 1986).

Se han construido vectores específicos para este propósito a partir de plásmidos pertenecientes a los grupos IncP e IncQ con genes de resistencia a antibióticos desprovistos de sus promotores, o usando el operón *lac*. Derivados de RK2 son, por ejemplo, los vectores de fusión transcripcional pMK341 con el gen de Km sin promotor (Kahn y Timblin, 1984), y pGD499 y pGD500 basados en *lacZ* (Ditta *et al.*, 1985), o el de fusión traduccional pGD926 (Ditta *et al.*, 1985). Los derivados de RSF1010 han tenido como problema el uso del gen de la Sm sin promotor lo que algunas veces se ha mostrado problemático debido a la dificultad del ensayo que ofrece dicha resistencia. Por eso se ha desarrollado en los derivados de IncQ el sistema de ensayo de β -galactosidasa más versátil. Así los vectores de expresión pUI108 y pUI109 (Nano *et al.*, 1984) derivan del clonaje en RSF1010 del gen *lacZ* desprovisto de sus señales de transcripción y traducción.

Más recientemente se han utilizado nuevos genes informadores para la búsqueda de promotores en *Rhizobium*, como el *luc* procedente de la luciérnaga, (Palomares *et al.*, 1989; Cebolla *et al.*, 1992), o el *lux* (de Bruijn, comunicación personal). Así ha sido posible construir vectores de amplio espectro con fusiones traduccionales con promotores de *nifH*, *fixA* y *nifA* (pAC87, pAC88 y pAC48), que permiten una fácil identificación de actividades luminescentes a simple vista tanto en estado silvestre como en simbiosis y fácilmente fotografiable. Este método parece mucho más eficiente en ensayo que los tradicionalmente usados con *lacZ* (Cebolla *et al.*, 1992).

3.3.- Problemas en el uso de vectores.

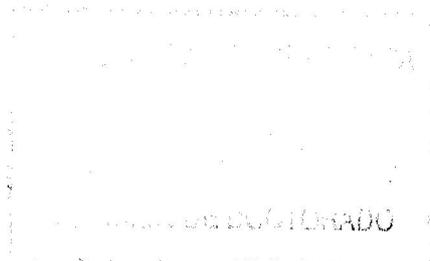
A pesar de la enorme utilidad demostrada por los distintos tipos de vectores expuestos no es menos cierto que en numerosas ocasiones existen efectos no deseables que muchas veces son difíciles de superar.

Uno de los inconvenientes más notables es la relativa baja estabilidad que, en algunos casos, muestran estos vectores. Si bien proceden de plásmidos de comprobada alta estabilidad, según se ha visto, su manipulación y reducción de tamaño conduce a la eliminación de regiones implicadas en el mantenimiento estable que se encuentran diseminadas a lo largo de todo el plásmido parental. Así, aunque pRK290 se muestra altamente estable en *E. coli* (pérdida menor al 1% por generación), no ocurre lo mismo en *R. meliloti* o en *Bradyrhizobium* (O'gara y Donnelly, 1985). Además, sus derivados se comportan incluso de una forma más inestable, como ocurre con pRK2501 (Schmidhauser *et al.*, 1983) o pRK404 (Ditta *et al.*, 1985). En el caso de los vectores derivados de IncQ se ha comprobado que aquellos que poseen fragmentos de pBR son inestables o de reducido rango de hospedador (Wood *et al.*, 1981), y que la eliminación de dicho fragmento aumenta la estabilidad (Sharpe, 1984; Simon y Priefer, 1990), lo que parece indicar incompatibilidades en las funciones de replicación de pBR e IncQ.

En otras ocasiones, la inestabilidad puede venir provocada por la eliminación de parte del genoma del vector o por la inserción de ADN exógeno (Meyer *et al.*, 1982). En definitiva, las causas de la inestabilidad pueden ser múltiples y varían de una especie a otra para un mismo plásmido. Es, por tanto, un efecto indeseable en el manejo de vectores que, no sólo puede significar su completa pérdida, sino también la generación de reordenamientos en la estructura del vector o del híbrido generado que, indudablemente, es muy problemático.

Otro efecto no deseado cuando se manejan vectores, es la presencia de marcadores de selección no adecuados. Es el caso de la Ap y el Cm en *Rhizobium*, donde la selección de sus fenotipos es bastante errática.

Por último, el efecto del número de copias introducido al usar vectores puede ser en ocasiones un inconveniente al estar aumentando la dosis génica del gen en estudio, especialmente cuando se trabaja con reguladores.



3.4. Utilización de vectores derivados de replicones de Rhizobiaceae.

Como se indicó en el apartado 2.2.3, los estudios efectuados sobre sistemas de replicación en Rhizobiaceae son escasos. El desarrollo de vectores exclusivos para este grupo, en un intento de superar los inconvenientes que poseen algunos de los expuestos anteriormente, y aprovechando las altas estabilidades que tienen, es algo que se ha investigado poco, pero que en algunos casos podría significar importantes mejoras.

