

~~T. 1500 - 21/89~~

3/86

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO Y EVALUACION DE LA TRANSFERENCIA GENETICA  
HORIZONTAL EN BACTERIAS DEL GENERO *Rhizobium*

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Fac. de Ciencias  
Fecha 19-11-97  
ENTRADA NUM. 4341

BIBLIOTECA DE CIENCIAS  
GRANADA  
N.º Documento 613379550  
N.º copia 15448411

José Antonio Herrera Cervera

TESIS DOCTORAL

1997



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO Y EVALUACION DE LA TRANSFERENCIA GENETICA  
HORIZONTAL EN BACTERIAS DEL GENERO *Rhizobium*

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas

D. José Antonio Herrera Cervera

para aspirar al grado de Doctor



Fdo: José Antonio Herrera Cervera

VºBº

El Director



Fdo: Juan Sanjuan Pinilla

Doctor en Ciencias Biológicas

Colaborador Científico del C.S.I.C.



Esta Memoria Doctoral ha sido realizada en el  
Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas  
Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín  
(C.S.I.C.) Granada, durante los años 1993-1997.



A Maria Jose

A mis padres

A mis hermanos

¡Y llegó la hora!. Cuando se comienza a escribir esta página es cuando uno realmente se da cuenta de que la cosa se termina y que es hora de recapitular sobre todo lo que ha ocurrido durante esta etapa tan dura, a veces, y tan gratificante casi siempre (al menos en mi experiencia). Me resulta bastante difícil expresar con palabras lo que verdaderamente siento por aquellas personas que han tenido algo que ver en la realización de este trabajo, ¡pero tengo que intentarlo!.

Al Doctor Juan Sanjuan, que ha desarrollado una magnífica labor de dirección en esta tesis, quiero agradecerle su dedicación, casi exclusiva, su constante ánimo y apoyo, porque siempre hay momentos difíciles, sus siempre buenos consejos, que han guiado este trabajo a buen puerto, pero sobre todo la absoluta confianza y amistad que me ha mostrado, lo cual dice mucho sobre su gran calidad humana y, también, por el tiempo que ha dedicado a la edición de este trabajo. Creo que juntos hemos formado un buen equipo.

Por supuesto también tengo que agradecer a Don José Olivares, nuestro "becario distinguido", la confianza que tuvo en mí para trabajar en su equipo y desarrollar el proyecto del cual ha salido esta tesis. Trabajar junto a él ha sido una experiencia enriquecedora. De él he aprendido que la grandeza de las personas no reside en sus hechos, sino en la humildad con que los realizan. ¡Pronto podré llamarte Pepe!.

A la Doctora Maria José Lorite, porque todos los motivos de agradecimiento son pocos cuando hay algo más que amistad, sin ella me hubiera resultado imposible realizar este trabajo. Por su buen carácter, por su constante apoyo y ¡Dios mio! por el montón de horas que le han llevado algunas de las figuras de esta tesis. Mil gracias.

Al Doctor Eulogio Bedmar, por ser la primera persona que me abrió las puertas del "Zaidín", por su buen humor (y por sus chistes, no siempre buenos), por su amistad, y por estar siempre disponible cuando le he necesitado.

A la Doctora Carmen LLuch que tan amable y eficazmente ha llevado la tutoría de esta tesis.

Al Doctor Hans-Volker Tichy y a Birgit Jäger, por acogerme en su laboratorio en el TÜV Südwest en Friburgo (Alemania) y enseñarme las técnicas moleculares de caracterización de aislados bacterianos. A los Dres. Noelle Amarger (Dijon, Francia), Esperanza Martínez y Jesús Caballero (Cuernavaca, México), por su inestimable ayuda en la caracterización de cepas bacterianas.

A Julio Sanjuan, por su dedicación absoluta cuando le he necesitado, sobre todo al final de esta tesis. A Socorro Muñoz por ese genio incontrolado que tan buenos ratos me ha hecho pasar y por su ayuda técnica. Y a Jose Antonio Acevedo por tener todo el material siempre preparado y por ayudarme cuando le he necesitado. A vosotros tres, gracias por vuestra amistad.

A Quina, por el interés que ha demostrado en este trabajo y a Ewa, recién incorporada al grupo.

A Leo, Soco Mesa, Maria Jesús y Chang-ai, por los buenos momentos que hemos pasado.

A Pepe, Karim y Nuria, por las agradables sobremesas que he compartido con ellos.

A Inma y Jesús, Antonio y M<sup>a</sup> Angeles, Pepe y M<sup>a</sup> Carmen, por el interés que me han demostrado en este trabajo y porque gracias a ellos he disfrutado de otras cosas además del trabajo.

A Pieter y M<sup>a</sup> José, por su amistad y por las cervezas que hemos compartido.

A mis compañeros de departamento, Juan Antonio, Julia, Ikram, Toñi, Sanae, Fernando, Pablo, Mariam, Coral, M<sup>a</sup> José, Javi, Estefania, Conchi, Charo y José Miguel, porque todos habéis puesto vuestro granito de arena.

A Israel y M<sup>a</sup> Carmen, aunque ya no están en el laboratorio, por la ayuda que me prestaron en este trabajo.

A los que os fuísteis para continuar vuestra carrera, Carmina, Natalia y José Ignacio, ¡ojalá volvámos a trabajar juntos!

A M<sup>a</sup> Angeles Ramos, por su simpatía y apoyo en todo momento.

A Mónica Olivares, por el latazo que le he dado con los oligos y mis dichosos clones de secuenciación (en lo del latazo tu padre también ha tenido mucho que ver). Gracias

A Antonio Lario y Antonio Mérida por convertir la secuenciación en un trabajo de rutina.

A la Doctora Esther Viseras, porque me ha demostrado su amistad a pesar de todo y porque ha estado preocupada en todo momento por la realización de la tesis.

A mis padres y a mis hermanos, porque siempre han apoyado todas mis decisiones y porque sé lo orgullosos que están de mí. Sin vosotros nunca lo hubiera conseguido.

A todos vosotros, gracias.

*INDICE*

---

---

INTRODUCCION .....	1
<b>I. TRANSFERENCIA GENETICA HORIZONTAL EN BACTERIAS .....</b>	<b>3</b>
<b>1. TRANSFERENCIA GENETICA MEDIADA POR TRANSFORMACION NATURAL.....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>Transformación natural en bacterias gram positivas.....</i>	8
1.2. <i>Transformación natural en bacterias gram negativas.....</i>	9
<b>2. TRANSFERENCIA GENETICA MEDIADA POR BACTERIOFAGOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3. TRANSFERENCIA GENETICA MEDIADA POR CONJUGACIÓN.....</b>	<b>14</b>
3.1. <i>Organización genética de la región que determina la transferencia del plásmido F y sus relacionado .....</i>	15
3.1.1. Organización y regulación de los genes de transferencia.....	16
3.1.2. ¿Como se forman los pili?.....	20
3.1.3. Genes requeridos para la estabilización de los agregados de conjugación .....	21
3.1.4. Exclusión superficial.....	22
3.1.5. Procesamiento, corte, desplazamiento y transporte del ADN durante el proceso de conjugación. ....	22
3.1.6. Terminación de la transferencia.....	28
3.1.7. Genes de función desconocida.....	28
3.1.8. Síntesis de ADN conjugativo.....	29
3.2. <i>Conjugación en bacterias gram-positivas .....</i>	30
3.2.1. Feromonas sexuales en el género Enterococcus.....	31
3.2.2. Plásmidos de amplio rango de hospedador en	

gram-positivas.....	34
3.2.3. Transposones conjugativos.....	35
3.2.3.1. Mecanismos de transposición.....	36
<b>4. OTROS ELEMENTOS GENETICOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. MOVILIZACION DE CROMOSOMAS Y PLASMIDOS NO     CONJUGATIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>II. BIOFERTILIZANTES EN AGRICULTURA: INOCULANTES DE     LEGUMINOSAS.....</b>	<b>40</b>
<b>1. LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSAS.....</b>	<b>42</b>
<b>2. IMPACTO ECOLOGICO DE LOS BIOFERTILIZANTES         DE LEGUMINOSAS.....</b>	<b>44</b>
2.1. <i>Naturalización de las cepas de Rhizobium introducidas en             el suelo.....</i>	44
2.2. <i>Transferencia genética horizontal en Rhizobium.....</i>	46
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....</b>	<b>57</b>
<b>2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACION DE CEPAS         BACTERIANAS.....</b>	<b>61</b>
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	61

2.2. Medios de cultivo para <i>Rhizobium</i> .....	62
2.3. Preparación y conservación de compuestos nutritivos específicos .....	63
2.4. Conservación de cepas bacterianas .....	64
2.5. Antibióticos.....	64
<b>3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ADN .....</b>	<b>65</b>
3.1. Preparación de ADN plasmídico.....	65
3.1.1. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.....	65
3.1.2. QIAprep Spin Plasmid®.....	66
3.2. Preparación de ADN genómico .....	67
3.3. Determinación de la concentración de ADN .....	68
<b>4. MANIPULACION DEL ADN .....</b>	<b>69</b>
4.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción .....	69
4.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa.....	69
4.2.1. Electroforesis de ADN .....	69
4.2.2. Revelado de geles y fotografía .....	70
4.2.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción .....	70
4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....	71
4.4. Manipulación de los fragmentos de restricción .....	72
4.4.1. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación.....	72
4.4.2. Relleno de extremos 5´protuberantes de fragmentos de restricción.....	72
4.4.3. Eliminación de extremos 3´protuberantes de fragmentos de restricción.....	73

4.5. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	73
4.6. Experimentos de hibridación ADN-ADN .....	74
4.6.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon .....	74
4.6.2. Marcaje de sondas de ADN .....	75
4.6.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva .....	75
<b>5. EXPERIMENTOS CON PLANTAS .....</b>	<b>77</b>
5.1. Plantas .....	77
5.2. Solución nutritiva.....	77
5.3. Esterilización y germinación de semillas .....	78
5.4. Cultivos axénicos de plantas.....	78
5.5. Ensayos de nodulación en alfalfa.....	79
5.6. Ensayos de competitividad en alfalfa.....	79
<b>6. AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>Rhizobium</i> NATIVAS DE UN SUELO DE GRANADA.....</b>	<b>80</b>
6.1. Preparación de macetas.....	80
6.2. Aislamiento de las cepas a partir de los nódulos .....	81
6.3. Determinación de número más probable de rizobios en suelo (NMP).....	81
<b>7. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>Rhizobium</i> .....</b>	<b>82</b>
7.1. Separación de plásmidos de alto peso molecular mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa .....	82
7.2. Técnicas moleculares de caracterización de los aislados.....	83
7.2.1. RAPDs.....	83
7.2.2. Caracterización de los genes codificantes del ARN ribosómico 16S .....	85
7.2.2.1. Análisis con enzimas de restricción (ARDRA).....	85

7.2.2.2. Amplificación y secuenciación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S .....	86
7.2.2.2.1. Obtención de ADN para secuenciación .....	87
7.3. Análisis filigenético de los alelos 16S identificados .....	89
<b>8. ANALISIS DE ISOENZIMAS METABOLICAS.....</b>	<b>89</b>
8.1. Preparación de los extractos celulares.....	89
8.2. Electroforesis enzimática (MLEE).....	90
<b>9. ENSAYOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA EN SUELO Y EN LABORATORIO .....</b>	<b>90</b>
9.1. Ensayos de microcosmos.....	90
9.1.1. Preparación de los microcosmos .....	90
9.1.2. Inoculación del suelo .....	91
9.1.3. Recuento de las células inoculadas en suelo .....	91
9.1.4. Determinación del número de transconjugantes aparecidos en suelo.....	91
9.2. Transferencia en condiciones de laboratorio .....	92
9.2.1. Conjugaciones simples.....	92
9.2.2. Conjugaciones triparentales.....	93
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>97</b>
<b>1. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLASMIDOS SIMBIOTICOS DE <i>Rhizobium meliloti</i> GR4.....</b>	<b>97</b>
1.1. Construcción de GR4KL.....	97
1.2. Transferencia conjugativa de los plásmidos crípticos de <i>R. meliloti</i> GR4.....	103
1.3. Construcción de una cepa derivada de GR4KL deficiente en	

recombinación homóloga .....	107
1.4. Transferencia conjugativa de los plásmidos no simbióticos	
desde GR4KLR.....	112
1.5. Discusión.....	115
<b>2. TRANSFERENCIA DE LOS PLASMIDOS NO SIMBIOTICOS DE</b>	
<b>    <i>Rhizobium meliloti</i> GR4 A POBLACIONES NATIVAS DE UN</b>	
<b>    SUELO DE GRANADA.....</b>	<b>117</b>
2.1. Ensayos de microcosmos.....	118
2.1.1. Construcción de GR4KG.....	119
2.1.2. Experimentos de transferencia en suelo.....	120
2.2. Transferencia conjugativa en ensayos de laboratorio .....	125
2.2.1. Aislamiento de poblaciones nativas.....	125
2.2.2. Caracterización de la población aislada de nódulos de	
<i>Trifolium repens</i> (trébol).....	125
2.2.3. Caracterización de los aislados de <i>Pisum sativum</i> (guisante).....	129
2.2.4. Caracterización de las cepas aisladas de nódulos de	
<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	133
2.2.5 Transferencia de los plásmidos no simbióticos de GR4KG en	
condiciones de laboratorio.....	143
2.2.5.1. Transferencia conjugativa a los diferentes aislados .....	144
2.2.5.2. Estabilidad de los orígenes de replicación de los	
plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b.....	147
2.2.6. Determinación del número mínimo de receptores y el número	
mínimo de transconjugantes para la detección de transferencia	
genética .....	149
2.3. Discusión.....	152

<b>3. INHIBICIÓN POR AMONIO DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLASMIDOS NO SIMBIOTICOS DE <i>Rhizobium meliloti</i> GR4</b> .....	155
3.1. Transferencia conjugativa en diferentes fuentes de nitrógeno.....	155
3.2. Efecto del amonio sobre la transferencia conjugativa de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b.....	157
3.3. Efecto del amonio sobre la transferencia de RP4.....	162
3.4. Efecto del amonio sobre la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a cepas de <i>Agrobacterium</i> .....	165
3.5. Discusión .....	166
<b>4. IDENTIFICACIÓN DE ORIGENES DE TRANSFERENCIA CONJUGATIVA (<i>oriT</i>) EN EL GENOMA DE <i>Rhizobium meliloti</i> GR4</b> .....	171
4.1. Selección e identificación de cósmidos movilizables .....	173
4.2. Localización genómica de las regiones <i>mob</i> clonadas .....	177
4.3. Caracterización de la región mínima de transferencia del plásmido pRmeGR4a.....	182
4.4. Transferencia conjugativa de los plásmidos <i>mob</i> de <i>Rhizobium</i> <i>meliloti</i> a <i>Escherichia coli</i> .....	187
4.5. Discusión .....	190
<b>CONCLUSIONES</b> .....	199
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	203



---

*INTRODUCCION*

## I. TRANSFERENCIA GENETICA HORIZONTAL EN BACTERIAS.

Si tuviéramos que estudiar la transferencia genética dentro del contexto de la evolución bacteriana, con grandes posibilidades sería el fenómeno que más plasticidad y variabilidad genética proporciona al proceso evolutivo.

La transferencia, entendida como tal, es una forma muy directa de dispersión de genes y/o elementos genéticos que, bajo determinadas condiciones, podrían suponer una renovación génica y/o metabólica repercutiendo directamente sobre la flexibilidad filogenética bacteriana. Puesto que las bacterias carecen de reproducción sexual e intercambio meiótico, esta transferencia genética puede entenderse como una “compensación” evolutiva esencial para la adquisición y recombinación de nuevos genes, proceso básico en la evolución de los seres vivos (Lorenz y Wackernagel, 1994).

Los estudios experimentales de procesos de transferencia genética horizontal tales como transformación, transducción y conjugación, proporcionan evidencias suficientes de transferencia entre bacterias, de la misma o diferente especie, e incluso entre bacterias y eucariotas (DeFlaun y Levy, 1989; Heinemann, 1991; Mazodier y Davies, 1991).

Tres son los procesos principales por los que la transferencia genética horizontal puede tener lugar: transformación, transducción y conjugación.

### 1. TRANSFERENCIA GENÉTICA MEDIADA POR TRANSFORMACIÓN NATURAL.

La transformación genética natural de bacterias se entiende como la captura de ADN extracelular libre por una célula y su heredable incorporación al genoma. Este mecanismo de transferencia horizontal depende de la función de varios genes localizados en el cromosoma bacteriano. El término “transformación natural” ha sido acuñado para distinguirlo de otros procesos usados *in vitro* para

introducir moléculas de ADN dentro de las células bacterianas (transformación artificial).

Las bacterias son los únicos organismos capaces de transformación natural, por lo que este proceso puede considerarse como la forma más genuina de transferencia génica horizontal, ya que otros procesos están regulados por genes localizados en plásmidos o transposones (conjugación) o en bacteriófagos (transducción).

La transformación natural, como mecanismo de adquisición de información genética, contribuye a la formación de estructuras en mosaico de las poblaciones (Maynard *et al.*, 1991). Esta evidencia puede obtenerse del análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas, uso de codones y patrones enzimáticos entre diferentes bacterias. Los requerimientos ecológicos para este proceso, a diferencia de otros, son bastante simples. Por ejemplo, en el proceso conjugativo se necesita un estado metabólico activo de donador y receptor y el establecimiento de un contacto físico lo suficientemente estable para permitir la transferencia de ADN. La transferencia genética por transducción requiere un donador metabólicamente activo en el cual se producen las partículas del fago durante la reproducción viral. El receptor, puede estar espacial y temporalmente separado del donador ya que la información genética en la partícula transductora persiste. Sin embargo el receptor debe estar relacionado con el donador por una sensibilidad común al bacteriófago.

A diferencia de la transferencia genética por conjugación o por transducción, la mediada por transformación natural no requiere incluso un donador vivo, ya que durante la lisis o muerte celular se libera ADN suficiente para proporcionar ADN libre. Tampoco es necesaria una relación genética entre el donador y el receptor para la transformación, sin embargo sí se requiere un estado fisiológico activo del receptor para la toma de ADN.

La capacidad de transformación natural de algunas bacterias ha sido aprovechada para introducir ADN dentro de las células. Con la aparición de las

técnicas de ADN recombinante se han optimizado diversos métodos para la transformación (artificial). Por ejemplo: tratamiento de las células con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  o cloruros de otros elementos (Mg, Ba, Rb, Sr), con agentes quelantes (e.g. EDTA), o enzimas líticas (muramidasa o peptidasas) que producen protoplastos o esferoplastos; fusión de células o protoplastos con ADN empaquetado en liposomas; exposición celular a campos eléctricos (electroporación); bombardeo de células con pequeñas partículas que transportan ADN directamente al citoplasma y procesos de congelación y descongelación.

Se podría imaginar que ocurran situaciones parecidas a las descritas anteriormente en el entorno natural de la célula. Por ejemplo, un descenso de la temperatura por debajo del punto de congelación del agua, la presencia de soluciones de electrolitos, lisozimas y enzimas proteolíticas, son situaciones que probablemente se puedan encontrar en ambientes acuáticos y terrestres. Y ejemplos no faltan; de la mezcla de *Escherichia coli* con el sobrenadante de un cultivo de bacterias portadoras de plásmidos, se obtienen transformantes por congelación y descongelación de dicha mezcla (Li, *et al.*, 1992). Por otro lado, la transformación natural depende de una serie de funciones celulares codificadas por genes cromosómicos (Dubnau, 1991; Hahn *et al.*, 1987) y expresados coordinadamente bajo la influencia de condiciones medioambientales particulares.

Lorenz y Wackernagel (1994) dividen este proceso de transformación natural en los siguientes pasos:

1. La liberación del ADN por las células.
2. Su dispersión.
3. La persistencia del mismo.
4. Desarrollo de la competencia para la toma del ADN.
5. La interacción de las células con el ADN y la adquisición del mismo.
6. La expresión de rasgos relacionados con el ADN adquirido.

En todos los habitats examinados (suelo, agua, etc) se ha podido encontrar ADN de forma libre. La liberación de este ADN ha sido demostrada por el hecho de que algunas bacterias pueden excretar espontáneamente ADN cuando se cultivan. Este es el caso de *Bacillus subtilis* en cultivos líquidos, del cual se encuentra ADN libre o bien asociado a la pared celular (Lorenz *et al.*, 1991). El mecanismo por el cual *B. subtilis* libera ADN incluye desde la lisis celular hasta una forma desconocida de externalización que no afecta a la integridad celular. En otros casos, *B. subtilis* puede liberar ADN justo en el momento del desarrollo de su estado de competencia (Crabb, *et al.*, 1977), a juzgar por las altas tasas de transformación encontradas en cultivos líquidos de células en estado competente.

Estos procesos de liberación de ADN por lisis celular o excreción parecen estar regulados por la presencia de cationes (Svarachorn *et al.*, 1989) y aunque no hay una explicación clara, se ha sugerido alguna interacción o acoplamiento con el potencial quimiosmótico de la membrana. Además de la excreción o lisis, existen otros mecanismos de liberación de ADN. Así, en bacterias gram-negativas (*Agrobacterium tumefaciens*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc), ADN cromosómico y plasmídico puede ser expulsado en vesículas formadas a partir de las membranas celulares (Dorward y Garon, 1990).

Estudios más directos han demostrado la presencia de ADN extracelular en diferentes medios. Los métodos de extracción desarrollados son diversos, aunque, sin embargo, más que para cuantificar la cantidad de ADN libre, estos métodos han sido usados para obtener ADN con el objeto de describir y analizar las poblaciones microbianas (Holben, *et al.*, 1988; Porteus y Armstrong, 1993). En cualquier caso, aunque las grandes cantidades de ADN recuperadas del suelo y otros ambientes parecen indicar la abundancia de ADN extracelular, con frecuencia, y debido al tratamiento, existen contaminación con ADN de los microorganismos presentes.

La existencia de ADN extracelular indica que, de alguna manera, puede persistir en este estado a pesar de que los ácidos nucleicos son hidrolizados en los

diferentes ambientes donde han sido encontrados (Romanowski *et al.*, 1992). Ciertos componentes del suelo, como cuarzo, feldespato, minerales de la arcilla y algunas partículas en suspensión en ambientes acuáticos, tienen capacidad de protección de los ácidos nucleicos frente a la hidrólisis por DNAsas, gracias a la formación de complejos ADN-minerales. Este hecho se ha deducido de los estudios que han medido la persistencia del ADN en el suelo y en ambientes acuáticos. El ADN por tanto, puede unirse rápidamente al material sólido resultando en una mejor protección frente a enzimas degradativas. El mecanismo propuesto es que las DNAsas tienen un acceso limitado a las moléculas adsorbidas a material sólido (Khanna y Stotzky, 1992), así como una propia inhibición o inactivación de estas enzimas. Todos estos datos muestran la presencia y persistencia de ADN extracelular en diferentes ambientes. De esta manera cualquier célula (con un estado competente desarrollado) puede ser transformada por moléculas de ADN.

Las células bacterianas están continuamente sometidas a cambios en las condiciones ambientales del suelo, sedimentos y medios acuáticos, que pueden ocasionar un estrés fisiológico producido por diferentes factores como son la limitación de nutrientes, pH, temperatura, radiaciones UV, especies de oxígeno activado y otros agentes tóxicos. Además, la competencia con otras especies, relacionadas o no, por los nutrientes y la producción de ciertos compuestos extracelulares pueden tener profundos impactos sobre células individuales o poblaciones enteras en determinados habitats.

Generalmente, la limitación de nutrientes, el calor y otras condiciones estresantes inducen la expresión de ciertos genes cuyos productos capacitan a la bacteria para adaptarse a situaciones extremas (Hassani *et al.*, 1992; Matin, 1991). Estos factores de estrés pueden también influenciar el desarrollo de la competencia, necesaria para la transformabilidad natural de las células. Para la adquisición de la misma es necesario un estado metabólicamente activo de la bacteria avalado por la disponibilidad de nutrientes. En *B. subtilis* la

competencia es regulada por varios productos génicos (ComA, ComP) que actúan en cascada como señal de traducción (Dubnau, 1991). En muchas bacterias, la calidad, variedad y cantidad de nutrientes son factores clave para el desarrollo de un estado competente óptimo.

Para la transformación de una bacteria se requiere en primer lugar que una célula competente tome contacto con el ADN y por otro lado la eficiencia de la transformación depende también del tamaño de la molécula de ADN.

### *1.1. Transformación natural en bacterias gram-positivas.*

Las especies más estudiadas son *B. subtilis* y *Streptococcus pneumoniae*. Estas bacterias pueden unir ADN de doble cadena, sin especificidad de secuencia, a receptores localizados en la membrana. Las moléculas de ADN penetran en forma de cadena simple, con un tamaño medio de 10 kb (Morrison, 1977; Piechowska y Fox, 1971) mientras que la otra cadena es degradada por nucleasas unidas a membrana. Todo el proceso está perfectamente regulado. Una vez unido el ADN al receptor celular, una de las cadenas es hidrolizada por una endonucleasa y la otra es empujada hacia el interior celular (Dreiseikelmann, 1994). El modelo propuesto (Rosenthal y Lacks, 1980) sería una estructura integrada en membrana con un poro acuoso en el centro, el cual permite el paso de una cadena de ADN mientras la otra es degradada. Todo indica, por otro lado, que la toma de esta cadena simple comienza por el extremo 3'-OH (Mejean y Claverys, 1988). La endonucleasa ha sido identificada en *B. subtilis* como el producto del gen *comI* (Vosman *et al.*, 1988) que estaría modulado por otro gen denominado *comJ*. Otras proteínas también están implicadas en el aparato translocador: ComC sería una peptidasa que actuaría en el procesamiento de algunos componentes del sistema (Dupuy *et al.*, 1992). El locus *comG* es un operón con siete genes, algunos con función reguladora y otros codifican proteínas que forman parte del complejo translocador de ADN (Albano y Dubnau, 1989)

A diferencia de *B. subtilis*, se sabe muy poco sobre los genes implicados en *S. pneumoniae*. De las 14 proteínas inducidas por la competencia, sólo 11 han sido identificadas, pero no se han asignado genes (Morrison y Baker, 1979; Vijayakumar y Morrison, 1986). Aunque predomina la hipótesis de un transporte de ADN mediado por proteínas de membrana, existen evidencias de un transportador de tipo no proteico. Durante el desarrollo del estado de competencia se produce un aumento del contenido en polihidroxibutirato (PHB), parte del cual ha sido encontrado formando parte de la membrana citoplasmática, asociándose con una estructura cilíndrica por cuyo interior pasaría el ADN de cadena sencilla (Reush *et al.*, 1986).

### ***1.2. Transformación natural en bacterias gram-negativas.***

La transformación natural también ha sido descrita en bacterias gram-negativas, tales como los géneros *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Neisseria* y *Moraxella*.

El sistema mejor estudiado es el de *Haemophilus* spp. La captura de ADN se lleva a cabo mediante una estructura denominada transformasoma, formada a partir de extensiones de la membrana (Zoon y Scocca, 1975). A diferencia de otros procesos de transformación, el ADN que va a penetrar en el interior celular ha de ser homólogo, uniéndose a receptores del transformasoma por determinadas secuencias (Danner *et al.*, 1980) siendo transportado al interior mediante un mecanismo desconocido. En este estado el ADN se encuentra protegido frente a las nucleasas. Durante su paso por la membrana citoplasmática, una cadena de ADN es degradada mientras que la complementaria entra en el citoplasma por el extremo 3'-OH y es incorporada por recombinación (Barany *et al.*, 1983).

Se conoce poco sobre la regulación a nivel genético de este proceso pues, aunque se han obtenido algunos mutantes de *H. influenzae* deficientes en transformación, su caracterización aún no está avanzada (Barouki y Smith,

1985); aunque en bacterias gram-negativas no se han identificado proteínas involucradas en la captura de ADN o nucleasas unidas a membrana, se asume, sin embargo, que la translocación del ADN ocurre con la ayuda de poros o canales especializados.

Cuando se considera que una célula competente podría transformarse por ADN de diferentes organismos presentes en el mismo hábitat, es importante determinar qué influencia tiene la integración del ADN que se ha internalizado dentro del genoma receptor. Se requiere una mínima homología para la formación del heteroduplex de ADN donador-receptor, que por otra parte, puede suponer sólo unas pocas pares de bases (Lorenz y Wackernagel, 1994).

El ADN no navega libremente por el interior celular ya que determinados factores, medioambientales o intrínsecos de la bacteria receptora, pueden limitar el éxito de la transformación. Uno de los más importantes es la barrera que suponen los sistemas de restricción del receptor, aunque no siempre funcionan de igual forma en todas las bacterias donde se conocen (Lorenz y Wackernagel, 1994).

Otro factor muy importante es la divergencia entre la secuencia de ADN que ha sido integrado respecto a la del genoma receptor. Se especula que la incorporación de ADN por transformación interespecífica ocurre preferentemente entre loci conservados, es decir entre secuencias muy similares, probablemente como consecuencia de un aislamiento sexual mediatizado por las diferencias entre los sistemas de restricción y los sistemas de corrección (Coyne, 1992).

¿Cuál es entonces la causa de que los sistemas de captura de ADN se conserven y evolucionen? El entrecruzamiento de ADN puede ser una estrategia ventajosa para adaptarse genotípicamente a un ambiente cambiante. Este intercambio genético puede ser ventajoso para otros propósitos aunque no confiera un beneficio o un nuevo rasgo tanto porque la información genética ya está presente o porque el ADN no puede integrarse en el cromosoma.

En *Neisseria* (Meyer, *et al.*, 1990) la entrada del ADN tiene un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, en la variación de las propiedades antigénicas (variación de fase). Esta variación de fase se ve aumentada en cultivos como consecuencia de la lisis celular (liberación de ADN) y disminuida por la adición de DNasas. Diferentes cepas de *S. pneumoniae* tienen distintos sistemas de restricción, *Dpn* I y *Dpn* II, que reconocen la misma secuencia pero que actúan, respectivamente, sólo cuando está o no metilada (Lacks *et al.*, 1986). Este sistema proporciona protección contra bacteriófagos. De esta forma, bacteriófagos propagados en cepas *Dpn* I son restringidos por la cepa *Dpn* II y viceversa.

Si el ADN que entra no tiene homología suficiente para integrarse en el genoma del receptor, puede servir como fuente de C, P y N o bien aportando nucleótidos para la síntesis de ADN (Steward y Carlson, 1986).

También se ha propuesto una reparación transformacional del ADN en receptores que han sufrido algún estrés genotóxico (Michod, *et al.*, 1988).

La transformación natural es por tanto un proceso que ocurre en la naturaleza. La continua producción y liberación de ADN por las poblaciones bacterianas y su relativa persistencia, particularmente cuando se asocia a superficies sólidas, provee de genes extracelulares en los ambientes bacterianos a pesar de la presencia de las DNasas.

A pesar de los conocimientos que se tienen, existen todavía muchas cuestiones que investigar, sobre todo en cuanto a la genética del proceso de la transformación natural. La identificación de genes y sus funciones pueden ser una herramienta muy útil para encontrar más bacterias que sean transformables de forma natural, así como clarificar la relación del proceso de translocación del ADN durante la transformación con otros sistemas de transporte transmembrana, incluyendo la transferencia conjugativa de ADN, transporte de proteínas, excreción de ADN, ARN y la infección por bacteriófagos.

## 2. TRANSFERENCIA GENETICA MEDIADA POR BACTERIOFAGOS.

La transducción genética es la transferencia intercelular de material genético no viral por medio de una partícula vírica. Las partículas de bacteriófagos se forman en las células donadoras durante el desarrollo del fago. Se pueden distinguir dos tipos de transducción (Masters, 1996; Weisberg, 1996): especializada, y generalizada. En el primer caso, sólo determinados genes del hospedador son transducidos (aquellos cercanos al sitio de inserción del fago) e incorporados establemente al genoma vírico donde estos genes son empaquetados y replicados como si fuesen propios. En el segundo, no hay limitaciones para el tipo de genes que se puede transducir. Sin embargo, sea cual sea el tipo de transducción que se lleve a cabo, la transducción entre bacterias es un fenómeno habitual y por ello merece la pena detenerse un poco para entender mejor cómo ocurre este proceso. Dado que existen gran número de bacteriófagos, y aunque ciertos aspectos de su ciclo infectivo y desarrollo son diferentes, se va a centrar el estudio en fagos de *E. coli*.

Los fagos se adsorben a sitios específicos en la superficie de la célula bacteriana. Tras una unión irreversible del fago, el ácido nucleico es translocado a través de la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana interna hasta alcanzar el citoplasma. La unión se realiza en receptores específicos de superficie cuyo número estimado varía entre 200 y 400 por célula (Dreiseikermann, 1994). La ventaja de los sitios de adhesión sería que las moléculas transportadas permanecerían en un ambiente hidrofóbico sin necesidad de protección frente a enzimas degradativas.

Otros autores, sin embargo, pretenden cambiar la noción de los sitios de adhesión (Hobot, *et al.*, 1984), por donde pasaría el ADN transducido, por la idea de unos pequeños puentes, de composición lipídica, que conectarían las membranas celulares. Lo que si parece claro es que, de una forma u otra, puede existir una inducción de los sitios de adhesión originados por la infección del fago

(Furukawa, *et al.*, 1983). Estos autores han propuesto que tras la adsorción del fago, la cola es introducida en la membrana externa, produciéndose un acercamiento de las membranas externa e interna que se fusionan formando un canal estrechamente adosado a la cola del fago, tras lo cual el ácido nucleico es introducido en la célula hospedadora.

La idea de un transporte de ADN fágico mediado por canal ha sido propuesta repetidamente. Todo parece indicar que los canales transmembrana para la translocación del ADN del fago son una consecuencia de los fenómenos de despolarización a los que las membranas están sujetas tras la infección del fago. Dicha despolarización (provocada por eflujos de  $K^+$  e influjos de  $H^+$ ,  $Na^+$  y  $Li^+$ ) es repuesta tras la translocación del ADN a través de la membrana, recuperándose el potencial de membrana y produciéndose el cierre del poro o canal (Boulanger y Letellier, 1988). Quizás el cierre del canal sea llevado a cabo por una proteína llamada piloto que estaría unida al ADN. Esta proteína entraría primero en la célula y sería responsable de la alta especificidad y eficiencia en la translocación a través de la cubierta celular.

Sin embargo, en algunos casos de transducción se han identificado proteínas específicas del fago que van a formar parte del canal o poro y que son constituyentes de la cápsida del fago (Feucht, *et al.*, 1990).

Ciertas proteínas del hospedador también participan en el proceso de infección de ADN de algunos fagos. Los genes *tonB*, *tolQ*, *tolR* y *tolA* de *E. coli* están directamente relacionados y mutantes de dichos genes no permiten la infección por el fago *fd*, así como por otros fagos (Bradley y Whelan, 1989). La función precisa de las proteínas Tol no es bien conocida pero parece que estarían implicadas en la estabilización de la membrana interna (Levengood-Freyermuth, *et al.*, 1993).

### 3. TRANSFERENCIA GENÉTICA MEDIADA POR CONJUGACIÓN.

Los plásmidos de una amplia variedad de géneros son objeto de estudio por muchos laboratorios en todo el mundo. Estos elementos son conocidos porque portan genes que confieren propiedades importantes de supervivencia, necesarios frecuentemente bajo condiciones atípicas. Ejemplos clásicos son las resistencias a sustancias tóxicas, como antibióticos, iones metálicos, sensibilidad bacteriófagos, rutas metabólicas alternativas para la célula bajo condiciones de estrés nutricional, etc. Dentro del contexto evolutivo, es muy probable que la mayoría de los plásmidos hayan sido adquiridos recientemente por sus hospedadores, dado que su característica movilidad les capacita para establecerse en nuevas células bacterianas por el proceso conocido como conjugación. Mientras muchos plásmidos son completamente capaces de promover su propia transferencia conjugativa (autotransmisibles), otros se mueven sólo con la ayuda de elementos corresidentes. La habilidad de un plásmido para establecerse él mismo en una variedad de diferentes especies es común. Así, por ejemplo, la transferencia plasmídica entre bacterias y eucariotas ya ha sido demostrada. Es más, la transferencia entre reinos también es clara como lo demuestra que ciertas enfermedades de las plantas están directamente relacionadas con la transferencia de ADN desde una bacteria en un proceso similar a la conjugación bacteriana. También es notable que muchos genes localizados en plásmidos exhiben su propia forma de movilidad al localizarse en transposones capaces de moverse de una a otra molécula intracelularmente. Algunos de estos transposones (transposones conjugativos) tienen incluso capacidad autoconjugativa y pueden transferirse directamente a otra célula bacteriana.

La conjugación bacteriana es un proceso especializado de transferencia unidireccional de ADN desde un donador a una célula receptora por un mecanismo que requiere un contacto íntimo. El proceso suele estar codificado por un plásmido o transposón conjugativos y supone una de las mayores rutas de

transferencia genética horizontal. Los sistemas de conjugación tienen un papel remarcable en la transferencia genética entre una amplia gama de géneros bacterianos e incluso entre bacterias y eucariotas. Estas propiedades hacen a la conjugación una importante fuente de plasticidad genética, potenciando cambios de significancia clínica y medioambiental.

Para orientar un poco más el estudio y comprensión de este proceso, es conveniente empezar revisando cómo ocurre la transferencia conjugativa en bacterias gram-negativas y más concretamente en el modelo mejor estudiado: El plásmido F y sus relacionados.

### ***3.1. Organización genética de la región que determina la transferencia del plásmido F y sus relacionados.***

Este sistema conjugativo fue el primero descrito en la literatura científica (Lederberg y Tatum, 1946) y desde entonces han sido numerosos los artículos que han elucidado con detalle la genética molecular de todo el proceso conjugativo.

Brevemente, los pili, filamentos extracelulares expresados por el plásmido, propician un contacto con uno o más receptores, conduciendo a la formación de un agregado o pareja de conjugación. Una vez que este agregado está establecido, una única molécula de ADN se transfiere en dirección 5'→3', comenzando en el sitio de la mella dentro del origen de transferencia (*oriT*). El proceso se completa cuando se produce la recircularización de la cadena transferida y la síntesis de la cadena complementaria de ADN, tanto en el donador como en el receptor.

Toda la información genética necesaria para la transmisión conjugativa del plásmido F o factor de fertilidad está codificada dentro de una región de 33.3 kb de la región de transferencia (Frost et al. 1994).

Aunque el plásmido F es el único cuya secuencia se conoce en su totalidad, las secuencias parciales de otros plásmidos como R386, R1, R100, R136, ColB2-K77, ColB4-K98, R538-1, pSU316, R124, pED208 y pSU233, todos ellos

relacionados con el plásmido F, también están disponibles para su análisis comparativo. En la mayoría de los casos, las regiones de transferencia de dichos plásmidos presentan un alto grado de homología entre sí. Esto claramente evidencia la gran relación existente entre ellos y que probablemente tuvieron un plásmido antecesor común (Frost et al. 1994).

Los genes del plásmido F que codifican para funciones de transferencia pueden agruparse de acuerdo a la etapa de la transferencia que requiera su expresión. Estos agrupamientos son los siguientes (Ippen-Ihler y Skurray, 1993):

1. Regulación: La expresión de las funciones de transferencia dependen de un regulador positivo, TraJ. La expresión de *traJ* es reprimida por el producto del gen *finP* cuando el producto de *finO* está disponible.

2. Síntesis de los pili: Las células que portan un elemento F son capaces de sintetizar filamentos extracelulares denominados pili (codificados por el propio F) que se extienden desde la superficie del donador e inician el contacto con las células receptoras. Los donadores que no pueden sintetizar pili no son capaces de formar agregados conjugativos y son deficientes en transferencia.

3. Estabilización del agregado conjugativo. Una vez formados los pili, hay una serie de funciones génicas que intervienen en la estabilización del agregado.

4. Procesamiento del ADN. Existen una serie de genes que son requeridos para producir la mella e iniciar y terminar la transferencia.

5. Exclusión superficial. Los productos de los genes *traS* y *traT* interfieren con la entrada del ADN del plásmido F o relacionados en células que ya contienen dicho plásmido.

### 3.1.1. Organización y regulación de los genes de transferencia.

La organización de todos estos genes, así como la función de los mismos en el proceso conjugativo, está representada en la Figura 1.

El nucleótido 1 de la región de transferencia del plásmido F incluye el sitio *Bgl* II indicado en la Figura 1. Desde el nucleótido 49 se transcribe el producto de un gen, en dirección contraria al *oriT* (nucleótidos 134 a 145), que es el primero que entra en la célula receptora y que forma parte de lo que se llama región líder de la transferencia (Gram et al. 1984).

Dentro de la región líder se han identificado secuencias que estarían relacionadas con la síntesis de la cadena complementaria en la célula receptora; también se han identificado sitios de reconocimiento potenciales del factor de integración del hospedador (IHF). IHF son proteínas tipo histonas asociadas al ADN (Yang y Nash, 1989) y que son sintetizadas en el cromosoma del donador.

Dentro de esta región también se ha identificado *psiA*, que parece ser coexpresado junto a *psiB* pero no está relacionado con la supresión de la respuesta SOS (Babilone et al. 1988). También se han identificado los ORFs ORF169 (*genX*) y ORF273 (Loh y Skurray, 1989). ORF169 mapea adyacente al *oriT* del plásmido F. Comienza en el nucleótido 49 y se transcribe en dirección opuesta a la región de transferencia.

La transcripción de la región de transferencia comienza desde dos promotores localizados en ella,  $P_M$  y  $P_J$ , los cuales controlan la transcripción independiente de los genes *traM* y *traJ*, respectivamente (Gaffney et al. 1983), y desde  $P_Y$ , el promotor de la mayoría de los genes de la región de transferencia. La activación de este promotor requiere la presencia de *TraJ* y de *SfrA*, una proteína del hospedador.

La represión de la transcripción de la región de transferencia ocurre cuando *finO* y *finP* están activos. *FinP* codifica un ARN antisentido que regula negativamente la expresión de *traJ* en presencia de *FinO*, codificado en la parte distal de la región de transferencia (Figura 1) (Finnegan y Willetts, 1971). Cuando *FinO* está presente, *FinP* bloquea la expresión de *traJ* uniéndose a la secuencia líder del ARN mensajero de *traJ* e impidiendo su traducción. En el plásmido F el gen *finO* queda interrumpido por el elemento de inserción IS3

(Yoshioka et al. 1983), por lo que existe una expresión constitutiva de toda la región de transferencia.

Una repetición invertida inmediatamente después de *traJ* y precediendo a  $P_Y$  podría actuar como terminador de la transcripción de *traJ*. TraJ se uniría a  $P_Y$  deshaciendo complejos nucleoproteicos de composición desconocida, lo que conduciría a una expresión de la región de transferencia. (Gardim y Silverman, 1993).

La expresión de todos los genes de la región de transferencia desde *traY* a *traX* depende de la activación de  $P_Y$ . Por tanto la transcripción desde  $P_Y$  produce un ARNm de unas 30 kb (Gaffney et al. 1983) que estaría, posteriormente, sujeto a una serie de procesamientos.

De todas formas, parece que existen promotores independientes de TraJ situados delante de *traS*, *traT*, *traD* y *traI*, que contribuirían a una expresión distal de estos genes.

### 3.1.2. ¿Cómo se forman los pili?

Durante la expresión de la región de transferencia de células portadoras de un plásmido tipo F se elaboran unos filamentos cilíndricos, flexibles, específicos del plásmido y cuyo número oscila entre 1 y 2 por célula donadora. Suelen tener un diámetro de 8nm con un hueco de luz interno de 2nm y se extienden entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  desde la superficie de la célula (Marvin y Folkhard, 1986).

La unidad estructural de los pili son las subunidades de pilina que se organizan en forma de hélice, que contiene 5 unidades por vuelta. La síntesis de las subunidades maduras de pilina depende de la expresión de tres genes, *traA*, *traQ* y *traX*.

*traA* codifica para la pilina (Minkley et al. 1976) que es una proteína de 7.2 kDa con un extremo N-terminal acetilado (frust et al 1984). Sin embargo el producto de *traA* es un proteína de 13 kDa (propilina) que para formar una

subunidad madura debe ser procesada con intervención del producto del gen *traQ* (Moore et al. 1982) y en cuya ausencia la mayoría de las pilinas son desagregadas (Laine et al, 1985). La acetilación del extremo N-terminal de la subunidad de pilina, es llevada a cabo por TraX, una proteína altamente conservada entre los plásmidos de tipo F (Moore et al 1993). Curiosamente esta modificación no parece importante para el ensamblaje del pili.

Mutaciones en los genes *traL*, *traE*, *traK*, *traB*, *traV*, *traC*, *traW*, *traU*, *trbC*, *traF*, *traH* o en el extremo N-terminal de *traG* evitan la producción de pili aunque las membranas contienen subunidades de pilina-F (Moore et al., 1981).

TraC es una proteína asociada a la membrana interna que interactúa con otras proteínas como TraL, TraE, TraB y TraG, todas ellas relacionadas con el ensamblaje de las subunidades de pilina (Frust et al., 1984). Otras proteínas como TraW, TraU, TrbC y TraF se han encontrado en el espacio periplásmico (Wu et al., 1988, Moore et al., 1990 y Maneewannakul et al., 1991). Probablemente estas proteínas interaccionan unas con otras para reclutar pilinas desde la membrana interna, polimerizarlas y extender el pilus F desde la superficie de la célula.

### 3.1.3. Genes requeridos para la estabilización de los agregados de conjugación.

La transferencia de la cadena de ADN ocurre entre células que están en íntimo contacto. Los contactos específicos entre parejas de conjugación o agregados de conjugación (cuando participan más de dos células) resultan por la interacción de los pilus F del donador con receptores específicos en las células receptoras. Los contactos iniciales son inestables pero con el tiempo se hacen resistentes, por ejemplo, a la rotura o a la adición de detergentes. Dos proteínas, TraN y TraG, parecen estar implicadas en este proceso y son esenciales para la transferencia de ADN y la estabilización de los contactos durante las primeras etapas de la interacción entre las superficies celulares del donador y receptor.

Mutaciones en ambos genes repercuten en la estabilización de los agregados de conjugación (Frost et al., 1994).

#### 3.1.4. Exclusión superficial.

La exclusión superficial es un mecanismo por el cual se reduce la conjugación entre células que puedan portar plásmidos relacionados o del mismo grupo de exclusión o incompatibilidad.

La exclusión superficial resulta de la presencia de 2 proteínas: TraT que bloquea los pasos iniciales en la formación de los agregados y TraS que bloquea la transferencia de ADN una vez que la conjugación se ha estabilizado (Kingsman y Willetts, 1978). Riede y Eschback, 1986 han propuesto que TraT bloquea el acceso a la proteína OmpA, una proteína de la membrana externa del receptor implicada en la interacción superficial con el donador. Otra posibilidad es que TraT se asocie con la punta del pili inhibiendo su interacción con el receptor superficial de la célula receptora (Frost *et al.*, 1994).

En la célula receptora, TraS no previene la formación del agregado de conjugación, pero reduce la transferencia de ADN, posiblemente bloqueando la acción de la señal de conjugación transmitida desde el receptor al donador.

#### 3.1.5. Procesamiento, corte, desplazamiento y transporte del ADN durante el proceso de conjugación.

La iniciación de la transferencia de ADN ocurre cuando se reconoce una señal, presumiblemente generada cuando se ha completado satisfactoriamente el agregado de conjugación, por la maquinaria conjugativa, conocida como de transferencia o relaxosoma. Los sucesivos pasos incluyen corte, desenrollamiento del ADN y transporte a la célula receptora. El modelo general de conjugación

propone que una cadena específica de ADN es transferida en dirección 5'→3' a la célula receptora y que la cadena complementaria es retenida en el donador.

El origen de transferencia es la única función que se requiere en *cis* para la transferencia conjugativa de ADN y se define por su habilidad de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable (Lanka y Wilkins, 1995). Los orígenes de transferencia de diversos plásmidos comparten ciertas características:

1. Mapean asimétricamente respecto a los genes que codifican para las funciones de transferencia, por lo que la mayoría de los genes *tra* entran los últimos en el receptor.
2. Tienen un alto contenido en AT, lo que probablemente facilita la separación de las cadenas de ADN superenrollado negativamente.
3. Tienen una estructura secundaria compuesta de repeticiones de secuencias directas e invertidas.
4. Contienen sitios potenciales dónde se unen proteínas que alteran la estructura del *oriT* localmente, facilitando el acceso de las proteínas a la región de corte.
5. Incluyen promotores para la expresión de los genes *tra*.

Como se mencionó anteriormente, el complejo de iniciación de la transferencia conjugativa de ADN se denomina relaxosoma. Este complejo está compuesto por proteínas que interaccionan específicamente con el ADN en el origen de transferencia.

El proceso de corte en el plásmido F necesita al menos los productos de los genes *traY* y *traI* (Everett y Willets, 1980). Sin embargo otras proteínas, TraM y TraD, son necesarias también para iniciar la transferencia específica de ADN.

Se ha sugerido que TraM podría procesar la señal de que el agregado o puente conjugativo se ha formado (Willets y Skurray, 1987) y que TraY puede dirigir a TraI, la helicasa o enzima que corta, hacia *oriT* (Traxler y Miller, 1988). TraI parece tener al menos 2 funciones, por un lado es la enzima encargada de producir el corte en el *oriT*, tras lo cual permanece unida al extremo libre

generado en el ADN y por otro lado es la proteína encargada de desenrollar o desenredar el ADN (Reggers et al. 1991), mientras TraD dirige el ADN hacia la célula receptora (Pamicker y Minkley, 1985).

La proteína TraI purificada presenta 2 actividades ATPasa (Dash et al 1992) y tiene también dos sitios de unión de ATP tal y como revela su secuencia (Bradshaw et al, 1990). Todo indica, por tanto, que la energía para la separación de las cadenas y la correspondiente mella es proporcionada por la hidrólisis del ATP.

Aunque TraI permanece unida a la cadena de ADN, parece que TraI no pasa junto con el ADN a la célula receptora (Matson et al, 1993) y que son otras proteínas de unión a ADN de cadena sencilla, las SSB, las encargadas de proteger del ataque de exonucleasas o incluso servir de proteínas piloto “abrigando” la cadena de ADN.

¿Cómo ocurre entonces la translocación del ADN?

Desde el descubrimiento de que *E. coli* portando el plásmido F sintetizan los pili F, ha sido materia de debate la cuestión de si el ADN es transferido a través del pilus. Si éste está anclado a la membrana interna en las zonas de adhesión propuestas, tendría todas las características para ser un orgánulo para la translocación del ADN. Todavía no está claro si existe transferencia de ADN a través del pilus extendido o bien este sólo sirve para establecer contacto donador-receptor tras lo cual se produce la retracción del pilus y un desensamblaje de las pilinas en la membrana interna, pero manteniéndose el íntimo contacto.

En consonancia con esto último, Dürrenberger et al., (1991) han propuesto un modelo de translocación del ADN del plásmido F. Tras examinar por microscopía electrónica secciones ultrafinas de diferentes estados de la formación del agregado conjugativo, han encontrado una capa oscura densa a los electrones entre las membranas externas del donador y receptor, estructuras que han denominado uniones conjugativas. Estas estructuras no han sido encontradas en células de donador o receptor por separado. Las uniones conjugativas parecen



contener la proteína TraN, que debe formar parte de la membrana externa y es necesaria para la estabilización del agregado conjugativo (Maneewannakul et al., 1992). El transporte de ADN podría estar mediado por TraD que unida o interaccionando con TraI, anclaría el ADN a la membrana interna del donador, facilitando la salida de ADN a través del canal que la propia TraD formaría con otras proteínas (Figura 2). Muchos de los numerosos productos génicos de la región de transferencia son proteínas de membrana o asociadas a ellas. La mayoría, al menos 12 (Willetts 1993), están relacionadas con el ensamblaje de los pili, aunque no han sido suficientemente caracterizadas para concluir si son parte del aparato de transporte de ADN.

Menos aún se sabe sobre la traslocación de ADN a través de la membrana de las células receptoras. Dos clases de mutantes de *E. coli* afectados en funciones de envuelta son incapaces de actuar como receptores en conjugación. Estos mutantes o carecen de OmpA, la proteína de membrana más abundante, o bien tienen alterado el lipopolisacárido (LPS) (Manoil y Rosenbusch, 1982, Skurray et al., 1974). Un defecto en el LPS puede también afectar a una correcta colocación de OmpA en la membrana.

Recientemente se ha demostrado que OmpA forma un canal de difusión no específico (Sugawara y Nikaido, 1992) de aproximadamente 1nm de diámetro, el cual puede ser suficiente para el paso de una cadena simple de ADN. Por tanto OmpA podría tener dos funciones: por un lado serviría como receptor de los pili y estaría involucrado en el posicionamiento de la pareja de conjugación, y por otro lado proveería de un poro o canal de difusión para el paso del ADN a través de la membrana externa de la célula receptora.

Hasta el momento no hay evidencias experimentales o modelos que expliquen satisfactoriamente como ocurre la translocación de ADN a través de la membrana interna del receptor.

### 3.1.6. Terminación de la transferencia.

Una ronda de transferencia termina, en el modelo general de conjugación, con la unión de los extremos de la cadena transferida para formar un círculo cerrado covalentemente. Este proceso no depende de la proteína RecA ni de síntesis de novo de proteínas Tra en la célula receptora (Willette y Wilkins, 1984).

La circularización de la cadena transferida requiere un proceso de ligación que es formalmente el proceso inverso del corte en el *oriT* y que está mediado, al menos, por la proteína Tra unida al extremo 5' de la cadena transferida (TraI para el plásmido F). Sin embargo, no está claro si tales proteínas asociadas al ADN son transmitidas al receptor o son retenidas en el donador en la vecindad del puente conjugativo.

El segundo extremo usado para la ligación debe ser el grupo 3'-OH de la cadena monomérica de ADN. Sin embargo, si este extremo, que fue creado por el corte original en el *oriT*, se extiende por elongación según el modelo del círculo rodante de síntesis de ADN, es necesario un segundo corte en el *oriT* para producir una unidad de ADN para la recircularización (Warren y Clark, 1980). Este modelo de recircularización explicaría la formación de plásmidos F' delecionados de la región *tra*. Tales plásmidos serían generados durante conjugaciones de las cepas Hfr si el complejo de corte-ligación del plásmido F reconoce sitios cromosomales que posean motivos en su secuencia similares al *oriT* (Horowitz y Deonier, 1985).

### 3.1.7. Genes de función desconocida.

Aún quedan genes cuya función hasta la fecha es desconocida y en otros casos ni siquiera sus productos han sido identificados (Frost et al., 1994). Entre estos genes están: *traP traR, trbABDEFGHJ, artA*.

### 3.1.8. Síntesis de ADN conjugativo.

En el donador, el proceso replicativo que la cadena transferida se denomina DCDS (del inglés, Donor Conjugative DNA Synthesis).

Esta síntesis para el reemplazamiento de dicha cadena requiere de una ADN polimerasa responsable de la reacción de elongación en el DCDS (Kingsmam y Willetts, 1978). La naturaleza de los cebadores que inician DCDS es desconocida. En principio el extremo 3'-OH de la cadena que ha sido transferida debe ser elongado, según el modelo del círculo rodante (Gilbert y Dressler, 1968), pero en realidad se desconoce si este extremo es accesible "in vivo". Todo lo contrario, existen evidencias indirectas de que es necesaria la síntesis de un ARN cebador para DCDS (Willetts y Wilkins, 1984).

La síntesis de ADN de la cadena transferida en el receptor se denomina RCDS (en inglés, recipient conjugation DNA synthesis). Esta síntesis es llevada a cabo por una DNA polimerasa del receptor (Willetts y Wilkins, 1984), y parece ocurrir en paralelo con la transferencia, previniendo la acumulación de cadenas sencillas de ADN en el receptor. La RCDS implicaría síntesis de novo de múltiples cebadores en intervalos de 1 a 2 kb, por analogía con los fragmentos de Okazaki (Kornberg y Baker, 1992).

Algunos plásmidos codifican sus propias ADN primasas para la iniciación de RCDS. Estas enzimas tienen la habilidad de sintetizar cebadores funcionales en cadenas sencillas de ADN (Wilkins et al., 1981). Este es el caso de las primasas Sog de Collb (Wilkins et al., 1981) y Pri (TraC) de RP4 (Lanka y Borth, 1981).

La región de transferencia del plásmido F se puede describir como un mosaico de sistemas señal y sistemas de transporte diseñado para promover la transferencia del plásmido hacia receptores adecuados o apropiados y bajo condiciones medioambientales óptimas. Dicha transferencia se facilita gracias a sistemas de transporte específicos para los ácidos nucleicos.