En *Agrobacterium*, donde se han efectuado estudios más detallados, no se ha desarrollado una tecnología de vectores, aunque hay que hacer notar que las construcciones efectuadas para pTAR se han mostrado capaces de replicarse en *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* y cepas de *Rhizobium* (Gallie y Kado, 1987), lo que las hace potencialmente útiles para la construcción de vectores derivados.

En *Rhizobium* se han efectuado tímidos esfuerzos en este sentido y así Mozo *et al.*, (1990), han conseguido construir una serie de plásmidos híbridos que contienen el origen de replicación del plásmido pHc23a de *Rhizobium* sp. (*Hedysarum*) y un origen del tipo ColE1. Algunos de los plásmidos construídos (pTM51, pTM510, pTM511 o pTM512) han mostrados estabilidades comparables o superiores a las mostradas para derivados de RK2, que varían según el hospedador y según la construcción. Aunque no son capaces de replicarse en *E. coli*, se ha visto que se pueden mantener a diferentes tasas de estabilidad en cepas de *Rhizobium* sp. (*Hedysarum*), *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bvs. *phaseoli*, *trifolii* y *viceae*, *Rhizobium* sp. (*Cicer*) y *A. tumefaciens*. Sin embargo, su uso como vectores está limitado por la falta de sitios de clonaje.

3.5.- Sistemas alternativos de transferencia génica.

Muchos de los problemas que puede ofrecer la tecnología de vectores, tales como los derivados de los diferentes pasos en su construcción, o los efectos indeseables que algunas veces presentan, pueden ser soslayados usando sistemas alternativos de transferencia de información.

Uno de ellos consiste en la formación de cointegrados, en donde a partir de plásmidos recombinantes de pequeño rango de hospedador se llega a la formación de cointegrados con plásmidos de amplio espectro tales como RK2. Aunque el mecanismo íntimo no es bien conocido se piensa que puede estar mediatizado por la recombinación

entre zonas homólogas presentes en ambos. Esta técnica ha sido aplicada en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* y *R. loti* (Simon *et al.*, 1986; Lewin *et al.*, 1987). El cointegrado puede ser transferido y mantenido en *Rhizobium*, gracias a las propiedades conjugativas y de amplio espectro de RK2, y seleccionado mediante sus resistencias específicas.

Otro método alternativo es la incorporación de material genético en el genóma del hospedador, mediante recombinación homóloga entre el fragmento clonado en un determinado vector y el ADN del hospedador. Esto tiene como limitación la utilización del hospedador original u otros muy cercanos, al depender de la homología de ADN. Este sistema puede ser utilizado, además, aprovechando las ventajas ofrecidas por los transposones, usándolos como vectores de clonaje por inserción. La ventaja de esto último se ha probado de gran interés puesto que la integración del transposon que ocurre en diferentes sitios del cromosoma bacteriano, no depende de la homología de ADN y permite la introducción de construcciones genéticas y su mantenimiento de forma totalmente estable. Ha sido ya utilizada de diferentes formas en la ingeniería genética de varios organismos (Herrero *et al.*, 1990), entre los que se incluye *Rhizobium* (Acuña *et al.*, 1987; Hermesz *et al.*, 1992).

OBJETO DEL TRABAJO

Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium* forman simbiosis mutualistas con especies de la familia Leguminosae que conduce a la reducción del nitrógeno molecular a amonio directamente utilizable por la planta. Este proceso, conocido como fijación simbiótica de nitrógeno, presenta una alta significación agronómica y ecológica, por la importancia de las plantas implicadas y por hacer innecesario el uso de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente coste económico y deterioro ambiental.

El interés de este sistema fijador ha hecho que, considerando a la bacteria sola o más frecuentemente en relación con su correspondiente hospedador, sea objeto de estudio en numerosos laboratorios.

Aunque la investigación puramente académica o básica no ha faltado, casi siempre la posibilidad de mejorar la eficiencia de esta asociación simbiótica para conseguir una mayor productividad de los cultivos de leguminosas ha sido objetivo, más o menos velado, de los investigadores de diferentes grupos.

Los avances efectuados en este campo han sido considerables a la luz de los diferentes abordajes realizados: bioquímico, fisiológico, genético, etc. Sin embargo, es a través de las potentes herramientas ofrecidas por la biología molecular, cuando se ha conseguido un notable progreso en los conocimientos sobre los determinantes genéticos implicados en las sucesivas etapas del establecimiento de esta asociación simbiótica y, en particular los referentes al microsimbionte por su mayor simplicidad.

Así, desde finales de la década de los setenta se comienza a conocer que la mayor parte de los genes de *Rhizobium* relacionados, directa o indirectamente, con el reconocimiento, infección, nodulación, y fijación de nitrógeno se localizan en plásmidos de alto peso molecular, llamados simbióticos o pSym.