Tras el reconocimiento de una señal generada cuando se ha tomado contacto con un receptor adecuado, comienza la transferencia. Un aspecto interesante del proceso es conocer si el operón de transferencia del plásmido F es el único responsable de la construcción del puente de conjugación o si se coordinan interacciones con componentes de las envueltas celulares. Aunque OmpA y LPS en el receptor están implicados en la formación del puente conjugativo, no está del todo claro, sin embargo, que sean los únicos componentes celulares relacionados con el establecimiento del agregado de conjugación.

### **3.2. Conjugación en bacterias gram-positivas.**

Los sistemas de transferencia genética que operan entre las bacterias gram positivas pueden clasificarse en tres grupos. Un sistema está representado por los plásmidos cuya transferencia es una respuesta a señales químicas (feromonas) producidas desde el receptor y que accionan en las células donadoras la producción de componentes celulares de superficie que inducen el agrupamiento celular, incrementando el contacto entre donador y receptor (Clewel, 1990). Estos plásmidos, que pertenecen mayoritariamente a enterococos, tienen un tamaño medio de 25 kb y su transferencia es muy eficiente. Otro sistema está compuesto por transposones conjugativos (Clewel y Gawron-Burke, 1986). Estos elementos además de las funciones requeridas para su transposición, también tienen factores que les capacitan para su transferencia conjugativa. Suelen portar genes que confieren resistencia a antibióticos, de ahí su importancia en el estudio clínico. Su tamaño varía entre 15 a 20 kb, pero algunos son considerablemente mayores (>50 kb).

El tercer tipo de sistemas de transferencia está compuesto por los llamados plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador (Clewel, 1990). Estos plásmidos han sido identificados en el género *Streptococcus* y pueden transferirse a una gran variedad de hospedadores.

### 3.2.1. Feromonas sexuales en el género *Enterococcus*.

La conjugación mediada por una respuesta a estímulos “sexuales” (señales químicas o feromonas) está bastante extendida dentro del género *Enterococcus*. Los posibles receptores, libres de plásmidos, excretan muchas feromonas (Dunny et al., 1979), que desencadenan la transferencia desde el donador del plásmido relacionado, ya que diferentes hormonas estimulan la transferencia de diferentes plásmidos. Cuando el plásmido es adquirido deja de producirse la feromona relacionada, pero no otras que se puedan producir en el mismo receptor.

Un mismo receptor puede producir hasta 5 diferentes feromonas sexuales y un mismo donador puede portar plásmidos que responden a diferentes feromonas. Estos plásmidos suelen llevar genes que codifican para hemolisinas, bacteriocinas y resistencia a antibióticos y luz ultravioleta (Clewell, 1993). Algunos de estos plásmidos determinan la producción de péptidos que actúan como inhibidores competitivos de la correspondiente feromona (Clewell et al., 1987). Por ejemplo, células que portan el plásmido pAD1 excretan una sustancia denominada iAD1 que específicamente inhibe la habilidad para responder a la feromona cAD1. El propósito de tales compuestos pudiera ser prevenir la inducción por niveles de feromonas demasiado bajos, o bien la autoinducción por pequeñas cantidades de feromona endógena que puedan escapar a esta inhibición, o por otros péptidos que puedan dar reacciones cruzadas con su receptor relacionado (Clewell, 1993).

Muchas feromonas y sus inhibidores han sido caracterizados y todos ellos son hepta u octapéptidos con un residuo hidroxiaminoácido. (Mori, et al., 1984; 1986a; 1986b; 1987 y 1988).

Algunas feromonas son activas a concentraciones tan bajas como  $5 \times 10^{-11}$  M y, por ejemplo, células que portan el plásmido pCF10 son capaces de detectar tan poco como 1 ó 2 moléculas de CF10 (Mori, 1987).

Las feromonas inducen la formación de los agregados de conjugación estimulando la excreción por el donador de sustancias que favorecen el aglutinamiento celular. En el caso de los plásmidos pAD1 y pPD1, la respuesta de la conjugación inducida por las feromonas correspondientes resulta en la síntesis de sustancias proteicas microfibrilares en la superficie celular (Wanner et al., 1989). Estas sustancias se han llamado de agregación (SA) y se unen a las denominadas sustancias de unión (SU) de la superficie del receptor. Algunos estudios han mostrado que las SU podrían estar en parte hechos de ácido lipoteicoico (ALT) (Ehrenfeld et al., 1986).

Análisis por western blot usando anticuerpos obtenidos contra células inducidas que portan el plásmido pAD1 han demostrado que diferentes proteínas superficiales aparecen sólo tras la inducción. En el caso de pAD1 estas proteínas han sido identificadas como AD52, AD74, AD130, AD153 Y AD157 (Ehrenfeld et al., 1986 y Weaver y Clewell, 1990). Estas proteínas podrían ser las SA del donador. El gen estructural de la SA del plásmido pAD1 ha sido identificado y secuenciado (Galli et al., 1990) y se ha denominado *asa1*. El producto de este gen es una proteína de 1296 aa con un péptido señal de 43 residuos de aa.

Al igual que en el modelo de conjugación clásico, en la conjugación mediada por feromonas también existe un sistema de exclusión superficial que minimiza el intercambio de ADN plasmídico entre donadores homólogos. Una proteína inducible de 130 kDa ha sido identificada y asociada con la exclusión superficial (Dunny et al., 1985).

La producción de diversas feromonas por células libres de plásmidos permite especular si originalmente estos productos tenían una función no relacionada con la conjugación, y que este tipo de plásmidos hayan evolucionado para utilizarlas como señales que desencadenen la transferencia conjugativa (Clewell, 1981).

Es interesante cómo en el mundo bacteriano las feromonas están involucradas en la transferencia de plásmidos, aunque este hecho es sólo conocido

en enterococos. Sin embargo hay otros sistemas análogos, como ciertos tumores inducidos por plásmidos Ti de *Agrobacterium* que transfieren su ADN a plantas en respuesta a compuestos fenólicos específicos producidos en la planta.

Los estudios genéticos del plásmido pAD1 han sido llevados a cabo gracias a la preferente inserción del transposón Tn917 (que codifica resistencia a eritromicina) en dicho plásmido (Tomich et al., 1980). Inserciones en las regiones E, F, G y H (Figura 3) reducen o eliminan la transferencia de pAD1 (Clewell et al., 1991). Inserciones en la región H no evitan la formación de agregados, sin embargo la transferencia no es detectable. Es muy probable que esta región contenga genes específicos de transferencia. La formación de agregados no se afecta por inserciones en la región G, pero la transferencia se ve reducida notablemente, por lo que probablemente aquí se localicen genes relacionados con la estabilización de los agregados. El gen *asa1*, se encuentra dentro de la región F.

La región E parece estar relacionada con la regulación de la respuesta a la feromona (Ehrenfeld et al., 1986). Dentro de esta región posiblemente hay varios reguladores positivos, puesto que inserciones en esta región bloquean la habilidad para la agregación de proteínas superficiales y la transferencia de ADN. Recientemente ha sido identificado dentro de esta región un gen *traEI* (Pontius y Clewell, 1992) relacionado con una regulación positiva del resto de la región. Este gen está regulado negativamente por el producto del gen *traA*, puesto que mutaciones en dicho gen resultan en una agregación y expresión de proteínas de superficie constitutivas y la transferencia de plásmido ocurre a alta frecuencia (Ike y Clewell, 1984). Existen también evidencias de que *traA* está relacionado con la transducción de la señal de la feromona, pues mutaciones en dicho gen resultan en una menor producción de proteínas de superficie en relación a la cepa silvestre (Weaver y Clewell, 1990).

El gen *traB*, localizado en las proximidades de *traA*, está relacionado con la regulación de las feromonas endógenas, puesto que inserciones en él producen una

agregación constitutiva causada por una autoinducción de los niveles endógenos de cAD1 (Weaver y Clewell, 1990).

*traC* está situado entre *traA* y *traB* y es responsable de la sensibilidad a la feromona (Weaver y Clewell, 1990).

### 3.2.2. Plásmidos de amplio rango de hospedador en Gram positivas.

La transferencia conjugativa mediada por plásmidos de amplio rango de hospedador en bacterias gram positivas requiere contacto directo entre donador y receptor. Sin embargo la relativa baja frecuencia de transferencia observada en este sistema limita severamente el análisis de los agregados de conjugación así como el proceso de transferencia de ADN. La mayoría de los plásmidos de amplio rango de hospedador han sido estudiados en los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. En *Streptococcus* la mayoría de estos plásmidos codifican resistencias a macrólidos, lincosamidas y otros antibióticos. Además de compartir determinantes de resistencia a antibióticos similares, estos plásmidos suelen tener un tamaño que oscila entre 20 a 35 kb y a menudo muestran perfiles de restricción muy similares (Horand et al., 1985).

Los plásmidos de *Streptococcus* más extensamente estudiados han sido pIP501 y pAMB1. pIP501 tiene un tamaño de 30.2 kb y confiere resistencia a eritromicina y cloranfenicol (Forbes y Schaberg, 1983). pAMB1 confiere resistencia a los antibióticos del grupo de la estreptogramina B (MLS), y tiene un tamaño de 26.5 kb (Clewell et al., 1974). Las funciones de conjugación de pAMB1 sirven en bacterias gram positivas y en gram-negativas (Trieu-Cuot et al., 1988). Estos resultados sugieren cuestiones sobre la biología del proceso de transferencia en procariotas y sobre la diseminación de la resistencia a ciertas drogas entre bacterias no relacionadas filogenéticamente.

Una característica propia de estos plásmidos es su capacidad de movilizar plásmidos no conjugativos. Tanto pIP501 como pAMB1 pueden movilizar a

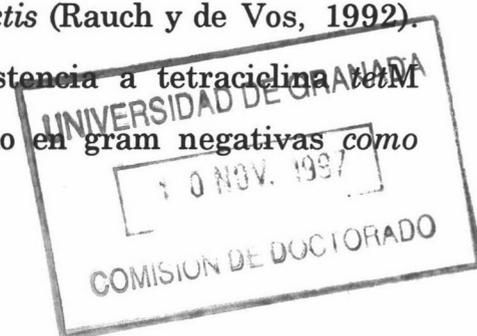
pMV158, un plásmido estreptococal pequeño que confiere resistencia a tetraciclina. Los mecanismos para la movilización no están claros, pero no parece que mecanismos de cointegración estén relacionados con el proceso (van de Lelie, 1990). De hecho, se ha encontrado en pMV158 una región denominada *mob* que es esencial para la movilización del plásmido (Priebe y Lacks, 1989). Esta secuencia podría ser análoga al *oriT* de plásmidos de bacterias gram negativas.

### 3.2.3. Transposones conjugativos.

Los transposones conjugativos son determinantes importantes de resistencia a antibióticos, sobre todo en bacterias gram positivas. Son elementos discretos de ADN que usualmente están integrados en el cromosoma bacteriano, pero pueden moverse de una molécula a otra.

Los transposones conjugativos son como los transposones en el sentido que se excinden de ADN y se integran en ADN, pero mediante un mecanismo algo diferente a otros transposones mejor estudiados como *Tn5* y *Tn10* (Bedzyk et al, 1992). Por ejemplo, los transposones conjugativos tienen un intermediario circular cerrado covalentemente y no duplican los sitios diana cuando se integran en el ADN. El mecanismo de excisión e integración se asemeja bastante a los de bacteriófagos atenuados, los cuales también tienen un intermediario circular. En realidad el análisis de secuencias de integrasas de algunos transposones conjugativos sugieren que son miembros de familias de integrasas  $\lambda$  (Kilic et al 1994).

*Tn916* (Franke y Clewell, 1981) fue el primer transposón descubierto en *Enterococcus faecalis*. Posteriormente han sido descubiertos otros tantos como *Tn5253* en *S. pneumoniae* (Ayoubi et al, 1991), *Tn3701* en *S. pyogenes* (LeBouguenec et al, 1990), *Tn5276* en *Lactococcus lactis* (Rauch y de Vos, 1992). Tanto *Tn916* como *Tn5253* portan un gen de resistencia a tetraciclina en gram negativas como (Burdette, 1991). *Tn916* también ha sido encontrado en gram negativas como



*Neisseria gonorrhoeae* y *Kingella* spp. (Swartley et al, 1993). Sin embargo también se han encontrado otro tipo de transposones conjugativos no relacionados con Tn916 en *Bacteroides* spp. (Halula y Macrina, 1990). Este transposón de *Bacteroides* tiene otras características diferentes a los de gram positivas, como la capacidad de insertarse en plásmidos corresidentes y movilizarlos en *cis*. Una extensa revisión sobre transposones conjugativos ha sido publicada recientemente (Salyers et al., 1995).

### 3.2.3.1. Mecanismos de transposición.

La mayoría de los trabajos sobre los mecanismos de excisión e integración de transposones conjugativos han sido realizados sobre Tn916 y Tn1545. Un modelo propuesto para esta transposición (Caparon y Scott, 1989) indica que, durante la excisión, se producen unos cortes que dejan cadenas simples de 6 nucleótidos en ambos extremos del transposón. Estos 6 nucleótidos se llaman secuencias acopladoras y se unen covalentemente para producir un intermediario circular una vez producida la excisión. Estas secuencias acopladoras no son homólogas, por lo que no se aparean unas con otras. Durante la integración dichas secuencias también siguen formando una región de bases no apareadas con el sitio o secuencia diana donde se van a integrar. Consecuentemente, la síntesis de ADN a través de esta región restaura la secuencia acopladora original. El mismo proceso ocurre en el segmento de ADN del cual se excindió el transposón y es por ello que la integración de Tn916 no conduce a una duplicación de la secuencia diana donde se integra.

Los genes de Tn916 que median la integración (*int*) y excisión (*xis*) han sido identificados y caracterizados (Flannagan et al, 1994). Ambos genes están muy cerca de uno de los extremos del transposón, por debajo de *tetM* y son transcritos en la misma dirección.

Se conoce muy poco sobre los detalles de la transferencia de ADN mediada por transposones conjugativos. Muchas evidencias sugieren que previo a la conjugación, el transposón se excinde en la bacteria donadora y no se asocia físicamente a otro ADN durante la transferencia. Más aún, cuando un transposón está presente en un plásmido autotransmisible, la transferencia del transposón es independiente de la del plásmido (Flannagan y Clewell, 1991). Durante la transferencia sólo se transfiere una cadena simple de ADN al receptor, de forma similar a lo que ocurre en el plásmido F de *E. coli*. Sin embargo es necesaria una síntesis de la cadena complementaria antes de producirse la integración en el genoma receptor (Scott y Churchward, 1995).

Este proceso de transposición conjugativa está regulado a varios niveles. Por un lado se ejerce una regulación a nivel de la excisión. Las moléculas de transposones intermediarios se transfieren rápidamente y no se acumulan (Scott y Churchward, 1995). Parece, por tanto, que los niveles de excisión limitan las frecuencias de transferencia. Por otro lado, existe una regulación coordinada de transferencia de múltiples copias de transposones. Durante la transposición conjugativa la frecuencia de cotransferencia de un segundo transposón del donador es más frecuente de lo esperado (Flannagan y Clewell, 1991). Esta excisión coordinada puede estar causada por un producto de la primera excisión o por un factor externo que estimula a todos los elementos excindibles (Scott y Churchward, 1995). La regulación también se ejerce desde las proteínas involucradas en la transposición y conjugación. Sin embargo la transposición no está probablemente regulada por un control negativo de los niveles de proteína Int por un represor, ya que la presencia de un transposón en la célula receptora no inhibe la transferencia de otro transposón diferente en la bacteria (Norgren et al, 1991). Otro posible mecanismo de regulación puede ser ejercido por la formación de proteínas Int truncadas. El ORF para Int podría codificar 3 proteínas dentro del mismo marco de lectura (Su et al, 1992). Las proteínas traducidas a partir de

estos transcritos podrían unirse a los extremos del transposón y secuencias diana e inhibir la excisión e integración.

#### 4. OTROS ELEMENTOS GENETICOS.

Durante mucho tiempo se ha considerado que el genoma bacteriano está compuesto exclusivamente por moléculas circulares de ADN. De acuerdo con esto, las células eucariotas contienen cromosomas lineales separados y los procariotas contienen un único cromosoma circular y algunas veces uno o más plásmidos circulares.

Sin embargo, dentro de los procariotas existen moléculas lineales de ADN. Existen dos tipos de moléculas o plásmidos lineales en procariotas: los llamados “plásmidos horquilla” con extremos covalentemente cerrados y moléculas lineales con proteínas unidas al extremo 5’ (Meinhardt et al., 1997 y referencias interiores). Los primeros son comunes en patógenos humanos como *Borrelia*. También se han encontrado en el hongo patógeno *Rhizoctonia solani* aunque se desconoce su función. Las moléculas lineales con proteínas unidas al extremo 5’ se han encontrado fundamentalmente en Actinomicetos y también en plantas y hongos. En estos últimos dichas moléculas están localizadas en orgánulos, generalmente en las mitocondrias (Meinhardt et al., 1997 y referencias interiores)

Los plásmidos con proteínas unidas en el extremo 5’ constituyen el mayor grupo. En actinomicetos normalmente son conjugativos y confieren fenotipos ventajosos (p.e. formación de antibióticos, degradación de xenobióticos, resistencia a metales y crecimiento en hidrógeno como única fuente de energía, etc).

Por el contrario, la mayoría de los plásmidos lineales en eucariotas son crípticos, si bien en algunas levaduras la presencia de estos elementos confieren un fenotipo asesino (“killer”) (Meinhard et al., 1997).

Junto con los virus y transposones, los plásmidos lineales con proteínas asociadas al extremo 5' constituyen un grupo que se ha denominado invertrones (Sakaguchi, 1990). En plantas y hongos estos plásmidos están localizados en orgánulos, normalmente mitocondrias (Griffiths, 1995 y Meinhardt y Rohe, 1993).

Independientemente de en qué organismo se encuentren, estos plásmidos tienen repeticiones terminales invertidas (TIR) que varían en tamaño (Meinhardt et al., 1997).

## 5. MOVILIZACION DE CROMOSOMAS Y PLASMIDOS NO CONJUGATIVOS.

Durante la transferencia conjugativa de algunos plásmidos autotransmisibles también se produce la co-transferencia (movilización) de ADN cromosómico y plásmidos no conjugativos. Movilización es el proceso por el cual un plásmido conjugativo realiza satisfactoriamente la transferencia de un ADN que no es autotransmisible.

Básicamente la movilización ocurre de dos formas. En una, el plásmido conjugativo y el ADN movilizado están separados físicamente durante el proceso. Esta movilización se denomina en *trans* (Kilbane y Malany, 1980). En la otra, la movilización ocurre gracias a la formación de un cointegrado entre el plásmido conjugativo y el replicón a movilizar. Es la movilización en *cis*. Los cointegrados, una vez completada la transferencia, se disocian por lo que a veces es bastante difícil demostrar su existencia. En *E. coli* la integración estable de un plásmido conjugativo dentro del cromosoma (episomas) produce cepas que transfieren frecuentemente genes cromosómicos.

Se debe hacer una distinción entre movilización en *trans* y movilización en *cis*. Un replicón no conjugativo se moviliza en *trans* cuando porta una región de transferencia (*oriT*) que es reconocida por las funciones *tra* de un plásmido conjugativo presente en la misma célula (Fürste et al., 1989) y por tanto su transferencia puede ser tan efectiva como la del plásmido conjugativo. La movilización en *cis* no implica necesariamente la presencia de una región de transferencia en la molécula no conjugativa, sino que gracias a la cointegración se transfiere de una célula a otra.

Los mecanismos por los que la cointegración ocurre son muy variados y se pueden clasificar en cuatro grupos (Reimmam y Haas, 1993): recombinación homóloga, transposicional, específica de sitio e ilegítima. Cada una de ellas opera de forma diferente dependiendo de las moléculas que intervienen en la formación de cointegrado.

## II. BIOFERTILIZANTES EN AGRICULTURA: INOCULANTES DE LEGUMINOSAS

Cada día es más frecuente el uso de microorganismos beneficiosos para el desarrollo y productividad de los cultivos agrícolas. Tanto si se trata de agentes para el control de enfermedades, como de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (hongos micorrícicos, bacterias productoras de hormonas, etc.), o bacterias fijadoras de nitrógeno en asociación con plantas, la producción de los respectivos inoculantes no está exenta de riesgos. Por un lado el inoculante debe incluir exclusivamente al microbio beneficioso, limitando la posibilidad de que el soporte utilizado pueda servir como vehículo diseminador de agentes contaminantes (p.e. patógenos) no deseables. Por otro, la aplicación masiva de microorganismos a un suelo de cultivo tiene, cuando menos, un impacto transitorio sobre las poblaciones microbianas nativas, a consecuencia del desplazamiento temporal de otros microorganismos que ocupen el mismo nicho

ecológico. Dicho impacto puede ser más severo si el microorganismo introducido muestra una buena supervivencia y se “naturaliza” en su nuevo ambiente, manteniendo un nivel de población relativamente elevado. La sucesiva aplicación de distintos tipos de inoculantes sobre un suelo puede llevar, a medio y largo plazo, a cambios importantes en las poblaciones microbianas de dicho suelo, repercutiendo sobre la fertilidad del mismo.

Para limitar este posible impacto ecológico de los inoculantes, se han diseñado distintos métodos de contención biológica, dirigidos a reducir en lo posible la supervivencia del microorganismo inoculante en el suelo. Sin embargo, la mayoría de estos métodos han sido diseñados para su funcionamiento en condiciones controladas, y pocos pueden presumir de su efectividad en condiciones naturales (Molin *et al.* 1993, Selbitschka *et al.* 1995, Herrera-Cervera *et al.* 1997).

Cuando el inoculante contiene un microorganismo modificado genéticamente (MMG), los posibles riesgos de su liberación al medio ambiente adquieren mayor relevancia, sobre todo desde el punto de vista ético y social. A las posibilidades antes mencionadas, se une la posible transferencia no deseada de los genes objeto de modificación hasta otros organismos. El establecimiento de un nuevo material genético en un ecosistema natural puede ocurrir de manera directa si el organismo en cuestión llega a establecer una población propia dentro de una comunidad microbiana, o de forma indirecta cuando el ADN del MMG se transfiera de forma permanente a otras poblaciones por conjugación, transformación u otro mecanismo. Del mismo modo, la adquisición de nuevo material genético por parte del MMG, y su interacción con el resto del genoma, puede resultar en nuevos fenotipos de difícil previsión.

En cualquier caso, tanto si el organismo está genéticamente modificado o no, su asentamiento en el ecosistema y las posibilidades de eventos de transferencia genética horizontal, pueden tener como consecuencia cambios en las poblaciones microbianas nativas y en sus interacciones.

## 1. LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS.

Las bacterias clasificadas dentro de la familia *Rhizobiaceae* tiene en común su capacidad de asociación con plantas. En algunos casos, como *Agrobacterium*, la interacción es de tipo patogénico, mientras que en el resto de géneros (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, Caballero-Mellado y Martínez-Romero, 1996; Jarvis *et al.*, 1997), comúnmente englobados como *Rhizobium*, se comparte la capacidad de establecer simbiosis mutualistas fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas. En estas simbiosis, la bacteria proporciona a la planta una fuente de nitrógeno exclusiva, el dinitrógeno atmosférico, en tanto que la planta aporta un nicho ecológico particular para la bacteria, los nódulos de las leguminosas. La importancia de estas simbiosis viene determinada no sólo por el volumen de nitrógeno fijado que aportan a la biosfera, sino también por la importancia agronómica de las leguminosas, que constituyen una de las principales fuentes de proteínas para la alimentación humana y animal.

La fijación simbiótica de nitrógeno tiene lugar en los llamados nódulos, originados generalmente en la raíz de la planta como consecuencia de su infección por la bacteria. En el nódulo, verdadero órgano fijador de nitrógeno, las bacterias se diferencian en unas formas especializadas, los bacteroides, que utilizan los compuestos fotosintetizados por la planta como fuente de energía para llevar a cabo la reducción del dinitrógeno atmosférico hasta amonio, que es exportado a las células vegetales e incorporado al metabolismo de la planta. Además de ser una forma ecológicamente limpia de fertilización nitrogenada para las leguminosas, lo es también para otros cultivos que pueden aprovechar el nitrógeno incorporado al suelo en forma de materia orgánica derivada de los restos vegetales de las leguminosas.

La formación del nódulo fijador de nitrógeno es un proceso muy complejo, compuesto de múltiples etapas diferenciadas, cada una de las cuales implica una

interacción de funciones complementarias de la bacteria y la planta. Esta sincronización se consigue a través de un continuo intercambio de señales moleculares entre ambos simbioses. La expresión de los genes de la nodulación bacteriana (*nod*, *nol*, *noe*) se induce por moléculas de tipo flavonoide exudadas por la planta, y tiene como consecuencia la síntesis por parte de la bacteria de nuevas moléculas señal, los factores de nodulación. Estos compuestos de tipo lipoligoligosacáridos, inducen en la raíz vegetal la formación de meristemas cuyo crecimiento organizado dará lugar al nódulo. A través de los llamados canales de infección, las bacterias acceden hacia el interior del nódulo, para terminar siendo endocitadas por células vegetales, en cuyo interior las bacterias se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno. La infección del nódulo requiere de genes bacterianos implicados en la síntesis de polisacáridos superficiales (genes *exo* para exopolisacárido, *ndv* para glucanos, *lps* para el lipopolisacárido). Además, en el bacteroide se expresan otros genes simbióticos que codifican para las proteínas necesarias para la reducción del dinitrógeno por la enzima nitrogenasa (genes *nif* y *fix*). Aunque menos conocidos, a cada señal de la bacteria responde la planta con la inducción de genes específicos necesarios para la simbiosis, y que en definitiva controlan y condicionan en todo momento el comportamiento de la bacteria.

En breve, el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas es un complejo proceso, cuyo estudio está proporcionando métodos de mejora de la eficiencia fijadora de estos sistemas, y por tanto de mejora cualitativa y cuantitativa de los cultivos de leguminosas. Los conocimientos adquiridos en estos estudios están además siendo aplicados a muchas otras interacciones, mutualistas y patogénicas, así como a investigaciones de biología del desarrollo en plantas y animales.

## 2. IMPACTO ECOLÓGICO DE LOS BIOFERTILIZANTES DE LEGUMINOSAS.

La inoculación de leguminosas con cepas de *Rhizobium* seleccionadas por su alta capacidad fijadora de nitrógeno, se viene realizando desde hace más de 100 años. Además, en los últimos tiempos se han propuesto distintas estrategias que permiten la mejora de las bacterias por métodos de ingeniería genética (Vlassak y Vanderleiden, 1997). Por ello, los inoculantes de leguminosas representan un excelente modelo de estudio del posible impacto medioambiental del uso de biofertilizantes en agricultura.

### *2.1. Naturalización de las cepas de Rhizobium introducidas en el suelo.*

Con demasiada frecuencia, la inoculación de leguminosas con cepas seleccionadas por su alta eficiencia fijadora resulta poco exitosa en términos de incremento de cosecha. Esto suele ser debido a la incapacidad de la cepa inoculada para ocupar un número suficiente de nódulos, número que está limitado por la planta, como para que se pongan de manifiesto los efectos positivos del inóculo. Sobre todo en aquellos suelos donde existe una población de rizobios nativos, bien adaptados a las condiciones del suelo, pero a menudo malos fijadores, la cepa introducida debe competir con dichos rizobios indígenas por ocupar los sitios de infección y nodulación. Si el inóculo es poco competitivo, y por tanto no ocupa un porcentaje suficiente de los nódulos que se formen, la eficacia de la inoculación queda frustrada. Este problema de la competitividad por la nodulación, es el que hoy por hoy limita de forma más directa la eficacia de inoculación de leguminosas.

La capacidad competitiva del inóculo depende de múltiples factores, tales como la cantidad de rizobios nativos en el suelo, la variedad vegetal utilizada, el tipo de inoculación, la respuesta quimiotáctica de la bacteria a los exudados

radicales y su posterior adhesión a la raíz, la cantidad y calidad de los polisacáridos de superficie producidos por la bacteria, y la capacidad de la misma de metabolizar los compuestos nutritivos exudados por las raíces, así como por la respuesta de la bacteria a los flavonoides vegetales inductores de los genes de la nodulación. Del mismo modo, las características físico-químicas del suelo, así como las condiciones climáticas y la presencia de antagonistas de *Rhizobium*, pueden influenciar esta capacidad competitiva de la cepa inoculada (revisado por Vlassak y Vanderleyden, 1997). Por tanto, una solución general al problema de la competitividad parece poco menos que imposible, si bien es más factible el encontrar soluciones de tipo local o regional.

Queda claro por tanto que la selección de una cepa de *Rhizobium* como inoculante no debe limitarse sólo a su alta eficiencia fijadora, sino que debe tener muy en cuenta su capacidad competitiva para ocupar el mayor número de nódulos posible. Esta mayor ocupación de los nódulos determinará también que las posibilidades de supervivencia de la cepa inoculada sean mayores. Hay que tener en cuenta que tras la senescencia del nódulo, las células bacterianas son liberadas al suelo, y si bien su viabilidad es muy variable, esta liberación contribuye de forma muy significativa al mantenimiento de los niveles de población. Por tanto, cuanto mayor sea la ocupación de nódulos por el inóculo, mayores serán sus posibilidades de persistencia y establecimiento en el suelo como saprófito. Por ello, puede resultar paradójico que el éxito del inoculante pueda aumentar las posibilidades de impacto sobre otras poblaciones indígenas del suelo. Si la cepa introducida se establece en niveles de población elevados, puede desplazar del suelo a otras bacterias, rizobios o no, que compitan por un mismo nicho ecológico. Esta paradoja en realidad se da en otros casos de bacterias rizosféricas beneficiosas para las plantas, cuyo éxito como inoculantes depende de su capacidad de multiplicación y colonización de la rizosfera.

## 2. 2. Transferencia genética horizontal en *Rhizobium*.

Una característica general de las especies de *Rhizobium* es la presencia de grandes cantidades de ADN extracromosómico, en forma de plásmidos, que en algunos casos representa hasta el 45% del genoma de la bacteria. En la mayoría de los casos se trata de 1 o 2 plásmidos de elevado tamaño, los plásmidos simbióticos o pSyms, denominados así porque en ellos se localizan buena parte de los genes necesarios para el establecimiento de la simbiosis y la fijación del nitrógeno. Por ejemplo, en *R. meliloti*, el microsimbionte de la alfalfa, coexisten 2 megaplásmidos simbióticos: el pSym 1 (1,400 kilobases), portador de los genes *nod*, *nol*, *nif* y *fix*, entre otros, y el pSym 2 (1,700 kb), donde se localizan muchos genes necesarios para la síntesis de exopolisacáridos. A menudo, los pSyms también contienen genes no simbióticos, generalmente relacionados con la síntesis o catabolismo de compuestos de tipo nutritivo (vitaminas, compuestos carbonados o nitrogenados poco usuales, etc.). Una revisión extensa sobre plásmidos en *Rhizobium* ha sido recientemente publicada (Mercado-Blanco y Toro, 1996). A pesar de todo ello, se desconoce la función de la mayor parte del material genético localizado en estos plásmidos, e incluso se especula con que en algunos casos puedan codificar funciones esenciales para la viabilidad de la bacteria. Es el caso de *R. meliloti*, bacteria en la que no se han podido curar completamente ninguno de los dos pSyms.

Además de los plásmidos simbióticos, algunas cepas son portadoras de otros plásmidos de elevado tamaño molecular, cuya función en la mayoría de los casos es desconocida, de ahí que se les denomine plásmidos crípticos o no simbióticos. Si bien la presencia de estos plásmidos puede afectar de forma variable al comportamiento simbiótico de la bacteria, en algunos casos se han localizado funciones relacionadas con el crecimiento y supervivencia en determinados ambientes, así como la producción de compuestos (p.e. melanina) de dudosa utilidad (Olivares, *et al.*, 1987).

Una característica común en todos los plásmidos de *Rhizobium* es la presencia en ellos de numerosas secuencias de inserción que pudieran estar relacionadas con la adaptación a determinados ambientes o con la movilidad lateral de dichos plásmidos. La abundante presencia de este tipo de elementos móviles ha quedado patente al completarse la secuenciación de uno de estos plásmidos, el pSym de la cepa de amplio espectro de hospedador *Rhizobium* sp. NGR234. En este plásmido, de unas 536 kb, las secuencias de inserción representan hasta un 18% del total del genoma plasmídico (Freiberg *et al.* 1997). Este hecho, unido a la organización en bloques de genes relacionados funcionalmente, flanqueados por secuencias de inserción, sugiere posibles mecanismos de evolución de estos plásmidos.

En algunos casos se ha demostrado la capacidad autotransmisible de plásmidos de *Rhizobium*, tanto simbióticos como crípticos (Mercado-Blanco y Olivares, 1993; Rao *et al.*, 1994). Esta característica se pone fácilmente de manifiesto en condiciones de laboratorio, aunque raramente en ensayos de microcosmos (Rao *et al.*, 1994). Sin embargo, los intentos de detección de transferencia de plásmidos de *Rhizobium* en condiciones naturales han sido infructuosos (Hirsch y Spokes, 1994). A pesar de ello, existen fuertes evidencias de que las cepas de *Rhizobium* intercambian ADN, sobre todo plasmídico, en condiciones naturales. Por ejemplo, es frecuente encontrar que un mismo plásmido se encuentre asociado a distintos fondos cromosómicos en poblaciones naturales (Schofield *et al.*, 1987; Young y Wexler, 1988). Y viceversa, cepas con el mismo fondo cromosómico pueden portar pSyms que confieren distintas características simbióticas (Laguerre *et al.*, 1993). Del mismo modo, una misma secuencia de inserción puede encontrarse en distintas especies de *Rhizobium* o *Agrobacterium* (Deng *et al.*, 1995; Vlassak y Vanderleyden, 1997).

Los rizobios sobreviven bien en el suelo en ausencia de su planta hospedadora, y de hecho parecen coexistir poblaciones compuestas por bacterias simbióticas y no simbióticas. Segovia *et al.* (1991) han estimado que la proporción

de rizobios simbióticos: no simbióticos puede ser de 1:40. La transferencia horizontal de la información simbiótica u otra información genética, seguida por reordenamientos del genoma, puede dar lugar a una población flexible y heterogénea, donde algunas células pueden adquirir la capacidad de establecerse en simbiosis o ganar competencia saprofítica. Dependiendo de las condiciones ambientales, ciertas subpoblaciones mejor adaptadas pueden multiplicarse y pasar a ser dominantes (Vlassak y Vanderleyden, 1997).

Actualmente se conoce muy poco sobre la magnitud del intercambio genético en el suelo, ni de los mecanismos por los que estas nuevas poblaciones florecen. En un campo de *Lotus corniculatus*, carente de rizobios simbióticos de esta planta, y donde 7 años antes se introdujo una cepa definida de *R. loti*, Sullivan *et al.* (1995) pusieron de manifiesto la aparición de nuevas cepas con una región simbiótica genéticamente idéntica a la de la cepa introducida. En este caso se trata de una región de ADN cromosómico de unas 400 kb, dado que *R. loti* carece de plásmido simbiótico, y el mecanismo de la transferencia parece haber sido el de conjugación (Sullivan y Ronson, 1997). Sin embargo, no está claro cuál ha sido la presión selectiva de estos eventos de transferencia, ya que las cepas transconjugantes, además de la capacidad simbiótica, también parecen haber adquirido un fenotipo prototrófico para determinadas vitaminas (Sullivan *et al.*, 1996).

Por tanto, las evidencias existentes indican que el intercambio genético entre rizobios es relativamente frecuente. Este posible intercambio genético también es sugerido por los estudios de taxonomía bacteriana. Eardly *et al.* (1995) pusieron de manifiesto la existencia de distintos alelos del gen codificante para el ARN ribosómico 16S entre cepas de *Rhizobium* que nodulan *Phaseolus* y que son genéticamente muy parecidas, a juzgar por otros tipos de marcadores taxonómicos. Estos autores hacían un llamamiento a la posible limitación que puede suponer el uso de los genes para 16S como marcador filogenético, al tiempo que especulaban con la posibilidad de que pueda darse transferencia y

recombinación de estos alelos entre distintas especies. No es éste el único caso que sugiere esta posibilidad. Una situación similar parece encontrarse en la clasificación del género *Aeromonas* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Sneath, 1993). De hecho se ha llegado al punto de clasificar como especies diferentes a cepas que poseen un alelo para el ARNr 16S idéntico, pero que no presentan suficiente homología de hibridación ADN-ADN (Amarger *et al.* 1997; E. Martínez, comunicación personal). Y puede que no les falte razón a los que sugieren la posibilidad de recombinación de regiones cromosómicas entre bacterias. Recientemente se ha descrito la transferencia conjugativa de genes cromosómicos de resistencia a tetraciclina en *Enterococcus faecalis* (François *et al.*, 1997) y en *Butyrivibrio fibrisolvens* (Scott *et al.*, 1997). Mientras que en el primer caso la transferencia parece estar mediada por un plásmido conjugativo, en el segundo parece que intervienen transposones conjugativos. En otro caso parecido, aunque de diseño experimental, se ha demostrado que la transferencia de genes cromosómicos mediada por plásmidos de tipo *cma*<sup>+</sup> (movilizadores de cromosoma) entre cepas de *Pseudomonas fluorescens* está favorecida en el ambiente rizosférico (Troxler *et al.*, 1997).

*OBJETIVOS*

---

*Rhizobium meliloti* GR4 es objeto de estudio en el Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín durante varias décadas. Mucho se ha elucidado sobre la biología, tanto en simbiosis como en vida libre, de esta bacteria y una breve revisión puede encontrarse a lo largo de esta introducción. La cepa GR4 fue originalmente aislada de un suelo de Granada, y se ha demostrado a lo largo de los años que es una buena fijadora de nitrógeno en simbiosis con alfalfa (*Medicago sativa*), y que además es una cepa muy competitiva para la nodulación.

Como todas las cepas de *R. meliloti*, la cepa GR4 porta dos megaplásmidos simbióticos: el pSym1 (1.400 Kb), que lleva los genes de la nodulación y fijación de nitrógeno, mientras que el pSym2 (1.700 Kb) lleva genes para la producción de exopolisacáridos y transporte de dicarboxilatos (Mercado-Blanco y Toro, 1996; Finan et al, 1986; Charles y Finan, 1991; Burkhardt et al 1997; Sobral et al, 1991). *R. meliloti* GR4, además de los pSyms, lleva dos plásmidos crípticos, pRmeGR4a y pRmeGR4b, de unas 170 y 205 kb, respectivamente (Toro y Olivares, 1986). Los genes *nfe* relacionados con la competitividad para la nodulación (Sanjuan y Olivares, 1989; Soto et al, 1993), así como *mepA*, necesario para la producción de melanina (Mercado-Blanco y Olivares, 1993a), han sido identificados en pRmeGR4b. Sin embargo, no hay funciones conocidas para pRmeGR4a, cuya mínima región (*oriV*, *repA*) de replicación ha sido clonada y secuenciada (Mercado-Blanco y Olivares 1993b y 1994). pRmeGR4a es autotransmisible por conjugación a otras especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium* y es capaz de movilizar a pRmeGR4b a bajas frecuencias. Se ha especulado que la movilización ocurre por formación de cointegrados, debido a recombinaciones entre regiones homólogas compartidas por ambos plásmidos (Mercado-Blanco y Olivares, 1993b).

Nada más se sabe sobre los mecanismos de transferencia conjugativa de pRmeGR4a y pRmeGR4b o de los plásmidos simbióticos. Un estudio más profundo de los mecanismos que operan en la transferencia y dispersión de

estos plásmidos, no solo en *R. meliloti* GR4, sino también en muchas otras especies de *Rhizobium*, sería bastante útil para llegar a comprender algo más de la estructura genética de las poblaciones de rizobios en relación a su biología, evolución y ecología.

En el presente trabajo, se ha abordado el estudio del posible impacto ecológico de la liberación al medio ambiente de inoculantes de leguminosas, utilizando la cepa GR4 de *R. meliloti* como modelo. El estudio se ha centrado en el impacto de la posible transferencia genética desde los inoculantes hasta poblaciones nativas del suelo, con los siguientes objetivos originales:

- 1) Reconocimiento de los mecanismos y factores que afectan a la transferencia conjugativa de los plásmidos no simbióticos de *R. meliloti* GR4.
- 2) Cuantificación de la transferencia real y teórica de los plásmidos de *R. meliloti* GR4 hasta poblaciones de rizobios nativos de un suelo.
- 3) Identificación del potencial de transferencia conjugativa de los replicones contenidos en la cepa GR4 de *R. meliloti*.

*MATERIAL Y METODOS*

---

## 1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Las cepas bacterianas así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se relacionan en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Características relevantes	Fuente o Referencia
<i>Rhizobium meliloti</i>		
GR4	cepa silvestre, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Este laboratorio
GRM6	GR4 curada del plásmido pRmeGR4b	Mercado-Blanco y Olivares, 1993b
GRM10	GR4 curada del plásmido pRmeGR4a	Mercado-Blanco y Olivares, 1993b
GRM8	GR4 curada de pRmeGR4a y pRmeGR4b	Mercado-Blanco y Olivares, 1993b
GRM8SR	GRM8 Sm <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup>	Mercado-Blanco y Olivares, 1993b
GRM10K	GRM10 con el cassette de Km en el gen <i>mepA</i> de pRmeGR4b	Este trabajo
GR4KL	GR4 con el cassette de Km en pRmeGR4b y un miniTn5 <i>lucOR-Sm/Spc</i> en pRmeGR4a	Este trabajo
GR4KG	GR4 con el cassette de Km en pRmeGR4b y un miniTn5 <i>gusA-Sm/Spc</i> en pRmeGR4a	Este trabajo
GR4KLR	RecA <sup>-</sup> , GR4KL con el gen <i>gusA</i> insertado en el gen <i>recA</i>	Este trabajo
GRM6LR	GR4KLR curada de pRmeGR4b	Este trabajo
GRM10KR	GR4KLR curada de pRmeGR4a	Este trabajo
GRM8R	GR4KLR curada de pRmeGR4a y pRmeGR4b	Este trabajo
2011	cepa silvestre, Sm <sup>r</sup> , Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Cassé <i>et al.</i> , 1979

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. (Cont.)**

Cepa	Características relevantes	Fuente o Referencia
GRT3	GR4 con una delección en el plásmido simbiótico 1, Nod <sup>-</sup>	Toro y Olivares, 1986
<i>Rhizobium</i> spp.		
A 11 a A 318	Cepas de <i>Rhizobium meliloti</i> aisladas de nódulos de <i>Medicago sativa</i>	Villadas <i>et al.</i> , 1995
RMS04, RMSA29, RMA01, SAP6, SANb y SAFa	Cepas de <i>Rhizobium meliloti</i> aisladas de nódulos de <i>Medicago sativa</i>	Villadas <i>et al.</i> , 1995
Rp 3 a Rp 104	Cepas aisladas de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Este trabajo
Rt 1 a Rt 115	Cepas aisladas de nódulos de <i>Trifolium repens</i>	Este trabajo
Rv11 a Rv 423	Cepas aisladas de nódulos de <i>Pisum sativum</i>	Dpto. Microbiología EEZ
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
C58	Cepa silvestre	Hynes <i>et al.</i> , 1985
GMI9023	C58 curada de plásmidos Sm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	Rosenberg y Huguet, 1984
C58 (pRme2011a)	C58 con el plásmido simbiótico 1 (pRme2011a) de <i>R. m.</i> 2011	Hynes <i>et al.</i> , 1985
At 104	C58 con el plásmido simbiótico 2 (pRmeSU47b) de <i>R. meliloti</i> SU47	Finan <i>et al.</i> , 1986
At 117	C58 con el plásmido simbiótico 1 (pRmeSU47a) de <i>R. meliloti</i> SU47	Finan <i>et al.</i> , 1986

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo (Cont.).

Cepa	Características relevantes	Fuente o Referencia
<i>E. 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 <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
DH5α	<i>supE44</i> , <i>DlacU169</i> , <i>f80</i> , <i>lacZDM</i> , <i>5hsdR171</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	B.R.L.
HB101	<i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5mtl1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
CC118 λ <i>pir</i>	Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE</i> <i>galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB</i> <i>argE recA1λ pir</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pUC18	Vector de clonación y secuenciación, Ap <sup>r</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC18Not	Vector de clonación, Ap <sup>r</sup>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pBSKS(+)	Vector de clonación y secuenciación, Ap <sup>r</sup>	Short <i>et al.</i> , 1988
pRK290	Vector de clonación derivado de RK2, Tra <sup>-</sup> Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup>	Ditta <i>et al.</i> , 1980
pLAFR1	pRK290 con la región <i>cos</i> del fago λ, Tc <sup>r</sup>	Friedman <i>et al.</i> , 1982

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo (Cont.).

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pSUP202	Vector de clonación	
	pBR325:: <i>mob</i> , Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
pHP45Ω	Plásmido portador del cassette de resistencia a Km, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Prentki y Krisch, 1984
pWS38	Vector de integración	
	<i>recA::gusA</i> de <i>R. meliloti</i> , Gm <sup>r</sup>	Selbitschka <i>et al.</i> , 1992
pSM5	Vector de integración de <i>gusA</i> en <i>R. meliloti</i>	Selbitschka <i>et al.</i> , 1995
pAN3	pSUP202 con un cassette de Gm <sup>r</sup> - <i>sacRB</i> , Tc <sup>r</sup>	Selbitschka <i>et al.</i> , 1992
pJM100	pSUP202 con el <i>oriV</i> de pRmeGR4a	Mercado-Blanco y Olivares, 1993b
pORI13	pSUP202 con el <i>oriV</i> de pRmeGR4b	Este trabajo
pTCR110	vector Mini-Tn5 con cassette <i>lucOR</i> -Sm/Spc	Cebolla <i>et al.</i> , 1993
pRK2013	Plásmido movilizador, Km <sup>r</sup>	Figurski y Helinski, 1979
RP4	Plásmido IncPα, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Pansegrau <i>et al.</i> , 1994
pME100	pUC18 con 3,5 kb de pRmeGR4b que contiene el gen de tirosinasa ( <i>mepA</i> )	Mercado-Blanco y Olivares, 1993a
pHC10	pSUP202 con el fragmento <i>PstI</i> de 3,5 kb <i>mepA</i> de pME100	Este trabajo
pHC20	pHC10 con el cassette de Km de pHP45Ω clonado en <i>KpnI</i> de <i>mepA</i> y en la misma dirección de transcripción	Este trabajo
pUCgus	pUC18Not con el fragmento de 2,3 kb <i>gusA</i> de pWS38 clonado en <i>HindIII</i>	Este trabajo
pUTSm/Spc	Vector de clonación con un Mini-Tn5, Sm <sup>r</sup> , Spc <sup>r</sup>	Herrero <i>et al.</i> , 1990

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo (Cont.).

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pSH10	pUTSm/Spc con el fragmento <i>NotI</i> de pUCgus clonado en <i>NotI</i>	Este trabajo
pRmOR65 a pRmOR1042	derivados de pLAFR1 que contienen regiones de ADN movilizables pertenecientes al genoma de <i>Rhizobium meliloti</i> GR4	Este trabajo
pJB3Tc19	Vector de clonación derivado de RK2, Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	Blatny <i>et al.</i> , 1997

## 2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.

### 2.1. Medios de cultivo para *E. coli*.

Para el cultivo rutinario de las cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio de Luria-Bertani (LB, Miller, 1972):

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agua (desionizada).....	1000 ml
Agar (para medio sólido).....	15 g

El medio se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 30 min.

Alternativamente, cuando se ha querido seleccionar *E. coli* frente a *R. meliloti*, se ha empleado ENDO AGAR, un medio selectivo para coliformes y

donde *R. meliloti* no crece, cuya preparación se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (DIFCO): se resuspenden 41,5 gramos del preparado en un litro de agua destilada o desionizada y se hierve hasta su completa disolución. A continuación se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C. Este medio se preparó siempre previamente a su utilización.

## 2.2. Medios de cultivo para *Rhizobium*.

Las cepas de *Rhizobium* fueron crecidas rutinariamente a 28 °C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'9 g
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar (medio sólido).....	15 g

Para algunos de los aislados de *Rhizobium* se utilizó medio YGT:

Triptona.....	5 g
Glucosa.....	15 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'6 g
Extracto de levadura.....	2'5 g
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar (medio sólido).....	15 g

Como medio mínimo (MM) para *Rhizobium* se ha empleado el medio de Robertsen et al (1981) modificado:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0'3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'15 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'05 g
FeCl <sub>3</sub> .....	0'006 g
NaCl.....	0'05 g
Glutamato sódico.....	1'1 g
Manitol.....	10 g
Biotina.....	0'0002 g
Pantotenato cálcico.....	0'0001 g
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar purificado (medio sólido).....	15 g

Todos los medios se prepararon ajustando el pH a 6'8-7'2, y se esterilizaron en autoclave a 115 °C durante 30 minutos.

### 2.3 Preparación y conservación de compuestos nutritivos específicos.

Las vitaminas (biotina y pantotenato) y aminoácidos se añadieron al MM a partir de soluciones concentradas estériles. En el caso de las vitaminas la solución madre estaba 1000 veces concentrada y en el caso de los aminoácidos la concentración fue de 100 veces. Todas las soluciones se prepararon en agua desionizada y esterilizadas por filtración. Las soluciones se conservaron a 4 °C (vitaminas) o a -20 °C (amoniácidos).

#### 2.4. Conservación de cepas bacterianas.

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos bacterianos adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80 °C.

#### 2.5. Antibióticos.

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o, en caso de la tetraciclina y del cloranfenicol, en agua-etanol al 50%. La esterilización de los antibióticos se llevó a cabo mediante el empleo de unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius), de 0'2 µm de tamaño de poro. La concentración final de los distintos antibióticos fue la siguiente:

---

Antibiótico	Concentración (µg/ml)			
	<i>R. meliloti</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Rhizobium spp</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina (Spe)	200	200	50	50
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	200	200	50	50
Tetraciclina (Te)	10	-	10	10
Sulfato de Kanamicina (Km)	200	-	100	50
Ampicilina (Ap)	-	-	-	200
Cloranfenicol (Cm)	-	-	-	50
Gentamicina (Gm)	160	-	-	20
Rifampicina (Rif)	20	50	-	-

---

### 3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ADN.

#### 3.1. Preparación de ADN plasmídico.

##### 3.1.1. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.

La obtención de ADN plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook et al. 1989). Para ello, las células de 1'5-3 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (15.000 rpm, 2 min) en tubos de microfuga. Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTANa<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8'0) a la que se adicionó inmediatamente antes de usar 5 mg/ml de lisozima, y se incubaron las células durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de solución II (NaOH 0'2 M, SDS 1%) recién preparada, se mezclaron ambas soluciones mediante inversión, y se incubó en hielo durante 5 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 150 µl de solución III (60 ml de acetato potásico 5M, 11'5 ml de ácido acético glacial y 28'5 ml de agua, pH 4'5), se agitó la mezcla por inversión del tubo y, después de incubar en hielo durante 5 min, se centrifugó (15.000 rpm, 2 min). El sobrenadante obtenido (aproximadamente 400 µl) se pasó a un nuevo microtubo, al que se adicionó un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1), y tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases por centrifugación (15.000 rpm, 5 min). La fase superior acuosa, que contiene el ADN, se transfirió a un tubo nuevo, se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20 °C, se incubó a -80 °C durante 30 min y a continuación se centrifugó (15.000 rpm, 15 min). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% preenfriado a -20°C y se centrifugó de nuevo (15.000 rpm, 3 min). Por último, después de eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 25 µl de tampón TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) .

Para eliminar el ARN, al volumen anterior se puede adicionar 1  $\mu$ l de ribonucleasa A preparada de forma concentrada (10  $\mu$ g/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7.5). De forma previa a su utilización, la solución concentrada de RNasa se calentó a 100 °C durante 15 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

La mezcla fenol-cloroformo (proporción 1:1) se preparó a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0.1% en Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0), y de una mezcla de alcohol isoamílico y cloroformo en proporción 1:24.

### 3.1.2. QIAprep Spin Plasmid ®.

A partir de un cultivo líquido de 1-5 ml de *E. coli*, las células se precipitaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 250  $\mu$ l del denominado tampón P1 previamente adicionado de RNasa A. Posteriormente, se adicionaron 250  $\mu$ l del tampón P2, mezclando suavemente mediante inversión del tubo. P2 es un tampón de lisis, y se recomienda mantener la reacción 5 min como máximo. A la mezcla anterior se adicionaron 350  $\mu$ l de tampón N3, se mezcló por inversión y se centrifugó (12.000 rpm) hasta la formación de un precipitado compacto (aprox. 10 min). Se recogió el sobrenadante y se aplicó a una columna Qiaprep que se centrifugó durante 1 min para retener el ADN plasmídico. A la columna se adicionaron 750  $\mu$ l de tampón PE y se centrifugó 1 min a 12.000 rpm, repitiéndose de nuevo esta operación para eliminar el exceso de tampón. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de 1.5 ml, se le adicionaron 50  $\mu$ l de agua bidestilada estéril, y pasado 1 min se centrifugó (12.000 rpm, 1 min) para recuperar el ADN.

### 3.2. Preparación de ADN genómico.

El aislamiento de ADN total se llevó a cabo a partir de 5 ml de cultivo en fase logarítmica de la cepa bacteriana elegida. Las células se centrifugaron a 15.000 rpm durante 3 min y se lavaron con 200 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0'1% en TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se resuspendieron en 300 µl de TE8. A la suspensión resultante se adicionaron 100 µl de una solución de SDS al 5% y 100 µl de una solución (2,5 µg/ml) de proteinasa K o pronasa predigerida en TE8. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 125 µl de ClNa 5M preparado en TE8 y se incubó en hielo durante 30 min. A la mezcla se le adicionó un volumen igual de fenol y se mezcló por vortex intenso durante 1 min, dejándola reposar y mezclando de nuevo por vortex durante otro min. Seguidamente se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio de microfuga. A continuación se extrajo nuevamente con un volumen de fenol, posteriormente con un volumen de fenol:cloroformo y finalmente con un volumen de cloroformo para eliminar los posibles restos de fenol. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se precipita con 2,5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20 °C mezclando por inversión e incubando durante 30 min. a -80 °C. Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 12.000 rpm durante 12 min y se retira el sobrenadante. Se lava con etanol al 70% preenfriado sin agitar ni mezclar y de nuevo se centrifuga durante 3 min. Se retira el sobrenadante y se seca el ADN al vacío durante 20-30 min. Finalmente se resuspende el ADN seco en 25-50 µl de TE8 y se añade 1 µl de RNAsa (1mg/ml). El ADN se conserva a -20 °C hasta su uso.

Alternativamente la extracción de ADN genómico se llevó a cabo con el sistema QIAGENE GENOMIC®. A partir de un cultivo líquido de 3 ml, de la cepa de *Rhiobium* en cuestión, las células se precipitaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml del denominado tampón B1 (adicionado de RNAsa 200 µg/ml). Posteriormente se adicionaron 20 µl de

solución de lisozima (100 mg/ml) y 45 µl de solución de Proteinasa K (20 mg/ml) agitando por inversión e incubando a 37 °C durante 30 min. A continuación se añaden 350 µl del tampón B2, mezclando suavemente mediante inversión del tubo y se incuba durante 1 h a 50 °C. Transcurrido este tiempo se aplica la muestra sobre una columna QIAGENE, previamente equilibrada con el tampón QBT, y se deja decantar por gravedad hasta que se elimine todo el volumen. Se lava la columna tres veces con 1 ml de tampón QC, dejando siempre que las soluciones decanten por gravedad. Finalmente se eluye el ADN con 2 x 1 ml de tampón QE y se recoge el ADN eluido en tubos de microfuga limpios. Se les adiciona 0,7 volúmenes de isopropanol y se centrifuga a 12.000 rpm durante 15 min. Se retira el sobrenadante y el precipitado de ADN se lava con 1 ml de etanol al 70 % preenfriado. El ADN se seca al vacío durante 10-15 min y se resuspende en 50-100 µl de tampón TE8 a 37 °C.

### 3.3. Determinación de la concentración de ADN.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al. (1989). La absorbancia ( $A_{260}$  nm y  $A_{280}$  nm) de las soluciones de ADN en agua o en TE8 se determinaron utilizando como blanco agua o TE8, respectivamente. La concentración se calcula respecto a los valores estándar de  $DO_{260} = 1$  para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble. La relación  $DO_{260}/DO_{280}$  se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1'8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook et al. (1989).

## 4. MANIPULACION DEL ADN.

### 4.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por los proveedores. (Boehringer, Mannheim, Alemania).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, y siempre que fuera factible, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo primero la digestión con una enzima, se limpió luego el ADN mediante tratamiento con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y, posteriormente, se resuspendió en agua, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

### 4.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 4.2.1. Electroforesis de ADN.

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa sumergidos en TBE (Tris 89 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 2'5 mM, BO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 89 mM, pH 8'2). La concentración de agarosa ha sido del 0'7% o del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V en cubetas de electroforesis GNA 200 (Pharmacia) y de 80 V en cubetas de electroforesis GNA 100 (Pharmacia). Como tampón de

carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0'25%, ambos preparados en agua. Se ha empleado 1  $\mu$ l de tampón de carga por cada 5  $\mu$ l de solución de ADN.