La presencia general de ADN extracromosómico en *Rhizobium*, que en algunos casos, como en *R. meliloti*, llega a suponer más de un tercio del genomio total, no se limita a los plásmidos simbióticos. Suele haber, en la mayoría de las cepas estudiadas, otros, denominados crípticos, de tamaño diferente y número variable.

En ningún caso, como ocurre en la mayoría de las bacterias, la presencia de cualquiera de los plásmidos es vital para la célula. Sólo determinan, aparentemente, una mejor adaptación a las condiciones ambientales y su pérdida sólo supone la desaparición

del fenotipo que llevan ligado. Sin embargo, la estabilidad que suelen mostrar a pesar de su dispensabilidad, hace pensar en la existencia de un mecanismo de regulación estrechamente controlado que los mantiene en la célula a pesar de la carga metabólica que ello supone.

La cepa GR4 de *R. meliloti*, que forma simbiosis con alfalfa (*Medicago sativa* L.), lleva, además de los dos plásmidos simbióticos, otros dos, de 115 Md (175 kb) y 140 Md (205 kb), conocidos como pRmeGR4a y pRmeGR4b, respectivamente. Estos plásmidos han estado hasta ahora entre los llamados crípticos aunque, recientemente, han sido localizados en pRmeGR4b genes relacionados con la competitividad.

El objetivo que ha perseguido este trabajo ha sido doble. Por una parte, y en un aspecto básico, el estudio de las posibles características fenotípicas que puedan ser atribuidas a estos plásmidos y que puedan conferir ventajas adaptativas. Se ha incluido en este aspecto el estudio de los mecanismos implicados en su alta estabilidad intentando hacer, por primera vez, una caracterización detallada de las regiones implicadas en estabilidad y mantenimiento de plásmidos de *Rhizobium*. Por otra, y en una vertiente más práctica, la construcción de vectores de clonaje que, a imitación de lo que ocurre con otras especies bacterianas, permita la transferencia a *Rhizobium* en forma estable, de genes que proporcionen mejores propiedades con vistas a la futura preparación de inóculos que incrementen la productividad de las leguminosas.

MATERIAL Y METODOS

1.- Razas bacterianas y plásmidos.

Las diferentes cepas de *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Escherichia coli* y los plásmidos utilizados en el desarrollo de este trabajo se recogen en la Tabla 1, así como sus características mas relevantes.

2.- Medios de cultivo y de conservación.

2.1 Medios para Rhizobiaceae.

Como medio base para la conservación de *Rhizobium* en el laboratorio ha sido utilizado el medio 79 de Allen (1951):

| | |
|--------------------------------------|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,6 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g |
| CaCO ₃ | 1,0 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 0,2 g |
| Manitol | 7,6 g |
| Glucosa | 2,4 g |
| Extracto de levadura (DIFCO) | 0,7 g |
| Agua (desionizada) | 1000 ml |
| Agar (PANREAC) | 15 g |

El pH se ajusta a 7,0-7,2 y se esteriliza a 115°C durante 30 minutos.

Para el crecimiento rutinario de *Rhizobium* y *Agrobacterium* se ha utilizado el medio TY.

| | |
|--------------------------------------|---------|
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,9 g |
| Triptona (DIFCO) | 5 g |
| Extracto de levadura (DIFCO) | 3 g |
| Agua (desionizada) | 1000 ml |
| Agar (PANREAC)(medio sólido) | 15 g |

Se esteriliza a 115°C durante 30 minutos.

TABLA 1. Bacterias y plásmidos

| Bacteria o plásmidos | Características relevantes | Fuente o referencia |
|--|--|-------------------------------------|
| Bacteria | | |
| <i>Rhizobium meliloti</i> | | |
| GR4 | Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺ | Casadesús y Olivares (1979) |
| GRM6 | Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4b | Este trabajo |
| GRM8 | Cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b | Este trabajo |
| GRM10 | Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4a | Este trabajo |
| GRM8SR | Cepa derivada GRM8, Sm ^r Rif ^r | Este trabajo |
| L5.30 | Cepa silvestre, Nod ⁺ Fix ⁺ | M.Kowalski |
| 41 | Cepa silvestre, Nod ⁺ Fix ⁺ | A.Kondorosi |
| 102F34 | Cepa silvestre, Nod ⁺ Fix ⁺ | G.Ditta |
| 2011 | Cepa derivada de SU47; Sm ^r | J.Denarié |
| 1354 | Cepa derivada de 2011 <i>nifA</i> ::Tn5 Fix ⁻ Sm ^r Km ^r | Szeto <i>et al.</i> , (1984) |
| 1681 | Cepa derivada de 2011 <i>ntrA2</i> ::Tn5 Fix ⁻ Sm ^r Km ^r | Ronson <i>et al.</i> , (1987) |
| 5002 | Cepa derivada de 2011 <i>ntrC</i> ::Tn5 Sm ^r Km ^r | Szeto <i>et al.</i> , (1984) |
| GMI5704 | Cepa derivada de 2011 <i>fixJ</i> ::Tn5 Sm ^r Km ^r Bleo ^r | David <i>et al.</i> , (1988) |
| GMI5705 | Cepa derivada de 2011 <i>fixL</i> ::Tn5 Sm ^r Km ^r Bleo ^r | David <i>et al.</i> , (1988) |
| GMI5630 | Cepa derivada de 2011 <i>recA</i> ::Tn5-233 <i>fixK</i> ::Tn5 Rif ^r Sm ^r Nm ^r Gm ^r Spc ^r Bleo ^r | Batut <i>et al.</i> , (1989) |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> RS1051 | Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺ | J.E.Ruíz-Saínz |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> CNF42 | Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺ | J.E.Ruíz-Saínz |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> VF39 | Cepa silvestre, Nod ⁺ Fix ⁺ | Hynes <i>et al.</i> , (1988) |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GMI9023 | Cepa curada de plásmidos Sm ^r Rif ^r | J.E.Ruíz-Saínz |
| <i>Escherichia coli</i> S17-1 | <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4- 2-Tc::Mu-Km::Tn7, Tp ^r , Sm ^r | Simon <i>et al.</i> , (1983) |
| HB101 | <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>endA</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , Sm ^r | Boyer y Roulland- Dussoix (1969) |
| DH5α | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , ϕ 80d, <i>lacZ</i> , <i>dml5</i> | BRL |
| C2110 | <i>polA</i> , Nal ^r | Stachel <i>et al.</i> , (1985) |
| 5K | <i>res</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>tonA</i> , <i>supE</i> | R.L.Robson |
| Plásmidos | | |
| pRmeGR4a | Plásmido no simbiótico de la cepa GR4 de 115 MDa | Toro y Olivares (1986) |
| pRmeGR4b | Plásmido no simbiótico de la cepa GR4 de 140 MDa, <i>nfe</i> | Toro y Olivares (1986) |

Material y Métodos

| | | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| pRK2013 | Derivado de RK2 Km ^r | Figurski y Helinski (1979) |
| pNTH5 | Plásmido pRmNT40 con inserción de Tn3-HoHo | Este laboratorio |
| pCK3 | pRK290 con <i>nifA</i> de <i>K. pneumoniae</i> Sm ^r Km ^r | C.Kennedy |
| pCK1 | Derivado de pKT230 con el gen <i>nifA</i> de <i>K. pneumoniae</i> Sm ^r Km ^r | C.Kennedy |
| pRmW54-10 | pACYC177-C con el gen <i>nifA</i> de <i>R. meliloti</i> , Ap ^r | Weber <i>et al.</i> , (1985) |
| pRR54 | Mini-RK2, <i>bla</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZα</i> con el locus <i>mrs/par</i> de 3.2 kb de RK2 | R.Roberts |
| pTJS81 | pUC7 con 760 pb de la región <i>oriT</i> de RK2 | D.R. Helinski |
| pSUP5011 | pBR325::Tn5- <i>mob</i> Km ^r Cm ^r | Simon (1984) |
| pSUP202 | pBR325:: <i>mob</i> Tc ^r Cm ^r Ap ^r | Simon <i>et al.</i> , (1983) |
| pBR322 | Vector de clonaje Ap ^r Tc ^r | Bolívar <i>et al.</i> , (1977) |
| pUC18 | Vector de clonaje y secuenciación Ap ^r | Yanish-Perron <i>et al.</i> , (1985) |
| pUC4K | Fuente del gen <i>nptI</i> presente en el transposón Tn903 | Viera y Messing (1982) |
| pBluescriptI(KS(+/-)) | Vector de clonaje, expresión y secuenciación Ap ^r | Stratagene |
| pJM100 | pSUP202 con el <i>oriV</i> de pRmeGR4a | Este trabajo |
| pJM200 | pUC18 con <i>oriT</i> pSUP5011 | Este trabajo |
| pJM300 | Derivado de pBR322 con el <i>oriT</i> de RK2 clonado como un fragmento <i>EcoRI-PstI</i> | Este trabajo |
| pJM400/400R | pJM300 con el <i>oriV</i> de pRmeGR4a clonado en las dos orientaciones | Este trabajo |
| pJM401 | pJM400 con el gen <i>lacZα</i> de pUC19 | Este trabajo |
| pJM4011 | pJM401 con el locus <i>mrs/par</i> de RK2 clonado como un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> | Este trabajo |
| pJMB10/15 | pBluescript con el <i>oriV</i> de pRmeGR4a clonado como un fragmento <i>PstI</i> en las dos orientaciones | Este trabajo |
| pJMB20/25 | Derivados de pJMB10/15 con un fragmento <i>EcoRI</i> de 760 pb que contiene el <i>oriT</i> de RK2 | Este trabajo |
| pJMB40/45 | Derivados de pJMB20/25 con el fragmento <i>SaII</i> de 1430 bp que contiene el gen <i>nptI</i> de Tn903 | Este trabajo |
| pRmNT111 | pRK290 con 28 kb del plásmido pRmeGR4b, Tc ^r Mel ^r | Este laboratorio |
| pME100 | pUC18 con un fragmento <i>PstI</i> de 3,5 kb de pRmeGR4b que contiene el gen productor de tirosinasa | Este trabajo |
| pFG105 | pUC18 con el mismo fragmento anterior clonado en sentido contrario | Este trabajo |