#### 4.2.2. Revelado de geles y fotografía.

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se revelaron sumergiéndolos en agua a la que previamente se adicionan unas gotas de una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml), durante 15-20 min. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara Polaroid MP-4 provista de filtro rojo y película Polaroid 667 o 665. Alternativamente, se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

#### 4.2.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción.

La determinación del tamaño molecular de fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del tamaño molecular relativo ( $M_r$ ) de moléculas patrón de ADN, frente a la movilidad relativa ( $R_f$ ) de dichas moléculas en gel de agarosa, esto es, la distancia de migración de cada una dividida por la longitud del gel. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *HindIII* o *EcoRI/HindIII*.

#### 4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se ha utilizado el sistema GeneClean II<sup>®</sup> (Bio 101 Inc., La Jolla, California, USA). Una vez identificado el fragmento de restricción que se desea purificar, se corta el gel de agarosa alrededor del mismo con un bisturí, se coloca en un microtubo y se trocea lo más homogéneamente posible. Al tubo se adicionan 4,5 volúmenes de NaI y 1/2 volumen de modificador-TBE<sup>®</sup> (mezcla concentrada de sales que neutraliza el efecto inhibitor del tampón TBE sobre la adhesión del ADN al glassmilk<sup>®</sup>; su uso es necesario, por tanto, sólo cuando la electroforesis se haya realizado en tampón TBE) y tras agitar en vórtex se incubó a 50 °C durante el tiempo necesario (aprox. 5 min) para que la agarosa se disuelva. Posteriormente, se adicionó glassmilk<sup>®</sup> (5 µl/5µg ADN; esta concentración debe aumentarse en 1 µl adicional por cada 0'5 µg en exceso de ADN). El glassmilk<sup>®</sup> consiste en una suspensión de una matriz de sílice en agua y es marca registrada de Bio 101 Inc., La Jolla, California. Después de mezclar, la suspensión se incubó en hielo, al menos 5 min, para permitir la adhesión del ADN a la sílice, agitando cada 1- 2 min para prevenir la precipitación de la misma. A continuación, se centrifugó (15.000 rpm, 5 segundos) para precipitar el ADN que permanece unido a la matriz, y se lavó 3 veces con solución New Wash<sup>®</sup> (mezcla específica de NaCl, Tris, EDTA, etanol y agua) preenfriada a -20 °C. Tras eliminar el último sobrenadante, el ADN se separó de la matriz de sílice eluyendo con 10 µl de agua bidestilada o tampón TE y calentando a 50 °C durante 2 min. Después de centrifugar (15.000 rpm, 30 s), el sobrenadante se recogió cuidadosamente y se colocó en un nuevo tubo. El último paso se puede repetir para eluir el ADN que pueda permanecer unido a la matriz de sílice.

#### 4.4. Manipulación de los fragmentos de restricción.

Los fragmentos de restricción, una vez aislados de los geles de agarosa y purificados pueden manipularse de distinta manera, de acuerdo con su utilización posterior.

##### 4.4.1. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación.

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado, se efectuó usando relaciones molares vector:inserto variables, dependiendo, por una parte, del tamaño de los fragmentos y, por otra, del tipo de extremos, romos o cohesivos, del fragmento en cuestión. En ambos casos, el volumen final de mezcla de reacción fue de 10-20  $\mu$ l. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima DNA ligasa del fago T4 y en el tampón indicado por los proveedores, incubando 3-4 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante una noche a 15 °C. Cuando se trataba de una ligación de extremos romos, se adicionó polietilenglicol (PEG 8.000) a una concentración final del 20%. En este último caso la temperatura de incubación fue de 20 °C.

##### 4.4.2. Relleno de extremos 5' protuberantes 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' de la cadena complementaria. Para ello, a 20  $\mu$ l de solución de ADN se adicionó 1  $\mu$ l de una solución 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 1 unidad de ADN polimerasa Klenow por  $\mu$ g de ADN. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se detuvo por adición de 200  $\mu$ l de tampón TE y extracción con 200  $\mu$ l de fenol-cloroformo. Se recogió el sobrenadante y el ADN se

precipitó con 0'1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5'2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua bidestilada estéril.

#### 4.4.3. Eliminación de extremos 3' protuberantes 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 adicionando a la solución de ADN (20  $\mu$ l) 1  $\mu$ l de una solución 2 mM de dNTPs y 1 unidad de ADN polimerasa del bacteriófago T4 por  $\mu$ g de ADN. La mezcla se incubó durante 15 min a 12 °C. La inactivación de la polimerasa se realizó mediante calentamiento a 70 °C durante 10 min y posterior adición de 200 $\mu$ l de tampón TE y extracción con 200 $\mu$ l de fenol-cloroformo. Se recogió el sobrenadante y la recuperación de ADN se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado anterior.

#### 4.5. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*.

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

A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo/100 de medio) y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0'6. Tras dejar enfriar en hielo, las células se centrifugaron (10.000 rpm, 5 min, 4 °C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl<sub>2</sub> 0'1 M preenfriada a 4 °C, y se centrifugó de nuevo (5.000 rpm, 5 min, 4 °C). A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0'1 M preenfriada a 4 °C y, tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, se centrifugaron (5.000 rpm, 5 min, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0'1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4 °C. Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 100

μl en tubos eppendorf preenfriados a 4 °C, que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación. A alícuotas de 100 μl de células competentes se adicionó ADN (0'05-0'5 μg) y la mezcla, después de su incubación en hielo un mínimo de 30 min, se sometió a un choque de calor de 42 °C durante 2 min. Posteriormente, la mezcla se incubó 5 min en hielo, se le adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C durante 60-90 min. Transcurrido este tiempo se sembraron alícuotas de 0'1 ml en placas de medio LB adicionado de los correspondientes antibióticos.

#### 4.6. Experimentos de hibridación ADN-ADN.

##### 4.6.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon.

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975). Para ello, después de la correspondiente electroforesis, el gel de agarosa se sumergió en una solución de HCl 0'25 M durante 20 min para someter el ADN a depurinación ácida. Tras lavar varias veces con agua destilada, se procedió a desnaturalizar el ADN mediante inmersión repetida (dos veces) en una solución de NaOH 0'5 M, NaCl 1'5 M, durante 15 min. Por último, el gel se incubó en una solución de Tris-HCl 0'5 M, NaCl 3 M, pH 7, mediante otros dos lavados de 15 min.

Después de lavar el gel con agua destilada, se colocó sobre una superficie plana y regular, habitualmente un cristal, cubierta con papel Whatman 3MM cuyos extremos, a modo de mecha, se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia 10xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7). Sobre el gel se colocaron, en este orden, un filtro de nylon y tres piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro y las piezas de papel Whatman se

lavarón primero con agua destilada y se saturaron después en tampón 20xSSC durante 30 min). Sobre este dispositivo se colocaron varias piezas de papel de celulosa y, sobre éstas, a su vez, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. El proceso de transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó, normalmente, durante una noche.

Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lavó con una solución de 2xSSC para eliminar restos de agarosa, se secó a temperatura ambiente y se expuso durante 5 min a luz ultravioleta, o alternativamente durante 20 min. a 120 °C en vacío, para fijar el ADN a la membrana.

#### 4.6.2. Marcaje de sondas de ADN.

El marcaje de sondas se ha realizado empleando el sistema no radiactivo de marcaje con digoxigenina, comercializado por Boehringer (Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste, en esencia, en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (100 °C, 10 min), una mezcla de hexanucleótidos, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y digoxigenina-dUTP como nucleótido marcado, que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica.

Los ADNs usados como sonda fueron tanto fragmentos de restricción purificados como ADN plasmídico linearizado. Se utilizaron, habitualmente, 100-300 ng de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción final de 20 µl. El tiempo de incubación fue siempre superior a 6 h a una temperatura de 37 °C.

#### 4.6.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva.

El filtro de nylon al que se había transferido el ADN se colocó en un rodillo

de hibridación al que se adicionaron 20-40 ml de solución de hibridación (5x SSC, N-lauril sarcosina 0'1%, SDS 0'02%, formamida 50% y agente bloqueante al 2%) y se incubó a 42 °C, al menos durante 3 h, en horno de hibridación (Amersham). Después de eliminar la primera solución, se adicionó de nuevo solución de hibridación suplementada con el ADN sonda desnaturalizado (100 °C, 10 min) y se incubó a la misma temperatura durante un tiempo mínimo de 6 h. Terminado el proceso de hibridación, el filtro se lavó primero 2 veces con una solución 2x SSC y SDS al 0.1% (v/v) durante 5 min, y después otras 2 veces con una solución 0.1x SSC y SDS al 0.1% (p/v) a 68 °C durante 15 min. Una vez lavado el filtro, se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos contra la digoxigenina. Estos anticuerpos están conjugados con fosfatasa alcalina que, en presencia de 3-(2'-spiroadamantano)-4-metoxi-4-(3'-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxietano (AMPPD), produce un compuesto inestable que, a su vez, se descompone formando el anión metil-meta-oxibenzoato, el cual emite luz a una longitud de onda de 477 nm. La emisión de luz se detectó poniendo en contacto el filtro con una película autorradiográfica Kodak X-Omat. El tiempo de exposición (5 min a 3 h) para la detección de las bandas de hibridación depende de la cantidad de ADN, del grado de homología de la sonda y de la eficiencia del marcaje de la sonda.

Para el revelado de la película se usó revelador Neutrol Liquid NE (Agfa) y fijador N FIX 172 (Negra) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

## 5. EXPERIMENTOS CON PLANTAS.

### 5.1. Plantas.

Las plantas utilizadas en este trabajo han sido:

*Medicago sativa* L. (alfalfa), variedad Aragón

*Phaseolus vulgaris* (judía), variedad Contender

*Trifolium repens* (trébol), variedad Huia

*Pisum sativum* (guisante), variedad Lincoln

*Glycine max* (soja), variedades Peking y Williams

### 5.2. Solución nutritiva.

Para cultivos hidropónicos se ha utilizado la solución de Rigaud y Puppó (1975).

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'200 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'200 g
KCl.....	0'200 g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'120 g
Na <sub>2</sub> FeEDTA.....	0'025 g
Agua destilada.....	1000 ml

#### Micronutrientes

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0'018 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0'022 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'030 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0'049 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'004 g

El pH se ajusta a 7,5 y se esteriliza a 115 °C durante 30 min.

### 5.3. Esterilización y germinación de semillas.

Las semillas de alfalfa y trébol fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2,5% de HgCl<sub>2</sub> durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron 6-7 veces con agua estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h. Posteriormente se extendieron en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido con agua estéril, colocado en placas Petri, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28 °C durante 24-48 h. Las semillas de judía, soja y guisante se esterilizaron en un matraz Erlenmeyer sumergidas en una solución de hipoclorito sódico (lejía) durante 7 min. en agitación. Posteriormente las semillas se lavaron varias veces con H<sub>2</sub>O estéril y se dejaron en imbibición durante unas 2 h, tras lo cual se extendieron sobre papeles de filtro humedecidos y se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 48 h.

### 5.4. Cultivos axénicos de plantas.

Para los cultivos hidropónicos de plantas de alfalfa y trébol se ha seguido la técnica descrita por Olivares *et al* (1980). Cuando las plántulas han alcanzado 1-2 cm de longitud, se colocan, previa descarificación, 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 μE/m<sup>2</sup>.s (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25 °C/18 °C de temperatura (día/noche).

Los cultivos axénicos de plantas como guisante, judía se realizaron en bolsas de plástico con soporte de papel. Sobre éste se colocaron las plántulas de forma que la raíz crece hacia el interior de la bolsa, mientras que tallo y hojas quedan fuera de la misma.

### 5.5. Ensayos de nodulación en alfalfa.

Cuando las plantas de alfalfa tienen 10-12 días se inoculan con 1 ml de una suspensión bacteriana de  $10^7$  cel/ml de la cepa en estudio. Al menos 12 plantas individuales (1 planta/tubo) se inoculan con cada cepa. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta. Se consideró que una planta estaba nodulada cuando en sus raíces existía al menos un nódulo visible. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta que todas las plantas estaban noduladas. La infectividad de una cepa se considera en función del tiempo de nodulación y del número de nódulos que forma.

### 5.6. Ensayos de competitividad en alfalfa.

Para los experimentos de competición de dos cepas se prepararon cultivos axénicos de plantas tal y como se describió anteriormente. Cultivos de las cepas en estudio fueron mezclados en proporción 1:1 e inoculados conjuntamente a una densidad final de  $10^6$  cel/ml de solución nutritiva. Transcurridos 15-20 días, se aislaron 25 nódulos al azar y se esterilizaron en superficie sumergiéndolos en una solución de  $\text{HgCl}_2$  al 0,25% durante 5 min, seguido de varios lavados con agua estéril. La ocupación de los nódulos por cada una de las cepas se determinó tras macerar cada nódulo por separado y sembrar una gota del macerado en placas de TY adicionadas o no con los correspondientes antibióticos. Alternativamente, cuando una de las cepas inoculadas era portadora del gen *gusA*, la determinación de la ocupación de nódulos por cada una de las cepas se realizó directamente sobre las raíces de las plantas. Para ello, las raíces fueron lavadas durante al menos 1 h en un vaso de precipitado colocado sobre un agitador magnético, tras lo cual se esterilizaron en superficie de la misma manera a la descrita anteriormente. A continuación se sumergieron en una

solución 1 mM de X-Gluc (sal de ciclohexilamonio del ácido 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- $\beta$ -D-glucurónico, Clontech, California, Estados Unidos de América; sustrato de la  $\beta$ -glucuronidasa, producto del gen *gusA*) en tampón fosfato pH 7,5 y se incubó durante al menos 12 h. a 37 °C. Aquellos nódulos que están ocupados por una bacteria que expresa actividad  $\beta$ -glucuronidasa pueden ser fácilmente distinguidos por el color azul que se forma como consecuencia de la precipitación del grupo cromóforo tras la degradación del X-Gluc.

## **6. AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Rhizobium* NATIVAS DE UN SUELO DE GRANADA.**

El aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium*, que han sido objeto de estudio en este trabajo, se realizó a partir de suelo de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada). Las características de dicho suelo son: 43% arena, 41% lima y 16% arcilla, pH 7,8.

Hay que hacer constar que las cepas bacterianas aisladas a partir de *Pisum sativum* no han sido obtenidas en este trabajo, sino que se encontraban disponibles en el Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín y fueron originalmente aisladas por P. Villadas.

### **6.2. Preparación de macetas.**

Se utilizaron recipientes de aproximadamente 2 Kg de capacidad en cuyo fondo se colocó un papel de filtro cortado a medida. Se autoclavarón durante 20 min. a 120 °C. Paralelamente también se esterilizó arena lavada y seca. Una vez este material preparado, se mezcló suelo y arena en proporción 2:1. Esta mezcla permite que, posteriormente, el aislamiento de los nódulos no sea tan dificultoso debido a la compactación del suelo. Con dicha mezcla se rellenaron los recipientes y se colocaron las semillas pregerminadas. A las macetas se les

adicionó agua cada 2-3 días y se mantuvieron en invernadero durante aproximadamente 30 días.

### 6.3. Aislamiento de las cepas a partir de los nódulos.

Las cepas nativas de *Rhizobium* que nodulan judía, guisante o trébol fueron aisladas a partir de los nódulos formados en las correspondientes plantas. Para ello, se extrajeron de las macetas las plantas en cuestión y sus raíces se lavaron con abundante agua, para eliminar restos de suelo, y los nódulos fueron separados de la raíz. De cada tipo de planta se cosecharon unos 1.000 nódulos que fueron mezclados aleatoriamente. Se tomaron unos 100 nódulos de cada tipo al azar y, tras ser esterilizados en superficie con una solución de  $\text{HgCl}_2$  al 0'25% durante 5 min, seguido de varios lavados con agua estéril, se maceraron individualmente y se sembraron en placas de TY o YGT. Finalmente se eligieron 50 aislados al azar de cada tipo para los posteriores estudios de caracterización.

### 6.4. Determinación del número más probable de rizobios en suelo (NMP).

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Vincent *et al* (1982). Para la determinación de rizobios que nodulan alfalfa y trébol se siguió el procedimiento de la dilución al quinto usándose 4 plantas por dilución y las diluciones 1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250, 1:31250 y 1:156.250. El cálculo del número más probable se realizó según las tablas de McCrady. El número de rizobios que nodulan judía y guisante se determinó mediante diluciones a la décima. En este caso, las plantas se cultivaron en bolsas de plástico con soporte de papel. Se utilizaron 4 diluciones por duplicado y en cada dilución 2 plantas. El número de rizobios se calcula en función del número de plantas noduladas en la dilución más alta.

## 7. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Rhizobium*.

### 7.1. Separación de plásmidos de alto peso molecular mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.

Las bandas de los plásmidos de los diferentes aislados fueron visualizadas mediante separación por electroforesis en geles horizontales de agarosa usando el método de Eckhardt (1978) y modificado por Wheatcroft *et al.* (1990). Partiendo de cultivos frescos en crecimiento logarítmico ( $DO_{600\text{ nm}}$  ente 0,2 y 0,5, dependiendo de la cepa) se centrifugan aproximadamente  $10^8$  células en tubos Eppendorf de 1,5 ml. durante 3 min. a 12.000 rpm. El precipitado celular se resuspende en 0,3 ml de sarcosil (N-laurilsarcosina) al 0,1%. Nuevamente se vuelve a centrifugar y el sobrenadante se retira con punta de micropipeta para dejar exclusivamente el precipitado celular. Las células se resuspenden con 40  $\mu\text{l}$  de la solución I (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, Ficoll (400.000) 20%) preenfriada y se dejan en hielo. Previamente se ha preparado un gel de agarosa al 0,6% y se guarda a 4 °C durante al menos 1 h. Se coloca el gel frío en una cubeta de electroforesis GNA 200 (Pharmacia) y se añade el tampón de electroforesis TBE (Tris 89 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  2'5 mM,  $\text{BO}_3\text{H}_2$  89 mM, pH 8'2) hasta el nivel del gel pero sin que cubra los pocillos. Una vez así, se cargan en los pocillos 25  $\mu\text{l}$  de la solución III (SDS 10%, xylencianol 0,001%) y se corre el gel a 100 V durante 15 min con la polaridad invertida. Transcurrido este tiempo se cubre el gel completamente con el tampón de electroforesis. A continuación se van cargando las muestras celulares de la siguiente manera: se toman 10  $\mu\text{l}$  de la solución II [(Tris 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,001%, Ribonucleasa A hervida (0,4 mg/ml), lisozima (1 mg/ml)] y se cambia la micropipeta para que marque 25  $\mu\text{l}$ , se añade los 10  $\mu\text{l}$  a las células resuspendidas en la solución I y se mezclan pipeteando 2-3 veces para homogenizar, tras lo cual se cargan los 25  $\mu\text{l}$  en el

pocillo. Una vez cargadas todas las muestras, se corre el gel a 40 V durante 45 min. y seguidamente a 125 V durante 3-5 h.

## 7.2. Técnicas moleculares de caracterización de los aislados.

### 7.2.1. RAPDs.

Se llevó a cabo con la ayuda del Dr. Hans-Volker Tichy del Biologische Sicherheit Mikrobiologisches & Gentechnisches Labor (TÜV Südwest Dienstleistungs-GmbH. Friburgo, Alemania).

La base de esta técnica consiste en una amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de diferentes zonas del genoma bacteriano usando como iniciadores de la amplificación cebadores de secuencias no específicas, es decir de una combinación al azar de nucleótidos. Para proveer de ADN molde de los diferentes aislados para la reacción se procedió a la obtención de lisados celulares. Haciendo uso de un palillo de dientes estéril se toman células de un cultivo en placa y se resuspenden las células adosadas al palillo en 20  $\mu$ l de solución de lisis (NaOH 0,05M; SDS 0,25%) en un tubo Eppendorf. En un baño con agua a punto de ebullición se introducen las células y se hierven durante 15 min. tras lo cual se le añaden 200  $\mu$ l de agua bidestilada estéril y se centrifugan a máxima velocidad durante 5 min.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 200  $\mu$ M de cada dNTP, 3  $\mu$ M (concentración final) de cebador (5'-CGGCAGCGCC-3'), 1U de *Taq* polimerasa (PHARMACIA) y 2  $\mu$ l de lisado celular en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Landgraf Varius V (Landgraf, Langenhagen, Alemania) en las siguientes condiciones:

1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 2 min.

45 ciclos de: 94 °C 40 sec.,

55 °C 40 sec.

1 ciclo final de extensión a: 72 °C durante 3 min.

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles horizontales de poliacrilamida. Los geles se preparan sobre placas GelBond PAG (PHARMACIA) con un espesor de 0,5 mm. Una de las placas se trató, cada 3-4 veces de uso, con PLOT concentrate (Serva) diluido en acetona, para facilitar la posterior separación del gel. Los geles se prepararon al 5% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 19:1) en tampón 2 X TBE conteniendo urea 7 M. La acrilamida se filtró a través de unidades tipo SCN (Nalgene), y se polimerizó con persulfato amónico (10% en agua bidestilada) y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) 6 mM. Entre placa y placa existe un desfase de 1 mm en el cual se colocan los pocillos. La electroforesis se llevó a cabo sobre una cubeta Multiphor II (PHARMACIA). Una vez polimerizado el gel se separa una de las placas y el gel se coloca sobre la cubeta de electroforesis evitando que queden burbujas atrapadas. Se cortan dos tiras de papel de filtro del tamaño del gel y se colocan, a modo de electrodos, de manera que pongan en contacto el gel con el tampón tanto en la parte superior como en la inferior del gel. Las muestras se preparan tomando 5µl del producto de amplificado o del producto de la restricción y añadiéndole 2 µl de solución de carga (7M urea, 2xTBE, 0'2% xilencianol). El gel se corre a 50 mA hasta que el xilencianol se ha introducido unos 6 cm dentro del gel.

Para el revelado de los geles de poliacrilamida donde se han separado los productos de amplificación se utilizó la tinción con plata descrita por Bassam y colaboradores (1991). El gel se fija en ácido acético (10%) durante 30 min. Posteriormente se lava 3 x 5 min en agua bidestilada y se incuba en agitación lenta durante 30 min en la solución de plata (20% de una solución NO<sub>3</sub>Ag al 0,5%; 0,15% de formaldehído). A continuación se lava el gel en agua bidestilada durante 20 s. Se sumerge el gel en la solución de revelado (100 ml de una

solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2,5%; 0,15 ml de formaldehído; 0,1 ml de una solución  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 0, 2%) durante 20 s y se agita. Se cambia de nuevo la solución y se sigue agitando hasta que las bandas sean visibles y el fondo todavía bajo. Para detener el revelado, se retira la solución de revelado y se añade ácido acético al 10% dejándolo durante 10 min. Transcurrido este tiempo se incuba el gel en glicerol al 5% durante 10 min y luego se cubre el gel con papel de celofán y se deja secar al aire.

## 7.2.2. Caracterización de los genes codificantes del ARN ribosómico 16S.

### 7.2.2.1. Análisis con enzimas de restricción (ARDRA).

Esta técnica consiste en la amplificación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S mediante cebadores específicos y el posterior análisis del producto del PCR mediante restricción con diferentes endonucleasas.

Los cebadores usados se denominan 41-f (5'-GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3') y 1488-r (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3') y cuyo nucleótido 5' se corresponde con la posición, respecto del gen 16S de *E. coli*, que designa su número y cuya dirección de amplificación va en el sentido 5'→3' de la cadena + (f) o en sentido 5'→3' de la complementaria (r). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 5 pmoles de cada cebador, 2  $\mu\text{l}$  de lisado, 1U de *Taq* polimerasa (PHARMACIA) en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  conteniendo 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . La reacción de amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

1 ciclo a: 94 °C durante 2 min.

10 ciclos a: 94 °C 40 sec.

60 °C 60 sec., bajando un grado en cada ciclo sucesivo.

72 °C 120 sec.

25 ciclos a:    94 °C 40 sec.  
                  50 °C 60 sec.  
                  72 °C 120 sec.  
1 ciclo a:       72 °C 3 min.

El ADN ribosómico amplificado es posteriormente sometido a un análisis de restricción con diferentes enzimas (*DdeI*, *HinfI*, *PstI*). Las restricciones se llevan a cabo a partir de 5 µl del amplificado y en las condiciones adecuadas para cada enzima de restricción. El análisis de los productos de restricción se llevó a cabo en geles de poliacrilamida realizados y revelados de la misma forma que se describió para el análisis de los RAPDs. En este caso se han incluido cepas tipo de diversas especies de *Rhizobium* como referencia.

Cuando se consideró necesario, se realizó un análisis más exhaustivo utilizando hasta 9 enzimas de restricción diferentes. Este análisis se realizó con la ayuda de la Dra. Noelle Amarger (Laboratoire de Microbiologie des Sols, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, Francia) y según se describe en Laguerre *et al.*, (1994).

#### 7.2.2.2. Amplificación y secuenciación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S.

De algunos de los aislados obtenidos se ha secuenciado parcialmente el gen que codifica para ribosómico 16S. En unos casos se secuenció la parte inicial del gen, en otros la parte media y en otros la parte final. En todos los casos, primero se amplificó completamente el gen y posteriormente se usaron diferentes cebadores en función de la zona del gen que era objeto de secuenciación. Así, para la parte inicial se usó el cebador 41-f (5'-GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3'), para la zona media se usó 358-f (5'-AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') y

para la zona final se usó 928-f (5'-TAAAACTYAAAKGAATTGACGGGG-3'), donde Y=CT y K=GT.

#### 7.2.2.2.1. Obtención del ADN para secuenciación.

El ADN usado para la secuenciación de los genes 16S se obtuvo mediante amplificación por PCR de igual manera que la descrita para los ARDRAs en el apartado 7.2.2.1. excepto que el volumen final fue de 50  $\mu$ l.

El ADN amplificado se purificó utilizando columnas S300 HR (PHARMACIA) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Se agita la columna para resuspender la resina y se coloca en un tubo Eppendorf centrifugándose a 3.000 rpm durante 1 min. Se carga la muestra de ADN y se coloca la columna en otro Eppendorf limpio y se centrifuga durante 2 min. a 3.500 rpm para eluir el ADN purificado.

Alternativamente, se procedió a la obtención de cadenas simples de ADN para su secuenciación. En este caso los cebadores utilizados para la amplificación del gen que codifica para el ribosómico 16S están marcados con biotina (1488-r) o con fluoresceína (41-f). Esta característica ha permitido separar las dos cadenas de los amplificados y llevar a cabo la secuenciación a partir de una cadena simple de ADN. Se ha hecho uso de unas partículas magnéticas (Dynabeads M-280 Streptavidine, Dynad®, Noruega) que tienen la capacidad de unir las partículas de biotina. El procedimiento es el siguiente: en un tubo Eppendorf se añaden 20  $\mu$ l de partículas magnéticas o dynabeads y 40  $\mu$ l de tampón BWB (ClNa 2M, Tris-ClH 10 mM, 1mM EDTA pH 8,0), se resuspenden las partículas en este tampón y el tubo se coloca en una gradilla con una tira magnética que atrae a las partículas recogéndolas a modo se precipitado. Con punta de micropipeta se recoge el sobrenadante y de nuevo se repite la operación de lavado con otros 40  $\mu$ l de tampón BWB. Posteriormente se añaden a estas partículas 40  $\mu$ l del producto del PCR y se mezclan agitando

suavemente el tubo. Se deja esta mezcla durante 15 min a temperatura ambiente para favorecer la unión de partículas y ADN. Transcurrido este tiempo se coloca de nuevo el tubo Eppendorf en la gradilla con tira magnética y se retira el sobrenadante. Se lava otra vez con 40  $\mu$ l de BWB y se retira el sobrenadante. Se añaden 40  $\mu$ l de tampón TE8 y 8  $\mu$ l de NaOH 0,1 M para desnaturalizar las cadenas de ADN y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se vuelve a colocar el tubo Eppendorf en la gradilla y una vez formado el precipitado se retira el sobrenadante (que lleva la cadena sintetizada a partir del cebador 41-f, es decir la cadena + del gen 16S). A las partículas magnéticas quedan unidas las cadenas de ADN simples sintetizadas a partir del cebador 1488-r, es decir la cadena - del gen 16S que es la que va servir de molde para la secuenciación. Las partículas de dynabeads se lavan de nuevo con NaOH (40  $\mu$ l) y posteriormente con BWB para dejarlas resuspendidas en 40  $\mu$ l de tampón TE8 hasta su secuenciación.