El medio mínimo utilizado para *Rhizobium* es el de Robertsen *et al.*, (1981)

| | | |
|---|--------|----|
| K ₂ HPO ₄ | 0,3 | g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 | g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,15 | g |
| CaCl ₂ | 0,05 | g |
| FeCl ₃ | 0,006 | g |
| NaCl | 0,05 | g |
| KNO ₃ | 0,6 | g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,4 | g |
| Manitol | 10 | g |
| Biotina | 0,0002 | g |
| Tiamina | 0,0001 | g |
| Pantotenato de calcio | 0,0001 | g |
| Agua (desionizada) | 1000 | ml |
| Agar purificado (BBL) | 15g | |

El pH se ajusta a 6,8-7.0 y se esteriliza según las condiciones ya indicadas.

La temperatura de incubación para *Rhizobium* y *Agrobacterium* ha sido de 28°C.

2.2.- Medios para *E. coli*.

Como medio de cultivo rutinario de las cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio

LB:

| | | |
|-------------------------------|------|----|
| NaCl | 5 | g |
| Triptona (DIFCO) | 10 | g |
| Extracto de levadura (DIFCO) | 5 | g |
| Agua (desionizada) | 1000 | ml |
| Agar (PANREAC) (medio sólido) | 15 | g |

Como medio mínimo se ha usado el medio NFDM (Cannon *et al.* 1974):

| | |
|---|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 12,06 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3,4 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 g |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,025 g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,025 g |
| Glucosa | 20 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,5 g |
| Agua (desionizada) | 1000 ml |

La adición de los aminoácidos y vitaminas necesarias se realizó a partir de soluciones preparadas y esterilizadas individualmente por filtración.

Igualmente los medios se esterizaron a 115°C durante 30 minutos.

La temperatura de incubación para *E. coli* ha sido de 30° o 37°C según cepas y casos.

2.3.- Medios de conservación.

Para la conservación prolongada de cepas se utilizaron criotubos que contenían cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Los criotubos se congelan rápidamente y se almacenan a una temperatura de -70°C, siendo viables durante varios años.

3.- Antibióticos.

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o agua-etanol al 50% y esterilizadas a través de unidades de filtración Minisart^R NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. Las concentraciones de trabajo fueron las siguientes (mg/l): Tetraciclina (Tc, SIGMA), 10; Kanamicina, sulfato (Km, BOEHRINGER), 50 para *E. coli* y 180 para *Rhizobium* y *Agrobacterium*; estreptomycin sulfato (Sm, CEPA), 50 para *E. coli* y 375 para Rhizobiaceae; ampicilina (Ap, SIGMA), 200; cloranfenicol (Cm, SIGMA), 100; rifampicina (Rif, SIGMA), 20.

4.- Selección de mutantes resistentes a antibióticos.

Para la selección de cepas de *Rhizobium* mutantes espontáneas resistentes a antibióticos se inocularon 0,1 ml de una suspensión densa de bacterias (10^{10} cel/ml) en placas petri con medio TY adicionado del correspondiente antibiótico, y se incubaron a 28°C durante 4-6 días. La frecuencia de aparición de mutantes espontáneos varía entre 10^{-7} y 10^{-9} según el antibiótico.

5.- Ensayos con planta.

5.1.- Planta.

La planta usada en todos los ensayos fue *Medicago sativa* L. (alfalfa), ecotipo Aragón.

5.2.- Solución nutritiva.

Para los cultivos hidropónicos de alfalfa se ha utilizado la solución de Rigaud y Puppo (1975).

| | |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 0,2 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,2 g |
| KCl | 0,2 g |
| CaSO_4 | 0,12 g |
| EDTA FeNa_2 | 0,025 g |
| Na_2MoO_4 | 0,004 g |
| Agua (desionizada) | 1000 ml |

Microelementos

| | |
|---|---------|
| H_3BO_3 | 0,018 g |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,020 g |
| ZnSO_4 | 0,030 g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,002 g |

El pH se ajusta a 7,0 y se esteriliza a 115°C durante 30 min.

5.3.- Esterilización y germinación de semillas de alfalfa.

Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2,5% de HgCl₂ durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5-6 veces con H₂O estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h. Posteriormente se extendieron en condiciones asépticas, sobre papel de filtro humedecido con H₂O colocado en placas petri, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C durante 24-48 h.

5.4.- Cultivo axénico de plantas de alfalfa.

Se ha seguido la técnica descrita por Olivares *et al.*, (1980). Cuando las plántulas de alfalfa han alcanzado 1-2 cm de longitud, se colocan en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubren en su mitad inferior con papel opaco y se llevan a una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25°C/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

5.5.- Ensayos de nodulación y fijación.

Para comprobar las capacidades infectivas tanto de las cepas obtenidas por curación, así como de las cepas portadoras de los plásmidos a estudio, se inocularon tubos con plantas de alfalfa, preparados como se indica en el apartado anterior, con 0,1 ml de un cultivo de 24 h a una concentración de 10⁸ células/ml. Transcurridos unos 15 días se efectúan recuentos del número de nódulos obtenidos.

Para conocer la efectividad de la simbiosis se ha realizado la medida de la actividad nitrogenasa por la técnica de reducción de acetileno a etileno (Hardy *et al.*, 1968) siguiendo la metodología empleada por Bedmar y Olivares (1980). La determinación de la producción de etileno se lleva a cabo utilizando un cromatógrafo Perkin Elmer F33 provisto de una columna de alúmina activada de 30 cm de longitud, con una temperatura de trabajo de 115°C y un flujo de nitrógeno de 30 ml/min.

6.- Métodos de conjugación.

6.1.- Cruces simples.

Se realizaron por mezcla de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del donador con otro en fase exponencial tardía del receptor, habitualmente en la proporción 1:1. Donador y receptor se centrifugaron en un tubo de microfuga y resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo (50-200 μ l). La mezcla se deposita sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 μ m de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de TY-agar, y se incuba durante 16-24 h. a 28°C. Transcurrido este tiempo se resuspende la mezcla de conjugación en medio estéril y se efectúan las correspondientes diluciones, sembrándolas sobre placas con los medios adicionados de los antibióticos apropiados.

Alternativamente se han hecho mezclas de donador y receptor sobre medio TY-agar o en un tubo de microfuga con una pequeña cantidad de medio líquido (50 μ l). Después de incubar el tiempo antes indicado, se sembraron porciones de la mezcla sobre medios adicionados de los correspondientes antibióticos.

Este tipo de cruces se efectuaron para la transferencia de plásmidos autotransmisibles, para la mutagénesis por transposición de GR4 (búsqueda de mutantes Mel) o para hacer movilizable los pRmes de las cepas GRM6 y GRM10 mediante el transposón Tn5-*mob*, tal y como describe Simon (1984). En este último caso se usó la cepa movilizadora de *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983), y como vector "suicida" portador del transposón el plásmido pSUP5011 (Simon *et al.*, 1984).

6.2.- Cruces triparentales.

La transferencia de plásmidos no autotransmisibles que contienen el *oriT* del plásmido RK2 desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a Rhizobiaceae se realizó según el modelo de cruce tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). La metodología seguida es idéntica a la de los cruces biparentales, pero en estos casos se efectuaron mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones que habitualmente fueron 1:1:1.

7.- Electroforesis de ADN.

7.1.- Separación e identificación de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa.

Para la identificación de plásmidos presentes en las cepas estudiadas se ha seguido el método de Eckhardt (1978) modificado por Rosenberg *et al.*, (1982).

Se toman 10^7 - 10^8 células de un cultivo líquido de la cepa a estudiar, se recogen y lavan con 0,2 ml de una solución de N-lauril sarcosina (SIGMA) al 0.1% en tampón TE8 (Tris 50mM, EDTANa₂ 20mM, pH 8,0). Posteriormente se resuspenden en 40 µl de solución de lisozima (lisozima 1mg/ml (SIGMA), RNasa I 100 µg/ml (BOEHRINGER), 0,05% azul de bromofenol (SIGMA) y ficoll (SIGMA) al 20% en tampón TBE) y se transfieren rápidamente a un pocillo de un gel de agarosa (SIGMA tipo I) vertical al 0,7% en TBE (Tris 89mM, EDTANa₂ 2,5mM, BO₃H₂ 89mM, pH 8,2). Transcurridos 10-15 min. la lisis se completa mediante la adición de 40 µl de una solución de ficoll al 10% y SDS (BOEHRINGER) al 0,2% en TBE; finalmente se añaden, con cuidado para no formar turbulencias, 100 µl de una solución de ficoll al 5% y SDS al 0,2% en TBE. Los pocillos se sellan con agarosa al 0,7% y la electroforesis se lleva a cabo durante 1 h a 10 mA y 3 h a 40 mA en TBE. Como controles se usaron cepas de perfil plasmídico conocido.

7.2.- Separación e identificación de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (SIGMA tipo I) al 0,7% sumergidos en TBE. El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V. Como solución de carga se ha utilizado sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5µl solución de ADN/1µl solución de carga.

7.3.- Revelado de geles y fotografía.

Los geles de agarosa se revelan sumergiéndolos en agua a la que previamente se añaden unas gotas de solución de bromuro de etidio (1 mg/ml), durante 15-20 min. Posteriormente se observan con luz ultravioleta de 260 nm en un transiluminador.

En algunas ocasiones el colorante se ha incorporado al gel para seguir la marcha del proceso.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara NIKON FE2 y película Kodak Tri X-PAN de 400 ASA o, alternativamente, con cámara POLAROID MP-4 y película POLAROID tipo 667, siempre con filtro rojo. .