La secuenciación se ha llevado a cabo de dos formas. Por un lado las muestras purificadas con columnas S300 HR se han secuenciado en un secuenciador automático Applied Biosystem (Perkin Elmer), modelo 373 Stretch, con la ayuda de D. A. Lario (Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (0'6-1  $\mu$ g), obtenido directamente del producto de PCR, se le adicionó el cebador específico y agua bidestilada hasta un volumen final de 6  $\mu$ l.

Las muestras obtenidas a partir de las partículas magnéticas se han secuenciado en un secuenciador A.L.F. (Automated Laser Fluorescent) de PHARMACIA. La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el producto comercial AutoRead™ Sequencing Kit (PHARMACIA). Al ADN a

secuenciar se le adicionó el cebador específico y la determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de cebadores marcado con fluorocromos (41-f, 358-f o 928-f).

### 7.3. Análisis filogenético de los alelos 16S identificados.

Este análisis fue realizado con la ayuda de la Dra. Noelle Amarger (Dijon, Francia) y se llevó a cabo según Laguerre *et al.*, (1994). Para estimar las relaciones filogenéticas entre los genes 16S amplificados por PCR se calculó una matriz de distancias genéticas que se usó para construir un dendrograma basado en el algoritmo UPGMA.

## 8. ANALISIS DE ISOENZIMAS METABOLICAS.

Estos análisis fueron realizados con la ayuda de la Dra. Esperanza Martínez-Romero y el Dr. Jesús Caballero-Mellado, del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca)

### 8.1. Preparación de los extractos celulares.

Los aislados bacterianos se crecieron durante 24 h a 29 °C en 50 ml de medio PY (extracto levadura-peptona, Noel *et al.*, 1984). Las células se precipitan por centrifugación a 12.300 x g durante 10 min a 4 °C y se resuspenden en 0,4 ml de SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O 10mM conteniendo 300 µg de lisozima. Se dejan en incubación durante 10 min a temperatura ambiente tras lo cual cada suspensión se congela a -70 °C durante 15 min y descongela. Nuevamente se repite esta paso y se guardan a -70 °C hasta su uso.

## 8.2. Electroforesis enzimática (MLEE).

Se usaron los procedimientos descritos por Selander *et al.*, (1986) para preparar el gel así como las tinciones selectivas para cada enzima. Las enzimas usadas han sido: malato deshidrogenasa (MDH), enzima málico (ME), isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfoglucoasa isomerasa (PGI), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P), hexokinasa (HEX), fosfoglucomutasa (PGM), indofenol oxidasa (IPO) y aconitasa (ACO). El sistema de tampón usado fue Tris-Citrato, pH 8.0. Se determinó la movilidad electroforética de cada enzima y se asignaron tipos electroforéticos (Ets) diferentes a combinaciones diferentes de alelos para los 9 loci enzimáticos (Selander *et al.*, 1986). El nivel de diversidad genética para cada locus enzimático se calculó según se describe en Selander *et al.* (1986).

## 9. ENSAYOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA EN SUELO Y EN LABORATORIO.

### 9.1. Ensayos de microcosmos.

#### 9.1.1. Preparación de los microcosmos.

Los ensayos de microcosmos se han llevado a cabo tanto en suelo no estéril como en suelo estéril. La preparación de las macetas, que han servido de microcosmos, con suelo no estéril se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 6.2. de este Material y Métodos. En el caso de los microcosmos que llevaban suelo estéril, éste se esterilizó en autoclave varias veces a vapor fluyente a 100 °C durante 1 hora. Entre dos esterilizaciones se dejaron transcurrir al menos 24 horas.

#### 9.1.2. Inoculación del suelo.

Cuando se requirió, el suelo fue inoculado con una o varias cepas bacterianas. En cada caso, y dependiendo del número de células por gramo de suelo que se pretendía inocular, se partió de cultivos frescos que fueron precipitados, lavados y concentrados antes de su inoculación. De dichas suspensiones bacterianas se hicieron las diluciones adecuadas, en un volumen de agua equivalente al 60% de saturación del suelo, para inocular un número de células aproximado al deseado para cada caso. La inoculación se llevó a cabo mediante homogenización de las bacterias con el suelo. Periódicamente al suelo se le añadía agua para mantener la humedad aproximadamente al 10% (56% de saturación).

#### 9.1.3. Recuento de las células inoculadas en suelo.

Para el recuento de las células viables inoculadas se tomaron muestras de 2 gramos de suelo que fueron diluídas en 20 ml de pirofosfato sódico al 0,1% y se agitaron vigorosamente durante 2 h. a temperatura ambiente para permitir la resuspensión de las bacterias. Posteriormente el número de células viables se calculó sembrando diluciones seriadas de las muestras de suelo en MM adicionado de cicloheximida (150 µg/ml) y los correspondientes antibióticos.

#### 9.1.4. Determinación del número de transconjugantes aparecidos en suelo.

Cuando en el suelo fueron inoculadas cepas donadoras y receptoras, se determinó el número de transconjugantes tomando muestras de suelo y sembrando diluciones seriadas, de igual manera que se describió anteriormente, en placas de MM adicionadas de cicloheximida, de los antibióticos apropiados y de X-Gluc (20 µg/ml). Alternativamente, cuando se

quería detectar la parición de algún transconjugante a través de la planta, éstas fueron extraídas de las macetas y sus raíces fueron procesadas como se ha descrito previamente en el apartado 5.6 de este Material y Métodos.

## 8.2. Transferencia en condiciones de laboratorio.

### 8.2.1. Conjugaciones simples.

Se realizaron por mezcla de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}}$  entre 0,1 y 0,2) del donador con otro en fase exponencial tardía del receptor, en la proporción 1:1. Donador y receptor se centrifugaron en un tupo de microfuga y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) para eliminar restos de antibióticos. Finalmente la mezcla se resuspende en un pequeño volumen (20-50  $\mu\text{l}$ ) y es depositada sobre un filtro Millipore estéril de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de medio sólido (MM, TY o YGT, según cada caso) y se incuba durante 16-20 h. a 30 °C. Transcurrido este tiempo la mezcla de conjugación se resuspende en medio líquido estéril y se efectúan las correspondientes diluciones, sembrándolas sobre placas de medio selectivo.

En cruces *E. coli* (donador) x *Rhizobium* (receptor) la conjugación se llevó a cabo en placas de TY y los transconjugantes se sembraron en placas de MM (con los antibióticos correspondientes), para limitar el crecimiento de *E. coli*. En estos casos se usó la cepa movilizadora S17-1 (Simon *et al.*, 1983).

En cruces *Rhizobium* x *Rhizobium* la mezcla de conjugación se depositó en placas de TY o en placas de MM y los transconjugantes se sembraron en medio TY con los antibióticos apropiados.

En los cruces *Rhizobium* x *E. coli* la mezcla se depositó igualmente en placas de TY, pero los transconjugantes se seleccionaron en placas de ENDO-agar, un medio selectivo para coliformes, con los antibióticos necesarios.

Para calcular las frecuencias de transferencia se realizaron recuentos de los receptores, transconjugantes y donadores. Además también se realizaron cruces control para determinar las frecuencias de resistencia espontánea a los antibióticos selectivos en cada caso. En todos los casos, las frecuencias de conjugación se calcularon como el número de transconjugantes dividido por el número total de células receptoras.

#### 9.2.2. Conjugaciones triparentales.

La transferencia de plásmidos no autotransmisibles desde cepas no movilizadoras de *E.coli* a *Rhizobium* se realizó según el modelo de cruce tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979). La metodología seguida es idéntica a la de los cruces simples, pero en estos casos se prepararon mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones 1:1:1.



## RESULTADOS Y DISCUSION

## 1. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS NO SIMBIÓTICOS DE *Rhizobium meliloti* GR4.

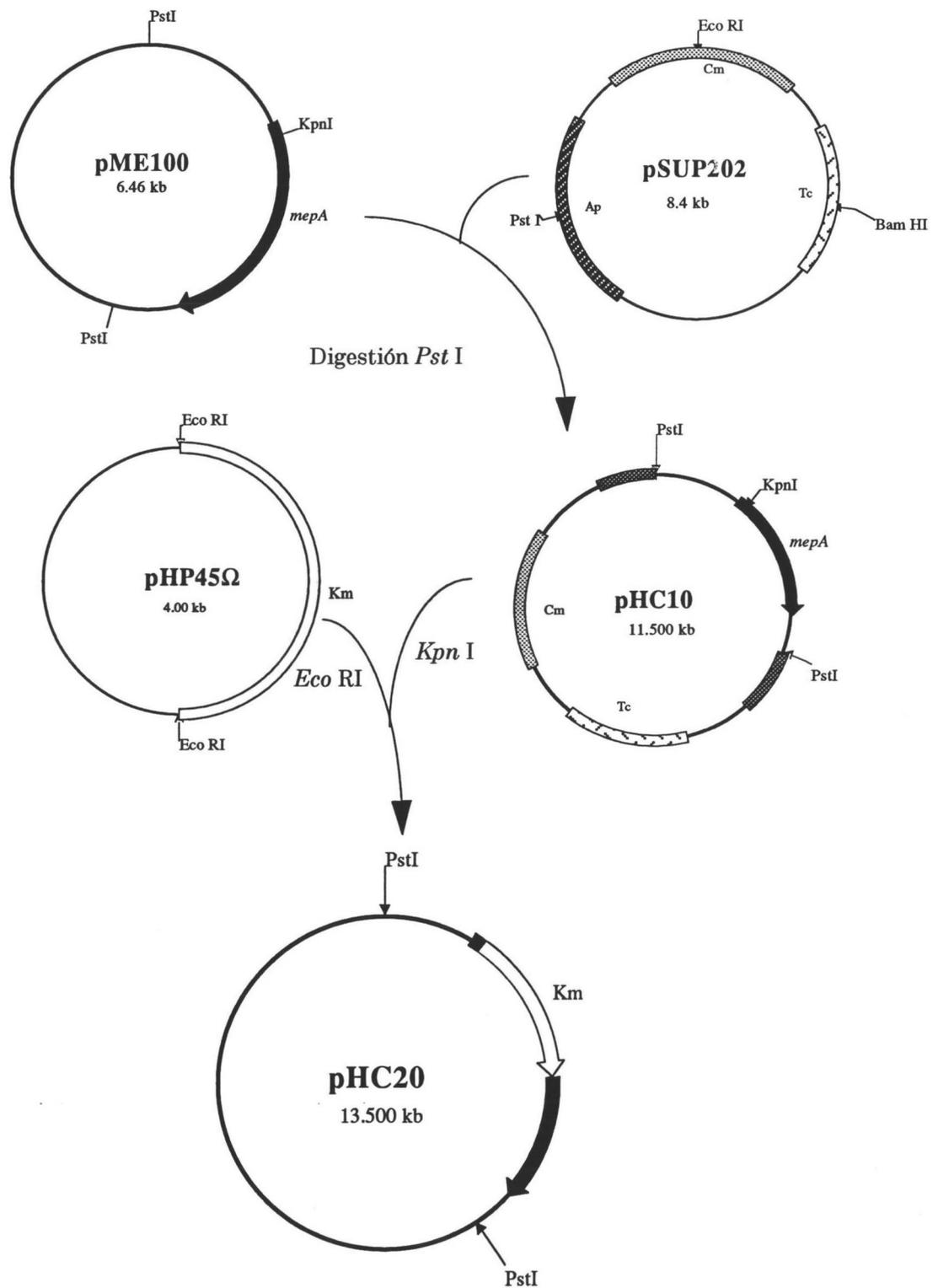
Estudios previos (Mercado-Blanco y Olivares, 1993b) habían mostrado que pRmeGR4a es un plásmido autotransmisible por conjugación y que, además, es capaz de promover la cotransferencia de pRmeGR4b a bajas frecuencias. En dichos estudios se propuso que la movilización de pRmeGR4b podría ocurrir por mecanismos de cointegración mediante recombinación homóloga. Sin embargo, debido a la falta de marcadores en ambos plásmidos, sólo se podía especular sobre dicha posibilidad. En este sentido, y con el fin de profundizar en el estudio de la transferencia de dichos plásmidos, se ha llevado a cabo la construcción de la cepa GR4KL, cuyos plásmidos no simbióticos han sido marcados para los estudios de transferencia. La construcción de esta cepa ha sido muy útil ya que permite seleccionar cada uno de los plásmidos independientemente y, de esta manera, averiguar la eficiencia y mecanismos de transferencia de cada uno de ellos. Consecuentemente, este marcaje plasmídico también permite estudiar qué factores pueden afectar a su transferencia conjugativa.

### 1.1. Construcción de GR4KL.

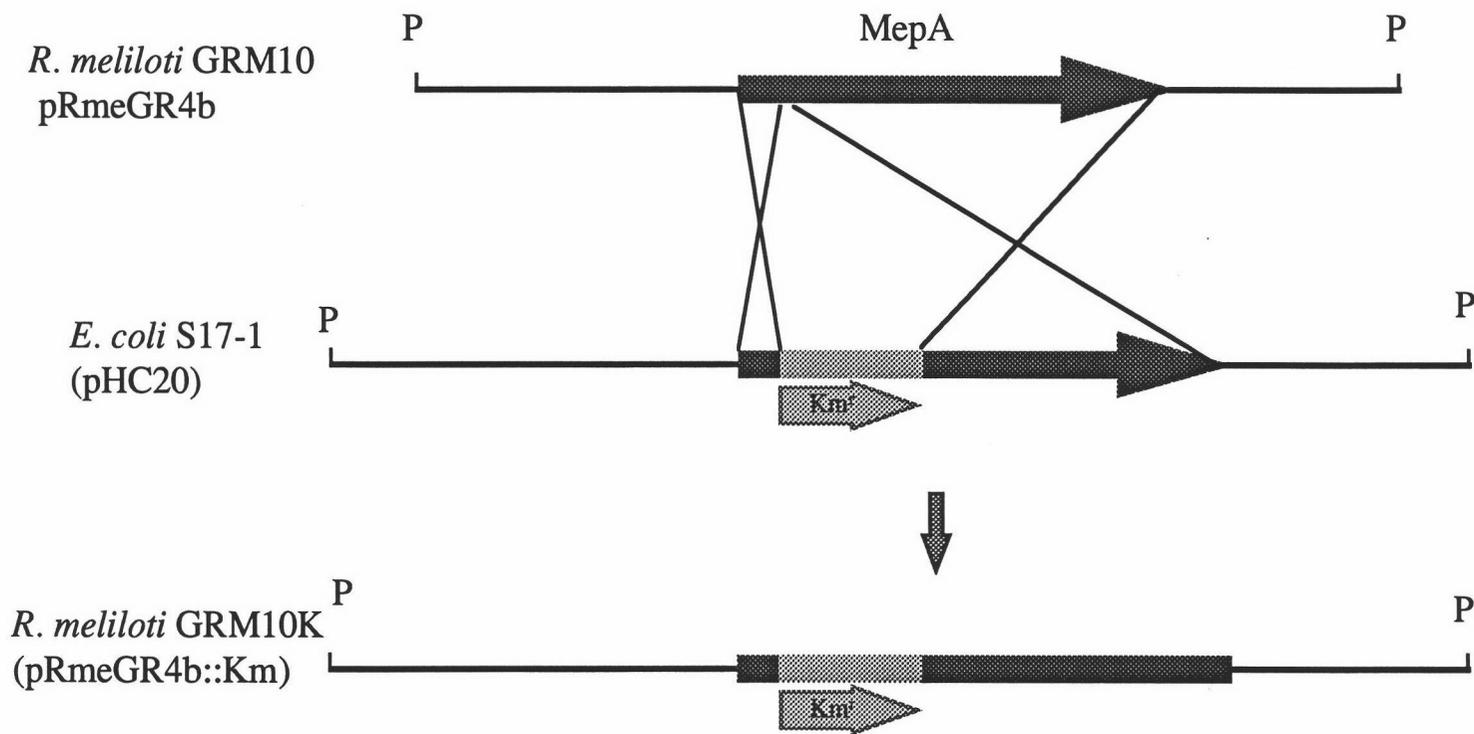
Para detectar la transferencia conjugativa de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b se introdujeron marcadores apropiados en ambos plásmidos. Se decidió realizar el marcaje del plásmido pRmeGR4b mediante la inserción, por reemplazamiento genético, de un gen de resistencia a Km dentro de la región que codifica para la síntesis de tirosinasa (*mepA*, Mercado-Blanco y Olivares, 1993a). El motivo de la elección de esta región para el marcaje de pRmeGR4b fue que dicha región no está relacionada con procesos simbióticos ni con la capacidad de crecimiento en vida libre de esta cepa. Para ello se clonó el

fragmento *Pst*I de 3,5 kb del plásmido pME100, que contiene la región que codifica para la tirosinasa (Mercado-Blanco y Olivares, 1993a), en el sitio *Pst*I del vector pSUP202, plásmido incapaz de replicarse establemente en *Rhizobium*, dando lugar al plásmido pHc10 (Figura 1.1). A continuación se clonó el fragmento *Eco*RI de pHP45-Ω, que contiene el cassette de resistencia a Km, en el sitio *Kpn*I de pHc10, dentro de la región que codifica para la producción de tirosinasa, dando lugar al plásmido pHc20. Con dicha construcción se transformaron células competentes de *E.coli* S.17.1 que se utilizaron como donadoras en conjugaciones con la cepa GRM10 (portadora del plásmido pRmeGR4b). Puesto que el vector pSUP202 (Figura 1.2) no puede mantenerse establemente en esta cepa, se seleccionaron transconjugantes resistentes a Km y sensibles a Tc. La presencia de este fenotipo en los transconjugantes sólo es posible si se ha producido una doble recombinación entre la región silvestre que contiene el gen productor de tirosinasa y el AND recombinante conteniendo el gen de resistencia a Km. La cepa resultante, incapaz de producir melanina (Mep<sup>-</sup>), se denominó GRM10K.

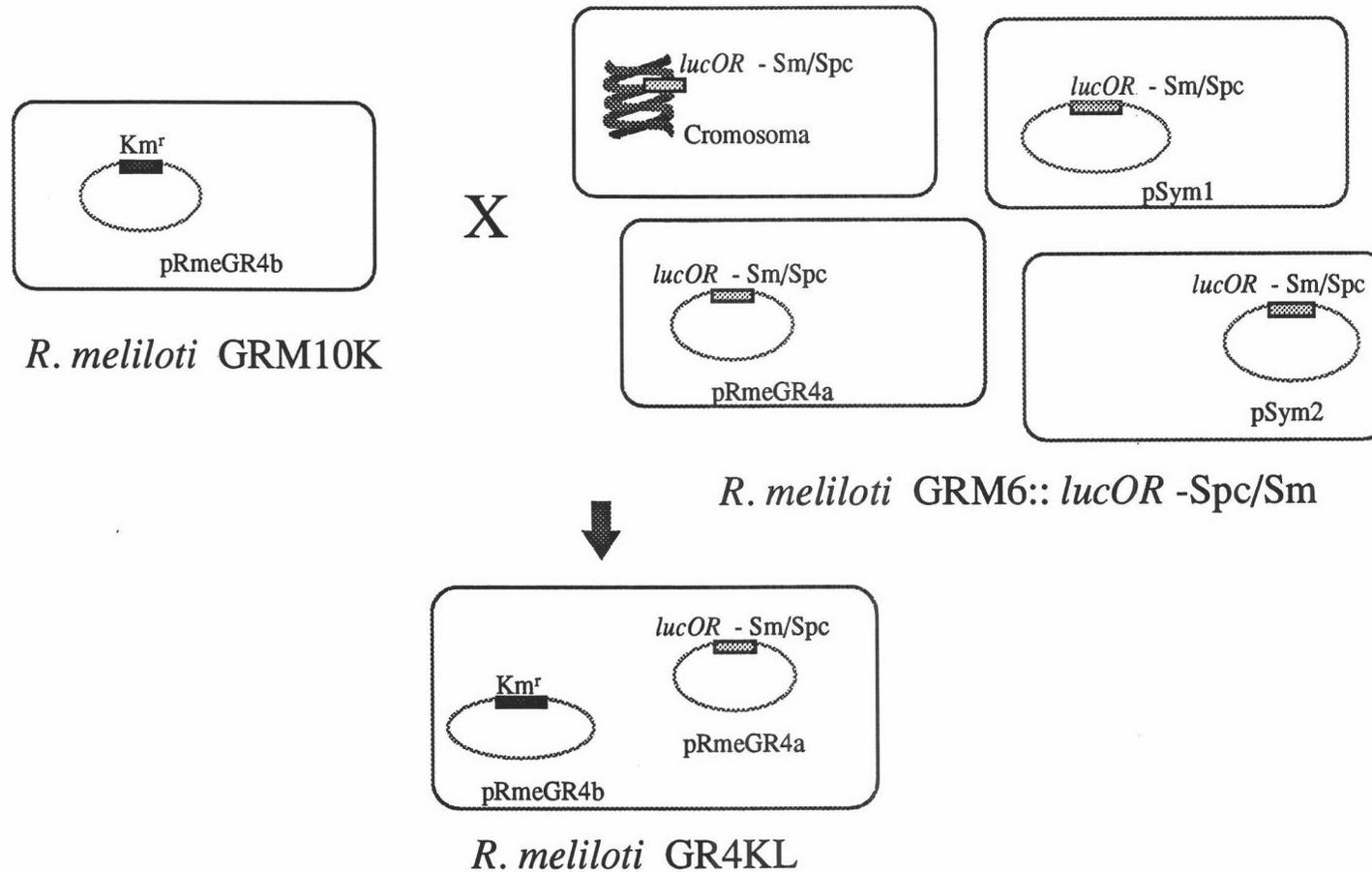
El marcaje del plásmido pRmeGR4a se realizó con un minitransposón miniTn5-*lucOR-Sm<sup>r</sup>/Spc<sup>r</sup>* procedente del plásmido pTCR110 (Cebolla *et al.*, 1993; Figura 1.3). La introducción de este marcador en pRmeGR4a se llevó a cabo en dos etapas. En primer lugar se realizaron conjugaciones entre la cepa CC118 *λpir*, conteniendo pTCR110, y *R. meliloti* GRM6, portadora de pRmeGR4a, con asistencia del plásmido movilizador pRK2013. Las mezclas de conjugación se sembraron en placas de MM seleccionando para estreptomina y espectinomicina. Como resultado de esta conjugación se obtienen una serie de transconjugantes marcados aleatoriamente con el miniTn5-*lucOR-Sm<sup>r</sup>/Spc<sup>r</sup>*. En un segundo paso, tales transconjugantes se usaron como donadores en masa en conjugación con la cepa receptora GRM10K y se seleccionó para la transferencia de la resistencia a estreptomina y espectinomicina a GRM10K. En principio esta transferencia sólo ocurrirá a



**FIGURA 1.1. Construcción del plásmido pHC20 para integración del Cassette de resistencia a kanamicina en el gen *mepA*.**



**FIGURA 1.2.** Integración del gen de resistencia a Kanamicina en el gen *mepA* de pRmeGR4b por reemplazamiento genético.



**FIGURA 1.3. Construcción de la cepa GR4KL con los marcadores introducidos en los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b.**

La población de GRM6 marcada selectivamente con el miniTn5 *lucOR* - Sm/Spc se conjugó con la cepa GRM10K, seleccionando aquellos transconjugantes que adquieren el marcador *lucOR* - Sm/Spc insertado en pRmeGR4a.

frecuencias detectables cuando el miniTn5 *lucOR-Sm/Spc* se haya insertado en pRmeGR4a y dicha inserción no afecte a sus funciones de transferencia pues hay que tener en cuenta que de la población de células donadoras que portan el minitransposón, sólo un pequeño porcentaje de la misma son realmente los que van a ser donadores del plásmido pRmeGR4a marcado.

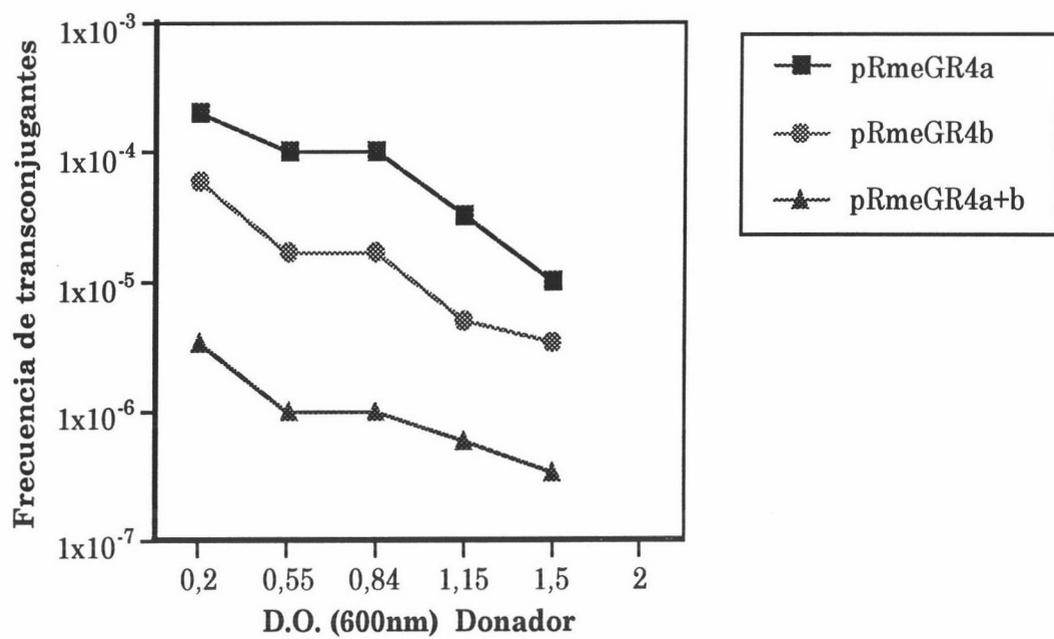
La cepa GR4KL es genéticamente idéntica a la cepa GR4, excepto para la producción de melanina (Mel<sup>-</sup>) y los marcadores introducidos en ambos plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b. En la Figura 1.3 se representa un esquema del proceso de construcción de GR4KL. Para comprobar que, efectivamente, se había reconstruido la cepa original con los dos plásmidos marcados, se llevó a cabo una separación de los plásmidos en geles de agarosa descrita en el apartado 7.1 del Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 1.4.

### 1.2. Transferencia conjugativa de los plásmidos crípticos de *R. meliloti* GR4.

Es conocido que la transferencia conjugativa requiere un estado metabólico activo del donador y del receptor. Por ello se estudió en primer lugar la eficiencia de transferencia conjugativa en relación con la edad del cultivo del donador, es decir, en relación con la fase de crecimiento. Para ello se llevaron a cabo cruces GR4KL x GRM8SR (una cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos no simbióticos y resistente a Sm y Rif) tomando cultivo del donador (GR4KL) a diferentes etapas de su crecimiento (desde el inicio de la fase logarítmica hasta la fase estacionaria) independientemente de la edad del cultivo del receptor, que siempre se usó en la fase estacionaria de crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}} = 1.0$ ). Como se observa en la Figura 1.5 las mayores frecuencias de conjugación para los plásmidos pRmeGR4a, pRmeGR4b, o ambos simultáneamente, se obtuvieron cuando el cultivo del donador se encontraba en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,2$ ). Se obtuvieron frecuencias de

transferencia inferiores en conjugaciones realizadas a partir de células donadoras tomadas de cultivos en la fase logarítmica tardía o en la fase estacionaria. Estas diferencias en cuanto a las frecuencias de transferencia en relación con la edad del cultivo del donador han motivado que en todas las conjugaciones realizadas con posterioridad, las células donadoras siempre provenían de cultivos en la fase exponencial de crecimiento.

La inclusión de marcadores selectivos en cada uno de los dos plásmidos, pRmeGR4a y pRmeGR4b, permitió determinar de forma clara la eficiencia de transferencia de cada uno de ellos. Para ello se llevaron a cabo cruces GR4KL x GRM8SR y GRM10K x GRM8SR. Usando GRM10K como donadora no se pudo detectar transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4b a la cepa GRM8SR. Cuando la cepa donadora fue GR4KL, los transconjugantes de GRM8SR, portando uno u otro plásmido o los dos simultáneamente, aparecieron a frecuencias diferentes (Tabla 1.1). Se obtuvieron entre 5 y 10 veces más transconjugantes para el plásmido pRmeGR4a que para el plásmido pRmeGR4b. Los transconjugantes portadores de ambos plásmidos aparecieron entre 5 y 10 veces menos que para el plásmido pRmeGR4b. La correlación entre la aparición de la resistencia a antibiótico y la presencia del plásmido correspondiente fue confirmada mediante visualización de los perfiles plasmídicos de un número representativo de transconjugantes. El hecho de no obtener transconjugantes cuando la cepa donadora fue GRM10K, claramente evidencia que el pRmeGR4b no es un plásmido autotransmisible a frecuencias detectables aunque si movilizable cuando pRmeGR4a está presente en la misma célula. Por otro lado, la aparición de transconjugantes conteniendo sólo pRmeGR4b, a partir de GR4KL como donadora, es indicativo de que la co-transferencia de este plásmido no ocurre mediante fenómenos de cointegración, como se había sugerido anteriormente (Mercado-Blanco y Olivares, 1993b), sino que la movilización ocurre probablemente en *trans*.