7.4.- Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

La determinación del tamaño de fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa (distancia de migración dividida por la longitud del gel), utilizando como patrones los marcadores de peso molecular de tipo II (fragmentos de ADN de fago lambda digeridos con la endonucleasa *HindIII*) o tipo III (fragmentos de ADN de fago lambda digeridos con las endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*), ambos de BOEHRINGER.

7.5.- Purificación de fragmentos de restricción por transferencia desde geles de agarosa a membranas de DEAE-celulosa.

Cuando fue necesaria la obtención de fragmentos de restricción puros para ser usados como sonda en experimentos de hibridación o para ser clonados, se siguió el método de unión a papel DEAE-celulosa NA45 (SCHLEICHER & SCHUELL) descrito en Sambrook *et al.* (1989).

Después de efectuar la electroforesis en gel de agarosa y de la correspondiente tinción con bromuro de etidio, se visualizan las bandas con lámpara UV de 360 nm, y se hace un corte profundo con escalpelo inmediatamente delante de la banda deseada. En él se introduce la membrana de DEAE-celulosa previamente tratada. Para ello se mantiene durante varias horas en una solución de NaCl 1,5M y después de lavar varias veces con H₂O se conservan en una solución de EDTANa₂ 1mM durante varias semanas a 4°C. Inmediatamente antes de ser usadas se equilibran en tampón de electroforesis TBE durante al menos 20 min. Se vuelve a reanudar la electroforesis, con cuidado de no sumergir el gel, durante un tiempo suficiente para permitir la adhesión del ADN a la membrana. Posteriormente se introduce la membrana en un tubo de microfuga con la cara que contiene

el ADN hacia la luz del tubo, se añaden 300 µl de tampón de elución (NaCl 1M, Tris-ClH pH 8,0, EDTANa₂ 0,1mM) e incuba durante una hora a 65-68°C, agitando de vez en cuando. Una vez comprobado que el ADN se ha eluído mediante observación de la membrana a luz UV, se precipita el ADN mediante adición de 2,5 volúmenes de etanol 100% a -20°C durante varias horas, prosiguiendo tal y como se indica en el apartado 10.4.

8.- Manipulación enzimática de ADN.

8.1.- Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión de ADN se ha llevado a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón recomendadas por los fabricantes (BOEHRINGER y PROMEGA).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón. En caso contrario, y siempre que fuera factible, se digirió primero con la enzima que requiriese el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando no fue posible, se llevó a cabo la digestión con una enzima, se trató con una solución de fenol:cloroformo (1:1)(el cloroformo es isoamílico:cloroformo 1:24, preparado todo según se describe en Sambrook *et al.*, 1989) y se precipitó el ADN, resuspendiéndolo en el tampón adecuado para la segunda enzima y llevando a cabo la digestión con esta última.

8.2.- Relleno de extremos 3' de fragmentos de restricción.

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 5' protuberantes se procedió al relleno del extremo 3' mediante el uso del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (BOEHRINGER). Se siguieron las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989), añadiendo a la digestión (20 µl) 1 µl de una solución de dNTPs (1mM) y una unidad de Klenow por microgramo de ADN, dejando incubar durante unos 15 min a temperatura ambiente.

8.3.- Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción.

En el caso de que la digestión de ADN produjese fragmentos con extremos 3' protuberantes, la eliminación de los mismos se efectuó igualmente siguiendo las instrucciones de Sambrook *et al.* (1989). Al volumen de digestión se añade 2 μ l de una solución de dNTPs (2mM) y 1-2 unidades de ADN polimerasa de bacteriófago T4 (BOEHRINGER) por microgramo de ADN presente en la reacción, incubando durante 15 min a 12°C. Para la actividad óptima de la enzima se necesita una concentración final 5mM de MgCl₂.

8.4.- Ligación de fragmentos de restricción.

Las reacciones de ligación se efectuaron usando unas relaciones molares vector:inserto variables dependiendo del tamaño de los fragmentos, o de si se trataba de la ligación de extremos cohesivos o romos. En cualquier caso, el volumen final de reacción fue habitualmente de 20 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima T4 DNA ligasa (BOEHRINGER) y en el tampón indicado por los fabricantes, incubando 3-4 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante una noche a 12°C. Cuando se trataba de la ligación de extremos romos, se adicionó en algunos casos PEG a una concentración final del 5%.

8.5.- Creación de mutación por cambio de fase de lectura.

Para la introducción de una mutación por cambio de fase de lectura en la zona codificante de la proteína RepC, se aprovechó la existencia de un único sitio de corte *Mlu*I en todo el fragmento. Esta enzima corta en la secuencia A'CGCGT, generando un extremo cohesivo 5' protuberante de 4 bases, que tras ser rellenado con el fragmento Klenow tal y como se indicó en el apartado 8.2, y sometido a ligación de los extremos romos obtenidos (apartado 8.4) se genera un nuevo fragmento con 4 pb adicionales, y que por lo tanto ha cambiado de fase de lectura.

9.- Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*.

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974).

Partiendo de un cultivo iniciador de la cepa de *E. coli* a transformar se inocula un matraz de medio LB y se incuba en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanza una DO_{600} de 0,6. Tras dejar enfriar en hielo se centrifuga a 10000 rpm 5 min a 4°C. Las células se resuspenden en 1/2 volumen de una solución de $CaCl_2$ 0,1M frío y se mantienen en hielo al menos 30 min. Posteriormente se recogen las células por centrifugación a 5000 rpm 5 min a 4°C, y se vuelven a resuspender en 1/10 del volumen original en $CaCl_2$ 0,1M. Las células se conservan así a 4°C durante no más de una semana. Alternativamente se pueden resuspender en la misma solución adicionada de glicerol al 20% y repartir en alícuotas de 200µl en tubos de microfuga preenfriados. Se congelan rápidamente y se conservan a -70°C. La competencia de las células se mantiene de esta forma durante varios meses.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983) modificada. A alícuotas de 200µl de células competentes se le añade ADN (0,05-0,5µg) y la mezcla se deja en hielo 30 min. Posteriormente se le somete a un choque de calor (5 min a 37°C). Se deja 5 min en hielo, y se le añade 1 ml de LB, incubándose a 37°C durante al menos 60 min. Transcurrido este tiempo se siembran alícuotas de 0,1 ml en placas de LB adicionado del correspondiente antibiótico.

10.- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.

10.1.- Aislamiento de plásmidos de peso molecular alto.

Para el aislamiento de los plásmidos no simbióticos de la cepa GR4 se ha seguido la técnica de Jouanin *et al.* (1981) a partir de las razas GRM6 y GRM10.

Partiendo de un cultivo iniciador se inoculan (1:100) matraces de TY y se incuban en agitación a 28°C durante 24h. Transcurrido ese tiempo, las bacterias se recogen y se lavan con una solución de N-lauril sarcosina en tampón TE8. Tras un nuevo lavado con tampón TE8, las células son resuspendidas en dicho tampón (1,5g de células en 85 ml). La lisis celular se efectúa añadiendo 5ml de una solución de lauril sulfato sódico (SDS) al

20% en TE8 y 10ml de Pronasa (BOEHRINGER) (4mg/ml en TE8, predigerida a 37°C 90 min). La mezcla se incuba durante 2h a 37°C. Posteriormente se eleva lentamente el pH del lisado hasta 12,45 por adición de NaOH 3M y se deja en reposo 20-30 min. Seguidamente se neutraliza por adición lenta de Tris 2M pH 7,0, hasta alcanzar un pH 8,5. Se deja reposar durante 15 min en hielo y se añade progresivamente una solución de NaCl 5M hasta una concentración final de 1M. Después de una hora en hielo, los restos de proteína y agregados de ADN cromosómico se separan por centrifugación a 8000 rpm durante 30 min en rotor GSA. Se recoge el sobrenadante y se precipita con polietilenglicol (PEG 6000) a una concentración final del 10% durante una noche a 0°C. El ADN plasmídico se recoge centrifugando a 5000 rpm durante 10 min y tras secar lo máximo posible se disuelve en tampón TE8 para su purificación en gradiente de cloruro de cesio.

10.2.- Aislamiento a gran escala de plásmidos de peso molecular bajo.

Para el aislamiento a gran escala de plásmidos recombinantes se ha utilizado el procedimiento de lisis alcalina indicado en Sambrook *et al.* (1989) a partir de Birboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981).

Se inocula un matraz de medio LB a partir de un cultivo iniciador (1 ml/100 ml). Tras incubar en agitación a 37°C durante una noche, las células se recogen por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min en rotor GSA. Cada 250 ml de cultivo es resuspendido en 25 ml de solución I (glucosa 50mM, Tris-ClH 25 mM pH 8,0, EDTANa₂ 10mM) a la que se ha añadido inmediatamente antes de usar 5 mg/ml de lisozima. Posteriormente se añaden 50 ml de Sol II (NaOH 0,2N, SDS 1%), recién preparada y se mezcla, dejando 5 min en hielo o hasta observar la aparición de un lisado completo. Transcurrido ese tiempo se añaden 37 ml de solución III (para 100ml de solución: 60 ml acetato potásico 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de H₂O), mezclándose por inversión y dejando en hielo durante 30 min. Para finalizar se centrifuga a 6000 rpm durante 20 min a 4°C, y se pasa a un nuevo tubo filtrando el sobrenadante mediante una gasa estéril. Se añade un volumen igual de isopropanol, mezclando bien y dejando a -20°C al menos 20 min. El ADN plasmídico se recoge centrifugando 30 min a 6000rpm, y se deja secar lo máximo posible al vacío. Posteriormente se resuspende en tampón TE8 y se procede a su purificación en gradiente de cloruro de cesio.