**FIGURA 1.4 . Relación entre la fase de crecimiento de la cepa donadora GR4KLy la eficiencia de transferencia conjugativa de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b hasta la cepa GRM8SR.**

Tabla 1.1. Movilización del plásmido pRmeGR4b por pRmeGR4a.

Cepa donadora	Medio	Frecuencias de transferencia		
		pRmeGR4a	pRmeGR4b	a+b
GRM10K	T.Y.	-	$< 10^{-7}$	-
GRM10K	G-MM	-	$< 10^{-7}$	-
GR4KL	T.Y.	$1 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$
GR4KL	G-MM	$2 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-6}$

Si la cotransferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b es independiente de mecanismos de cointegración mediados por recombinación, el uso de cepas deficientes en recombinación homóloga debe ser útil para discernir esta posibilidad. Por ello se llevó a cabo la construcción de una cepa *RecA*<sup>-</sup> derivada de GR4KL.

### 1.3. Construcción de una cepa derivada de GR4KL deficiente en recombinación homóloga.

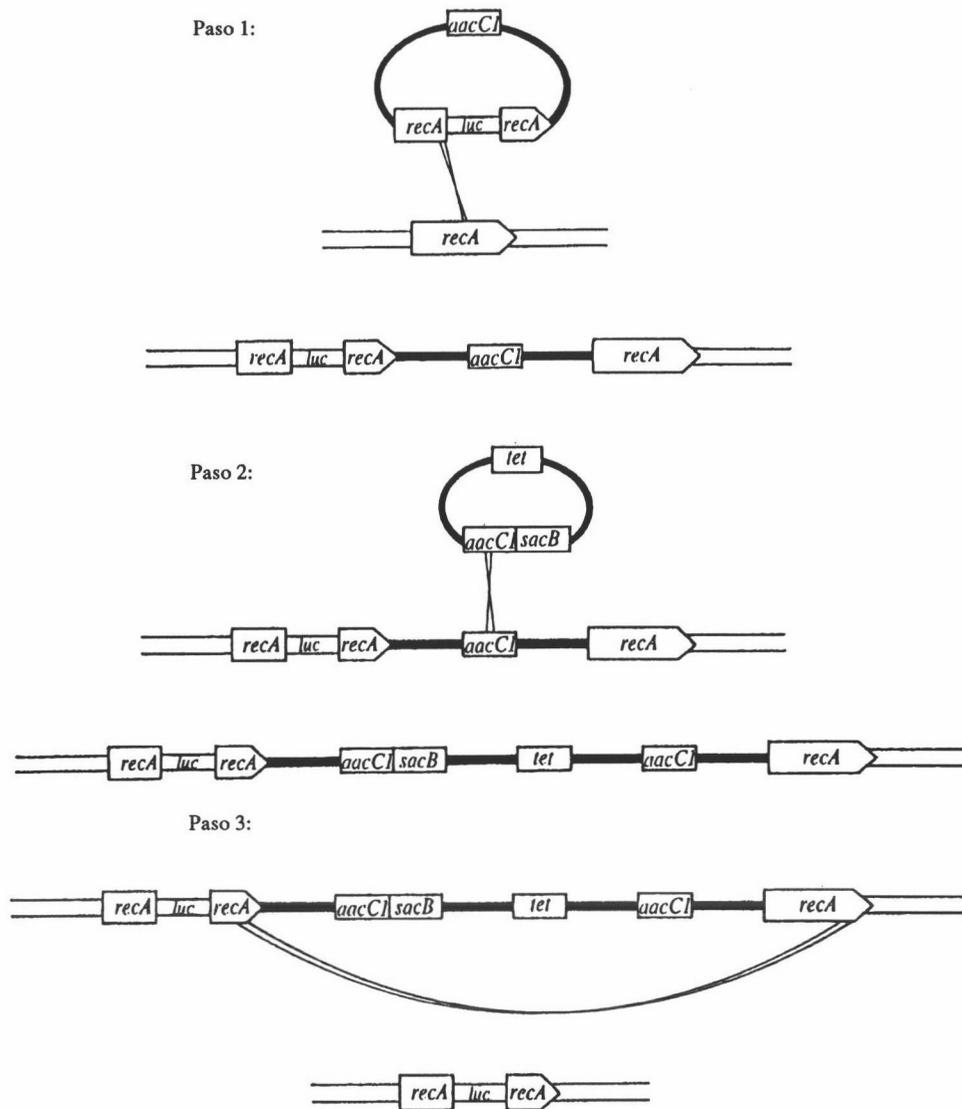
Para la construcción de una cepa GR4KL *RecA*<sup>-</sup> se ha seguido el procedimiento descrito por Selbitschka *et al.* (1992 y 1995). En la Figura 1.5 se representa un esquema de los sucesivos pasos seguidos hasta conseguir el fenotipo *RecA*<sup>-</sup>. El vector de integración para *recA* pWS38 se introdujo por movilización en la cepa GR4KL seleccionando para transconjugantes resistentes a gentamicina y que expresaran actividad β-glucuronidasa. Los transconjugantes merodiploides así seleccionados son portadores de una copia intacta del gen *recA* y de otra copia con el gen *gusA* interrumpiendo su secuencia. Posteriormente el plásmido pAN3, un derivado de pSUP202 que contiene el gen de resistencia a gentamicina y el gen que confiere sensibilidad a la sacarosa (*sacRB*), se introdujo por movilización en las cepas merodiploides en

las cuales se había integrado el plásmido pWS38. En este caso se seleccionaron transconjugantes resistentes a gentamicina (codificada por pWS38 y pAN3) y a tetraciclina (codificada por pAN3). Varias colonias Gm<sup>r</sup>-Tc<sup>r</sup> se cultivaron, en ausencia de presión selectiva, durante 24 h y posteriormente se sembraron en placas de TY conteniendo sacarosa. Puesto que las cepas bacterianas portando el gen *sacRB* no pueden crecer en medio que contiene sacarosa, es posible aislar clones que hayan perdido los dos plásmidos integrados mediante recombinación homóloga entre las 2 copias del gen *recA* y, por tanto, capaces de crecer en dicho medio. La cepa resultante se denominó GR4KLR. Paralelamente, y de igual manera que GR4KLR, se llevó a cabo la construcción de otra cepa con el gen *gusA* integrado en la zona adyacente al gen *recA*, utilizando en este caso el vector de integración pSM5 (Selbitschka *et al.*, 1995). La cepa resultante, denominada GR4KLC, es RecA<sup>+</sup>, y por tanto es idéntica a GR4KL, excepto para el marcador GUS introducido junto al gen *recA*.

La comprobación de ambos genotipos se realizó mediante hibridación de ADN total de GR4KLR y GR4KLC frente a ADN del plásmido pWS26 que se utilizó como sonda. Los resultados se muestran en la Figura 1.6.

Los microorganismos con mutaciones que afectan a los genes implicados en la recombinación homóloga del ADN presentan un fenotipo característico, son deficientes en recombinación y presentan una alta sensibilidad a las radiaciones UV debido a que no pueden activar la respuesta SOS de reparación de ADN dañado como consecuencia de las radiaciones.

Para comprobar que, efectivamente, GR4KLR es una cepa deficiente en recombinación se determinó la sensibilidad de la misma a radiaciones UV. Partiendo de cultivos crecidos a una densidad celular conocida (10<sup>9</sup> células por ml) se hicieron las diluciones adecuadas para sembrar, en placas de TY con los antibióticos correspondientes, alrededor de 10<sup>3</sup> células por placa. Una vez sembradas las placas éstas se iluminaron con luz UV a diferentes tiempos (0, 2, 5, 10 y 20 seg) y se incubaron a 30 °C durante 2-4 días en completa



(Tomado de Selbitshchka et al., 1992)

**FIGURA 1.5.** Procedimiento llevado a cabo para la construcción de la cepa de *R. meliloti* GR4KLR mediante vectores de integración *recA*. En este caso se utilizó el gen *gusA* en lugar del gen *luc*.

oscuridad, tras lo cual se llevaron a cabo recuentos del número de células, calculándose el porcentaje de células supervivientes. Los resultados se muestran en la Figura 1.7. Como puede observarse, con tan solo 2 s de exposición la cepa GR4KLR presentó una supervivencia nula, mientras que GR4KL, GR4KLC o GR4 presentaron un alto porcentaje de supervivencia. A mayores tiempos de exposición la supervivencia de las cepas RecA<sup>+</sup> también van disminuyendo como consecuencia de los graves daños ocasionados al ADN cuando la exposición es continuada. Estos resultados confirman el fenotipo de sensibilidad a UV de la cepa GR4KLR.

Por otro lado también se comprobó la incapacidad de GR4KLR para llevar a cabo la recombinación homóloga. Para ello se determinó la frecuencia de integración de pJM100, un plásmido derivado de pSUP202 (vector incapaz de replicarse en *Rhizobium*) que tiene clonado el origen de replicación de pRmeGR4a de *R. meliloti* GR4 (Mercado-Blanco y Olivares, 1993b). Si bien pJM100 es capaz de replicarse autónomamente en *Rhizobium*, dado que porta el *oriV* del plásmido pRmeGR4a, no puede hacerlo en la cepa GR4KL debido a su incompatibilidad con el propio pRmeGR4a. Bajo una apropiada selección de antibióticos, pJM100 no puede ser mantenido en GR4KLR a menos que ocurra la integración del mismo en pRmeGR4a por recombinación homóloga entre las regiones comunes del *oriV*. Cuando pJM100 se transfirió por conjugación a GR4KLR no se obtuvieron transconjugantes, mientras que en GR4KL los transconjugantes aparecieron a frecuencias de  $10^{-6}$ . Estos resultados indican que no existe integración de pJM100 en la cepa GR4KLR, posiblemente porque esta cepa está impedida para la recombinación homóloga del ADN.

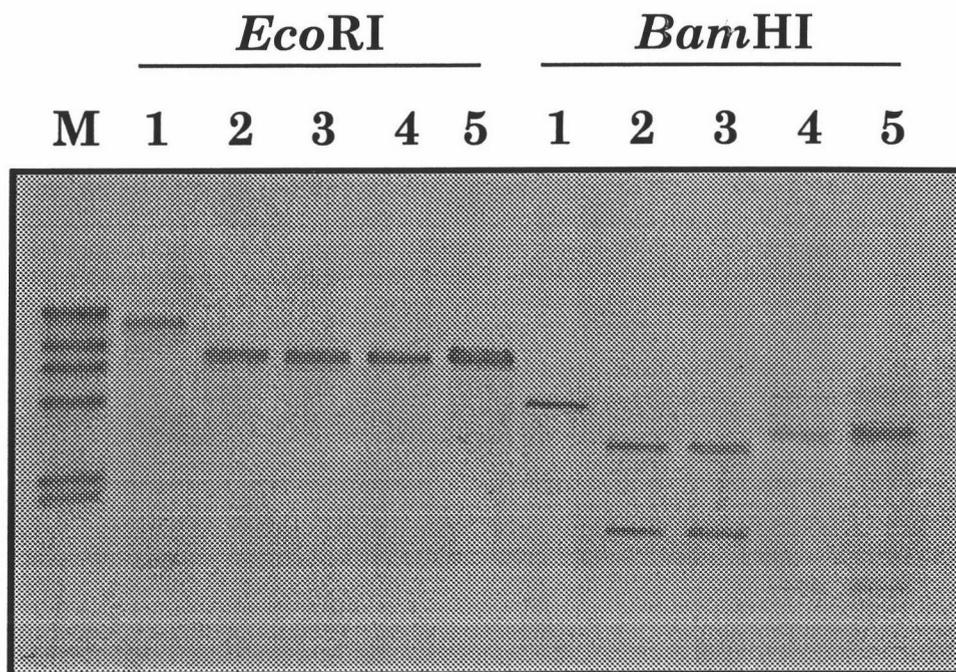
1.4. Transferencia conjugativa de los plásmidos no simbióticos desde GR4KLR.

Se llevaron a cabo cruces GR4KLR x GRM8SR, GR4KL x GRM8SR y GR4KLC x GRM8SR para volver a comprobar las frecuencias de transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b, así como la cotransferencia de los mismos, en fondos genéticos RecA<sup>-</sup> o RecA<sup>+</sup>. Los ensayos de transferencia se realizaron tanto en MM+glutamato como en TY. Como puede observarse en la Tabla 1.2, las frecuencias de conjugación para los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b desde GR4KL, GR4KLC y GR4KLR fueron bastantes similares. El hecho de que la frecuencia de cotransferencia de pRmeGR4a y pRmeGR4b desde GR4KLR sea similar a las frecuencias desde los otros donadores es indicativo de que dicha cotransferencia es independiente de la cointegración de ambos plásmidos por mecanismos de recombinación, y si los hay, éstos son independientes de *recA*. Es muy probable, por tanto, que la cotransferencia de pRmeGR4b mediada por pRmeGR4a ocurra por un mecanismo de movilización en *trans*.

**TABLA 1.2. Frecuencia de transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b desde cepas RecA<sup>+</sup> o RecA<sup>-</sup>.**

Cepa	Frecuencia de conjugación*		
	<u>pRmeGR4a</u>	<u>pRmeGR4b</u>	<u>a+b</u>
GR4KL	6,8x10 <sup>-5</sup>	6,5x10 <sup>-6</sup>	1,3x10 <sup>-6</sup>
GR4KLC	3x10 <sup>-5</sup>	2,5x10 <sup>-6</sup>	1,7x10 <sup>-7</sup>
GR4KLR	1,5x10 <sup>-5</sup>	1,5x10 <sup>-6</sup>	2,8x10 <sup>-7</sup>

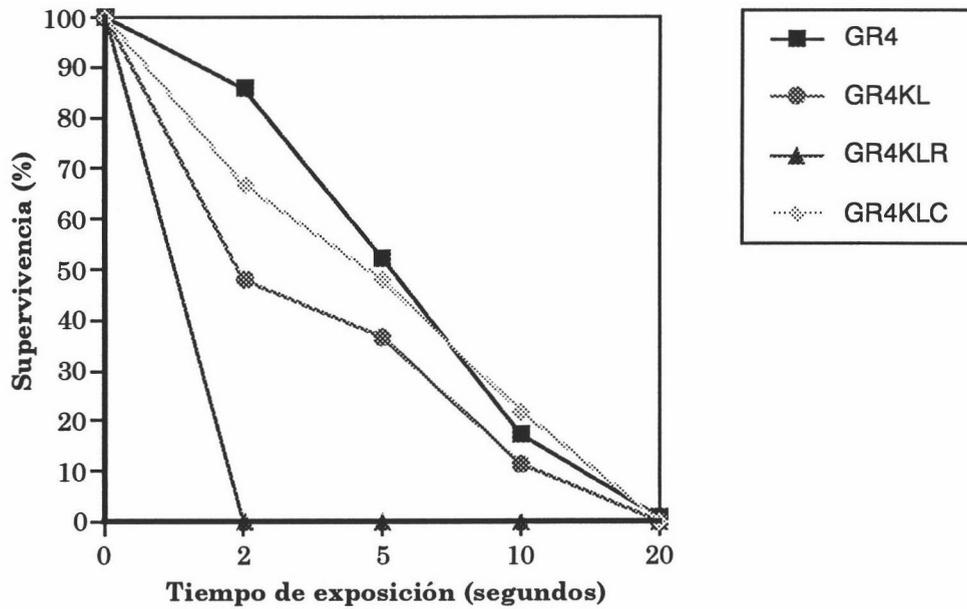
\*El receptor fue GRM8SR. Las conjugaciones se realizaron en MM+glutamato.



**FIGURA 1.6. Comprobación genética de las cepas *recA-gusA* y de las cepas *RecA<sup>+</sup>-gusA*.**

Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *EcoRI* o *BamHI* frente a ADN del gen *recA* de *R. meliloti*.

M, marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina; 1, cepa silvestre GR4; 2 y 3, cepas *recA*; 4 y 5, cepas *RecA<sup>+</sup>*.



**FIGURA 1.7. Sensibilidad de la cepa *recA* GR4KLR a la luz ultravioleta.**

Se indica el porcentaje de supervivencia de las distintas cepas tras diferentes tiempos de exposición a luz UV.

### 1.5. Discusión.

Muchos plásmidos del género *Rhizobium* son autotransmisibles a otras especies dentro de la familia *Rhizobiaceae*. En otros casos, los plásmidos indígenas de *Rhizobium* pueden ser movilizados tras la introducción de una región de ADN *mob* (*oriT*) que pueda ser reconocida por un plásmido movilizador apropiado. Se ha mostrado que la transferencia del plásmido pRmeGR4a y la movilización de pRmeGR4b ocurre a frecuencias relativamente altas y que tal movilización no parece necesitar de fenómenos de cointegración entre ambos plásmidos. Por un lado, se pudo demostrar la presencia de pRmeGR4b en células transconjugantes que no habían recibido pRmeGR4a. Por otra parte, la movilización de pRmeGR4b, si ocurre por mecanismos de cointegración, ésta no es dependiente de *recA*. Estos resultados indican que pRmeGR4b contine un *oriT* que puede ser reconocido por la maquinaria conjugativa de pRmeGR4a o que, alternativamente, pRmeGR4b puede codificar sus propias funciones de procesamiento de ADN y que requiera de otras funciones para la transferencia que son aportadas por pRmeGR4a. Bajo las condiciones ensayadas, la transferencia de pRmeGR4b fue siempre proporcionalmente inferior a la de pRmeGR4a, lo cual podría indicar que la maquinaria conjugativa de pRmeGR4a es menos eficiente en la movilización de pRmeGR4b que de pRmeGR4a. Estudios previos habían señalado que la cotransferencia de pRmeGR4a y pRmeGR4b ocurría a bajas frecuencias (Mercao-Blanco y Olivares, 1993b). Con la introducción de marcadores independientes en ambos plásmidos, se ha podido constatar que las frecuencias de transferencia son más altas para cada plásmido y para la cotransferencia de los dos. Es posible que los eventos de movilización aquí demostrados tengan lugar en otros casos, y que sin embargo hayan pasado desapercibidos por la ausencia de marcadores apropiados.

## 2. TRANSFERENCIA DE LOS PLASMIDOS NO SIMBIOTICOS DE *Rhizobium meliloti* GR4 A POBLACIONES NATIVAS DE UN SUELO DE GRANADA.

El uso de *Rhizobium* como inoculante de plantas leguminosas es una práctica habitual desde hace bastantes años. El interés de estas bacterias viene dado por su capacidad de asociarse simbióticamente con dichas plantas para formar unas estructuras denominadas nódulos, en los cuales se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno. Con el desarrollo y uso de las nuevas técnicas moleculares, se están construyendo cepas mejoradas genéticamente en cuanto a sus propiedades simbióticas. En general, el problema de los organismos modificados genéticamente (OMG) viene dado por las repercusiones ecológicas y sociales del uso y liberación de dichos OMGs en el medioambiente, sobre todo, por el posible impacto sobre las poblaciones indígenas que pudiera tener dicha liberación. Un aspecto bastante controvertido es el posible efecto de transferencia genética entre los microorganismos introducidos y los nativos, sobre todo si las modificaciones son introducidas en plásmidos. Los plásmidos son vehículos eficientes para la transferencia horizontal de elementos genéticos entre poblaciones, contribuyendo de forma importante a una rápida dispersión de genes no sólo plasmídicos, sino también cromosómicos. Aunque es bien conocido que en la naturaleza ocurre transferencia genética, pocas veces ha podido ser demostrada experimentalmente. El género *Rhizobium* es un buen modelo para estudiar los fenómenos de transferencia genética por varios motivos. En primer lugar, por la importancia agrícola derivada de su uso como inoculante para leguminosas. En segundo lugar por la abundancia relativa de diferentes especies, dentro del género, en el suelo. Y, en tercer lugar, por el hecho generalizado de la presencia de elementos genéticos extracromosómicos de

elevado tamaño molecular. La presencia de plásmidos en las bacterias del género *Rhizobium* está casi siempre relacionado con su capacidad para asociarse simbióticamente con plantas leguminosas. En la mayoría de estos plásmidos simbióticos (pSyms) se localizan los genes relacionados con la nodulación y fijación biológica de nitrógeno, etc. Además de estos pSyms algunas especies del género presentan otros plásmidos, en su mayoría de función desconocida, que por lo general no están relacionados con la simbiosis. Muchos de estos plásmidos son transmisibles por conjugación a especies relacionadas con el género *Rhizobium* y por ello es de gran interés el estudio de la transferencia conjugativa de los mismos por la posible dispersión de genes que, aunque de función desconocida en su mayoría, puedan aportar nueva información a las bacterias que los reciben.

Nosotros hemos tomado *R. meliloti* GR4 como modelo para estudiar la transferencia genética hacia poblaciones nativas del suelo, teniendo en cuenta la capacidad que GR4 tiene para transferir pRmeGR4a y pRmeGR4b a frecuencias relativamente altas. Se construyó una cepa derivada de GR4, denominada GR4KG, con el plásmido pRmeGR4b marcado con un cassette de resistencia a Km y el plásmido pRmeGR4a marcado con el gen *gusA* junto con un cassette de resistencia a Sm y Spc. La cepa GR4KG se utilizó para los estudios de transferencia a poblaciones nativas de *Rhizobium* tanto en condiciones de laboratorio como en ensayos de microcosmos. Para los experimentos de transferencia en el laboratorio se llevó a cabo un aislamiento de poblaciones nativas del suelo.

### 2.1. Ensayos de microcosmos.

Los microcosmos consistieron en recipientes que contenían 2 kg de un suelo de Granada, más concretamente un suelo de la Estación Experimental del

Zaidín, donde se ha realizado este trabajo. Los ensayos de microcosmos han consistido en la inoculación con la cepa GR4KG y series sucesivas de siembra y cosecha de plantas con períodos de descanso entre una cosecha y una nueva siembra. El suelo fue inoculado con la cepa GR4KG a una densidad inicial de  $3,3 \times 10^8$  células por gramo mediante homogenización de las células con el suelo. Los microcosmos así inoculados se matuvieron en condiciones de invernadero durante 414 días, durante los cuales se sembraron y se cosecharon plantas de trébol, judía y guisante en diferentes momentos a lo largo de este período. En la Figura 2.1 se detalla los momentos precisos de inoculación, siembra y cosecha. Al tiempo de cada siembra o cosecha se llevó a cabo un recuento de la cepa GR4KG para evaluar su supervivencia en el suelo.

La presencia de transconjugantes se comprobó mediante la "captura" de los mismos a través de la planta hospedadora. El análisis de los posibles transconjugantes (portadores de pRmeGR4a) que hubieran nodulado se realizó mediante detección de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en los nódulos formados en cada planta.

#### 2.1.1. Construcción de GR4KG.

La construcción de la cepa GR4KG se realizó de igual manera que para GR4KL. Puesto que contábamos con el plásmido pRmeGR4b marcado con el gen de resistencia a Km dentro del gen *mepA* (cepa GRM10K), sólo fue necesario llevar a cabo el marcaje del plásmido pRmeGR4a. Para ello se llevó a cabo la construcción de un minitransposón Tn5-*gusA*-Spc/Sm (Figura 2.2). Se clonó el fragmento de 2,2 kb *Hind*III del plásmido pWS38 (Selbitschka *et al.*, 1992), que contiene el gen *gusA* junto al promotor P<sub>Nm</sub>, en el sitio *Hind*III del plásmido pUC18*Not* (Herrero *et al.*, 1990), dando lugar al plásmido denominado pUC*gus*. A continuación se extrajo el fragmento *Not*I de pUC*gus* y

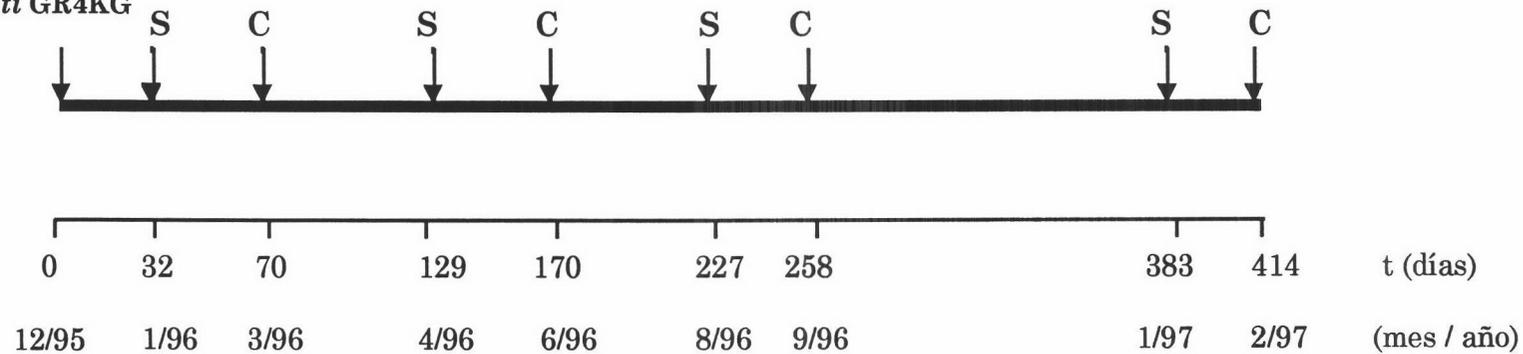
se clonó en el único sitio *NotI* del plásmido pUT-Sm/Spc (Herrero *et al.*, 1990). El plásmido resultante (pSH10), mantenido en la cepa S17.1 *pir*, se conjugó con la cepa de *R. meliloti* GRM6, seleccionando para transconjugantes resistentes a Sm y Spc. Los transconjugantes se usaron como donadores en masa y se conjugaron con la cepa GRM10K, seleccionando para transconjugantes resistentes a Km, Sm y Spc. La aparición de células resistentes sólo es posible si el cassette *gusA-Sm/Spc* se ha insertado en el plásmido pRmeGR4a y éste ha sido transferido por conjugación a la cepa GRM10K. La cepa resultante, GR4KG, es idéntica a la cepa silvestre GR4, excepto para los marcadores introducidos.

#### 2.1.2. Experimentos de transferencia en suelo.

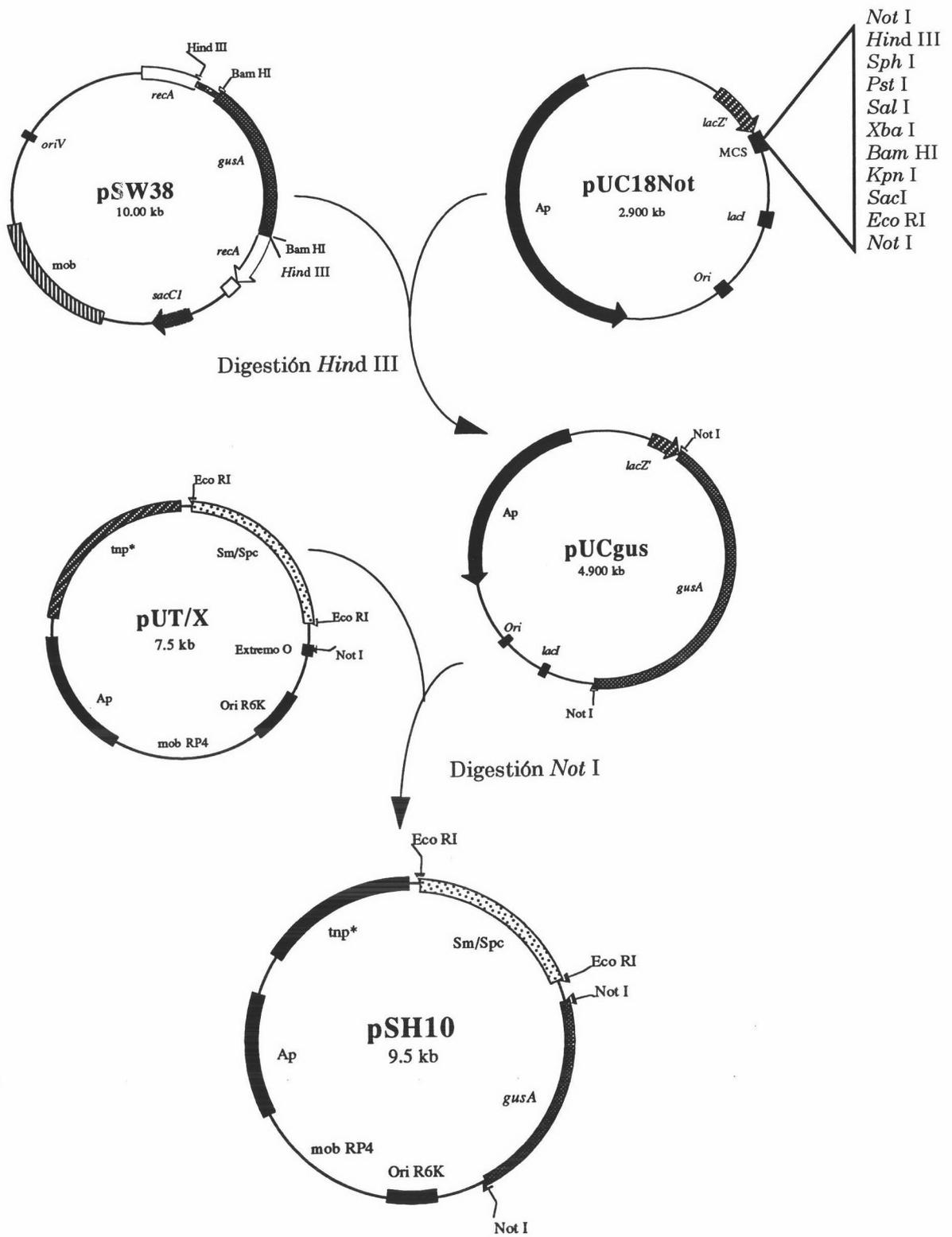
Se ha evaluado la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a las poblaciones de *Rhizobium* nativas del suelo en los experimentos de microcosmos. El suelo se inoculó con una cepa marcada, GR4KG y los posibles transconjugantes se seleccionaron como bacterias formadoras de nódulos azules (expresando actividad  $\beta$ -Glucuronidasa) en sus correspondientes plantas (judía, trébol o guisante). Durante el tiempo que ha durado el experimento de transferencia en suelo, 414 días, no hemos podido detectar la aparición de ningún transconjugante (portando pRmeGR4a) que ocupara nódulos en las plantas correspondientes ensayadas a pesar que la cepa inoculada, GR4KG, sobrevivió bastante bien durante el período experimental (Figura 2.3).

De acuerdo con estos resultados, decidimos aislar poblaciones nativas de *Rhizobium* y llevarlas hasta el laboratorio para estudiar la transferencia de los plásmidos no simbióticos de GR4KG bajo condiciones "óptimas".

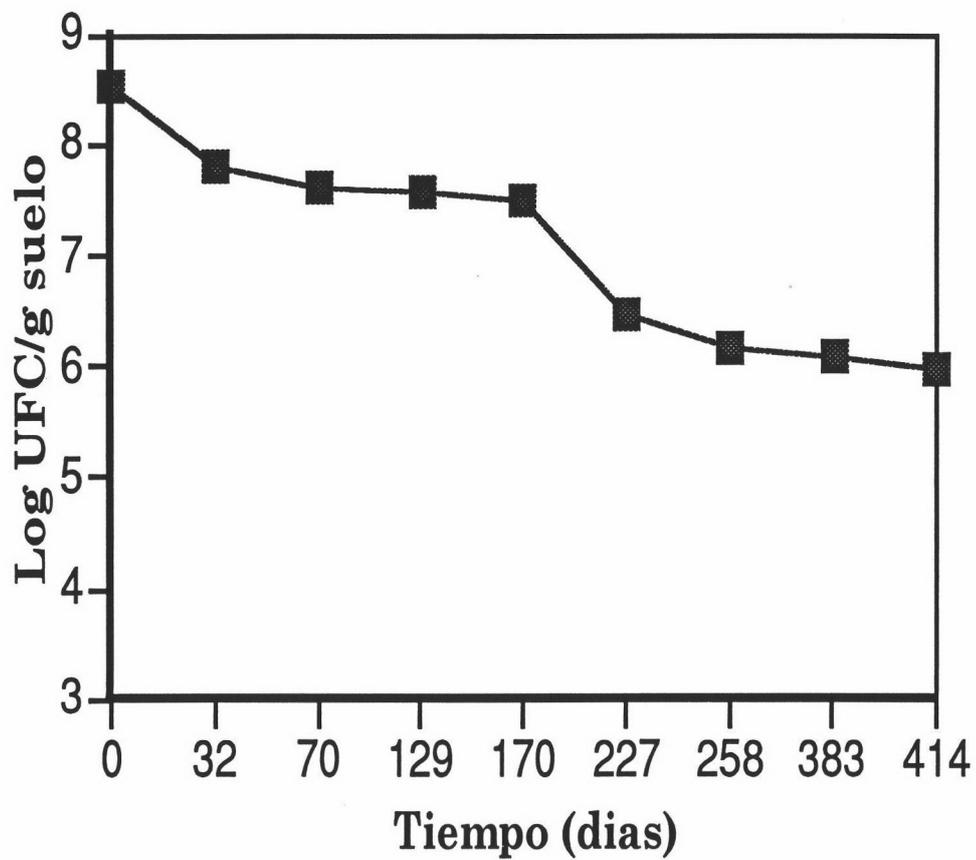
Inoculación con  
*R. meliloti* GR4KG



**FIGURA 2.1.** Esquema representativo del momento de inoculación con GR4KG y sucesivas siembras (S) y cosechas (C) con plantas de trébol, judía y guisante.



**FIGURA 2.2. Construcción del plásmido pSH10.**



**FIGURA 2.3. Supervivencia de la cepa GR4KG en microcosmos de suelo no estéril.**

Los datos representan el número de células viables presentes en el suelo desde el inicio hasta el final del experimento.

## 2.2. Transferencia conjugativa en ensayos de laboratorio.

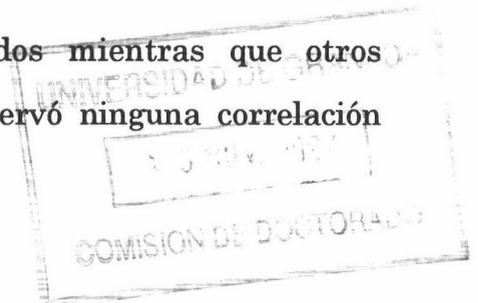
### 2.2.1. Aislamiento de poblaciones nativas.

El aislamiento de poblaciones nativas del suelo objeto de estudio se llevó a cabo a partir de nódulos de trébol, judía y guisante, si bien el aislamiento de la población obtenida a partir de guisante, disponible en nuestro departamento, no ha sido realizado en este trabajo sino que fue llevado a cabo por P. Villadas (datos no publicados). Aproximadamente 50 aislados de cada población han sido analizados y caracterizados por sus perfiles plasmídicos y mediante diferentes técnicas moleculares.

### 2.2.2. Caracterización de la población aislada de nódulos de *Trifolium repens* (trébol).

El análisis de restricción del ADNr 16S realizado sobre estos aislados reveló la existencia mayoritaria de un sólo tipo alélico, que correspondía al patrón de *Rhizobium leguminosarum*, en el 93% de los aislados. Sin embargo, el 7% de los aislados presentaban una especie 16S no identificada, por lo que se desestimaron.

El análisis correspondiente a los RAPDs, mediante la amplificación al azar con cebadores inespecíficos, determinó la existencia de 11 grupos diferentes en cuanto al perfil de bandas amplificadas (Tabla 2.1). Por otro lado el análisis del contenido en plásmidos de los aislados de trébol permitió la identificación de 5 grupos diferentes de perfiles plasmídicos (Tabla 2.2, Figura 2.4), que variaron en cuanto al número y tamaño molecular de los mismos. Por ejemplo, algunos aislados no presentaban plásmidos mientras que otros aislados contenían hasta 5. Sin embargo, no se observó ninguna correlación



entre el contenido en plásmidos de los aislados y su perfil RAPD. Más aún, dentro de los aislados que presentaban el mismo perfil de plásmidos pudieron encontrarse hasta 10 grupos de RAPDs diferentes y dentro de un mismo grupo de RAPDs había aislados con diferente contenido en plásmidos.

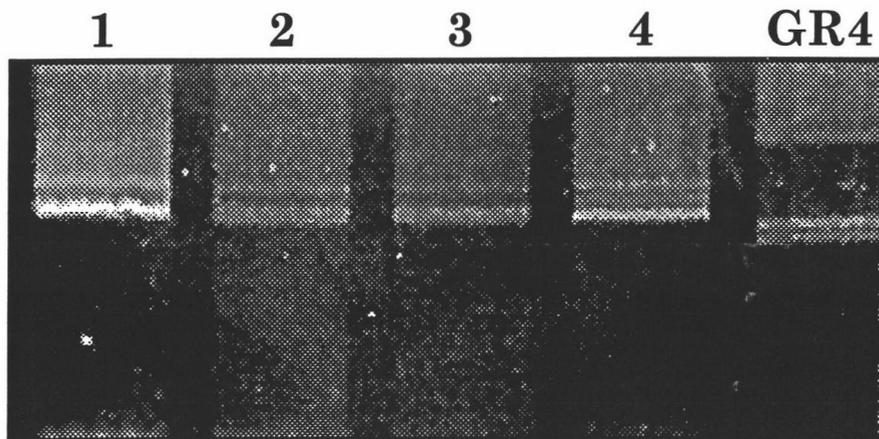
**TABLA 2.1. Tipos de perfiles RAPDs encontrados entre los aislados de trébol.**

<u>Grupos de RAPDs</u>	<u>Abundancia* (%)</u>	<u>Aislados</u>
1	10'2	1, 53, 68, 78, 91
2	18'3	6, 11, 16, 24, 28, 48, 69, 71B, 73
3	2	7B
4	12'2	2, 4, 12, 45, 62, 71A
5	28'6	14, 20, 30, 32, 55, 59, 61, 63, 81, 83, 87, 97, 109, 115
6	12'2	23, 35, 79, 82, 94, 112
7	4	36, 42
8	4	89,103
9	2	90
10	2	102
11	4	107, 116

\*Porcentaje de aislados en cada grupo en relación al total de cepas analizadas (49).

La abundancia relativa de un determinado grupo no significa que éste sea predominante en el suelo, es decir el aislado más abundante, sino que por otras razones, por ejemplo la competitividad, esta cepa es capaz de ocupar más nódulos y es por ello por lo que se aísla más frecuentemente.

Para los estudios de transferencia genética se eligieron un total de 16 aislados en función al grupo de RAPD al que pertenecían y de sus perfiles plasmídicos. Por ejemplo, dentro de un mismo grupo de RAPD se escogieron



**FIGURA 2.4 . Tipos de perfiles plasmídicos encontrados entre las cepas aisladas de nódulos de *T. repens*.**

Los números se refieren a los tipos indicados en la Tabla 2.2. Se incluye la cepa GR4 de *R. meliloti* como referencia.

cepas con diferente contenido en plásmidos. Las cepas elegidas fueron: Rt 1, Rt4, Rt 7B, Rt 12, Rt 20B, Rt 23, Rt 24, Rt 78, Rt 79A, Rt 79B, Rt 90, Rt 97, Rt 102, Rt 103, Rt 107, Rt 112B.

**TABLA 2.2. Tipos de perfiles plasmídicos encontrados entre los aislados de trébol.**

<u>Tipo de perfil</u>	<u>Abundancia* (%)</u>	<u>Aislados</u>
1	63'8	2, 4, 6, 7B, 11, 14, 20A, 20B, 35A, 48,53, 55, 59, 61, 63, 68, 69, 71B, 73, 78, 79A, 79B, 81A, 82A, 83, 91, 102, 103, 107, 109
2	12'7	23, 36, 42, 94B, 112A, 112B
3	8'5	12, 45, 62, 71A
4	2'1	90
5 <sup>1</sup>	12'7	1, 30, 32, 89, 115, 116

\*Porcentaje de aislados en cada grupo en relación al total de cepas analizadas (47).

<sup>1</sup>En este grupo no se visualizó ningún plásmido.

### 2.2.3. Caracterización de los aislados de *Pisum sativum* (guisante).

En cuanto al ADNr 16S, el análisis de restricción también mostró la existencia de un sólo tipo alélico, identificado como *R. leguminosarum* y que estaba representado en el 98% de los aislados. El 2% restante de los aislados presentaba un 16S no identificado, por lo que fueron desestimados para el estudio de transferencia en condiciones de laboratorio.

El análisis del perfil RAPD de los aislados de guisante reveló la existencia de 6 grupos diferentes, aunque la mayoría de los aislados estaban agrupados dentro del tipo 1 de perfil RAPD, que suponía el 75% de la población

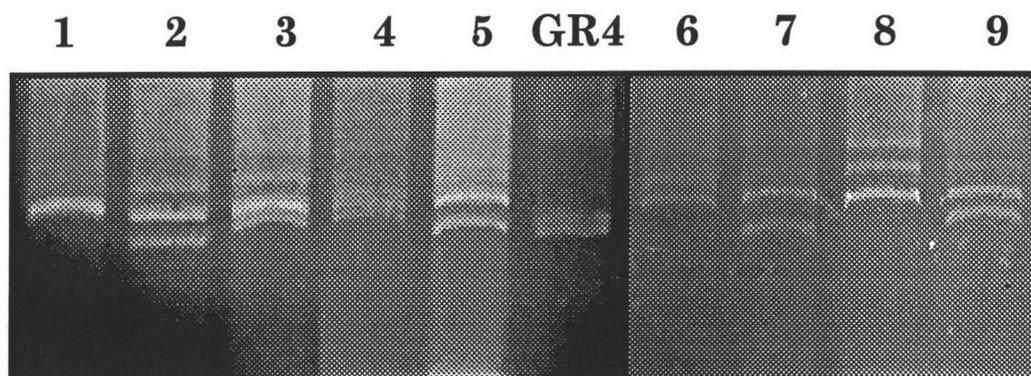
analizada (Tabla 2.3). El contenido en plásmidos de estos aislados reveló la existencia de hasta 9 grupos diferentes de perfiles plasmídicos (Figura 2.5) y, al igual que ocurría anteriormente, la mayoría de los aislados se agruparon dentro del perfil plasmídico tipo 8 (59%) (Tabla 2.4).

**TABLA 2.3. Tipos de perfiles RAPDs encontrados entre los aislados de guisante.**

<u>Grupos de RAPDs</u>	<u>Abundancia* (%)</u>	<u>Aislados</u>
1	75	11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 202, 302, 304, 305, 307, 308, 309, 310, 312, 313, 314
2	1'7	13
3	10'6	21, 37, 201, 204, 205, 311
4	5'3	27, 49, 306
5	3'4	38, 301
6	3'4	206,303

\*Porcentaje de aislados en cada grupo en relación al total de cepas analizadas (56).

No se encontró ninguna correlación entre la presencia de un perfil plasmídico concreto y el agrupamiento en función del RAPD, aunque si es destacable que la mayoría de los asilados que presentaron el perfil de plásmidos del grupo 8 se agruparon dentro del grupo de RAPD 1. Nuevamente, la existencia de un grupo mayoritario no significa que éste sea el más abundante en el suelo, sino que es el grupo que más nódulos ha formado en las plantas correspondientes.



**FIGURA 2.5 . Tipos de perfiles plasmídicos encontrados entre las cepas aisladas de nódulos de *P. sativum*.**

Los números se refieren a los indicados en la Tabla 2.4.  
Como referencia se incluye el perfil de la cepa GR4 de *R. meliloti*.

**TABLA 2.4. Tipos de perfiles plasmídicos encontrados entre los aislados de guisante.**

<u>Tipo de perfil</u>	<u>Abundancia* (%)</u>	<u>Aislados</u>
1	10'7	38, 49, 103, 203, 301, 306
2	5'4	11, 22, 37
3	14'2	14, 33, 36, 104, 302, 304, 314, 313
4	1'7	35
5	4'4	206, 303
6	1'7	39
7	1'7	106
8	59	12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 101, 102, 105, 107, 108, 109, 201, 202, 204, 205, 305, 307, 308, 309, 310, 312
9	1'7	311

\*Porcentaje de aislados en cada grupo en relación al total de cepas analizadas (56).

En función del contenido en plásmidos y el perfil de bandas amplificadas por RAPD, se eligieron las siguientes cepas para el estudio de la transferencia en laboratorio: Rv 11, Rv 12, Rv 13, Rv 21, Rv 28, Rv 35, Rv 37, Rv 38, Rv 206, Rv 306.

#### 2.2.4. Caracterización de las cepas aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

A diferencia de las poblaciones de rizobios aisladas de nódulos de guisante y trébol, el análisis ARDRA preliminar de los alelos *rrn* 16S de los aislados de judía indicó la existencia de al menos 4 tipos de genes 16S. La mayoría de los 39 cepas analizadas parecían relacionadas con *R. etli*, mientras que otras lo estaban con el grupo de especies del género *Sinorhizobium*, y sólo

un aislado parecía tener un alelo 16S similar a *R. leguminosarum*. Otras dos cepas presentaron un perfil ARDRA que no concordaba con ninguna de las especies de referencia utilizadas.

Un análisis mas exhaustivo, con hasta 9 enzimas de restricción, y utilizando un mayor número de especies de referencia, permitió dilucidar la asignación de especies 16S para cada aislado. Así, 21 de las 39 cepas analizadas presentaron un perfil ARDRA idéntico a la especie *R. etli* (Tabla 2.5).

7 cepas (Rp 6, 9, 21, 28, 54, 64 y 99, Tabla 2.5) mostraron un perfil ARDRA idéntico a la especie *S. fredii*. Esto hecho nos sorprendió por dos razones. Primera, porque las bacterias de esta especie se caracterizan por su capacidad para nodular plantas del género *Glycine*, su hospedador primario, y segunda, porque todas las cepas descritas hasta el momento, portadoras de este alelo *rrn* 16S, son originarias de China. Las cepas aisladas de nódulos de judía, no sólo eran efectivas con este hospedador, sino que se mostraron incapaces de nodular plantas de las variedades de soja (*Glycine max*) Peking y Williams. Siendo ésta la primera vez que se aislan bacterias portadoras de este alelo 16S fuera de China y a partir de nódulos de una leguminosa no perteneciente al género *Glycine*, no parece fácil especular sobre el origen de las cepas aisladas en este trabajo.

Dos cepas, Rp3 y Rp93, presentaron un perfil ARDRA de su gen *rrn* 16S idéntico a la cepa tipo de la especie *R. giardinii* (Amarger *et al.*, 1997).

Los aislados Rp15, 45, 46, 55 y 89 presentaron un gen 16S idéntico a la especie *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997), mientras que las cepas Rp18, 42 y 60 sólo se diferenciaron de esta especie en un sitio de corte con la enzima *MspI*, exactamente en la posición 951 (Tabla 2.5). Esta diferencia puede simplemente indicar la existencia de polimorfismo dentro de la misma especie. Las especies

**TABLA. 2.5. Asignación de especies a las cepas aisladas de nódulos de judía tras el análisis de los genes *rrn* 16S.**

<u>Especie 16S</u>	<u>Abundancia<sup>1</sup></u>	<u>Aislados<sup>2</sup> (Rp)</u>
<i>R. etli</i>	53'8%	5, 10, 12, 14, 20, 24, 29, 35, 38, 56, 57, <b>62</b> , 69, 73, 75, 81, 82, 87, 90, 91, 92
<i>S. fredii</i>	17'9%	<b>6</b> , 9, 21, 28, 54, 64, 99
<i>R. gallicum</i>	12'8%	15, <b>45</b> , 46, 55, 89
<i>R. gallicum</i> *	7'8%	18, <b>42</b> , 60
<i>R. giardinii</i>	5'1%	<b>3</b> , <b>93</b>
<i>R. leguminosarum</i>	2'6%	<b>84</b>

<sup>1</sup> Se indica el porcentaje de cepas asignadas a cada especie en relación al total de cepas analizadas (39).

<sup>2</sup> En negrita se indica las cepas a las que además del análisis ARDRA se les caracterizó la secuencia parcial del gen para ARNr 16S

\* Indica las cepas que presentan un gen 16S de *R. gallicum* polimórfico.

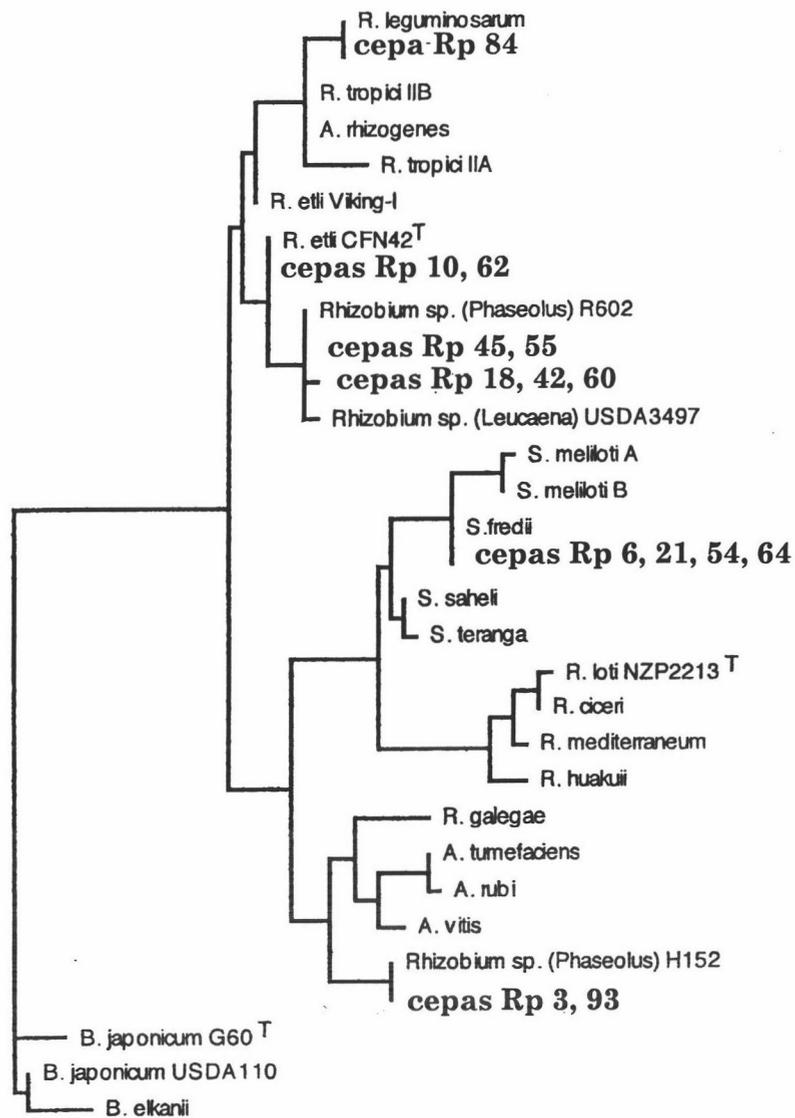
*R. giardinii* y *R. gallicum* han sido recientemente descritas como simbiotes de *P. vulgaris*, y fueron originalmente aisladas de suelos de distintas regiones de Francia. La presencia de cepas pertenecientes a la especie *R. gallicum* ha sido puesta de manifiesto en suelos de Austria (Sessitsch *et al.*, 1997), por lo que su existencia en nuestro suelo de estudio puede indicar que estas bacterias sean abundantes en suelos europeos.

Extrañamente, sólo una cepa, Rp84, mostró un alelo 16S típico de la especie *R. leguminosarum* (Tabla 2.5). Hasta hace poco, se consideraba a las cepas de la biovariedad *phaseoli* de *R. leguminosarum* como la especie típicamente europea que entra en simbiosis con plantas del género *Phaseolus*.

Los resultados obtenidos tras el análisis de restricción de ADN de los genes para el ARNr 16S, fueron posteriormente confirmados mediante la obtención de la secuencia parcial de nucleótidos de algunos de los aislados en cada grupo de cepas. Dependiendo de los aislados, se obtuvieron entre 300 y 600 nucleótidos de secuencia del extremo 5' de los correspondientes genes

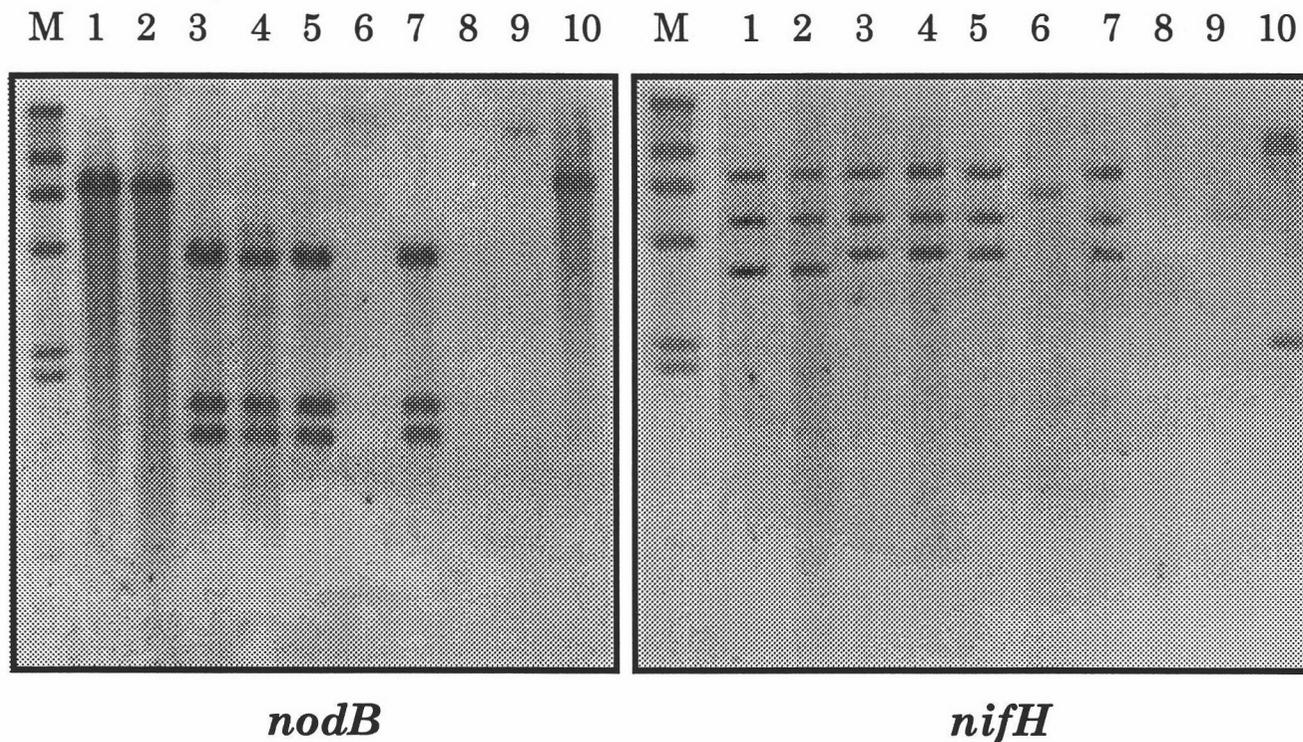
amplificados por PCR. Esto nos permitió, no sólo confirmar la asignación de especies para cada grupo de cepas, sino determinar cierto polimorfismo entre los genes de algunas cepas de referencia y los de nuestros aislados. Por ejemplo, se pudo determinar que la secuencia del 16S de las cepas Rp10 y Rp62 presentan un cambio nucleotídico con respecto a la secuencia de la cepa tipo de *R. etli*, CFN42, exactamente un cambio de C por G en la posición 322 de la secuencia de CFN42. Una visión más clara de la diversidad de especies encontrada en esta población de simbioses de judía puede verse en la Figura 2.6, donde se muestran un árbol filogenético de especies de *Rhizobium* basado en la diversidad de genes para el ARNr 16S.

A la vista de la amplia diversidad de especies encontradas entre los simbioses de judía en el suelo de estudio, se llevó a cabo un estudio más profundo sobre esta población. Por un lado, se determinó que tipo de plásmido simbiótico portan cada una de las cepas aisladas. Para ello, el ADN genómico de estas cepas, digerido con enzimas de restricción, se hibridó frente a sondas de ADN de los genes *nifH* y *nodB* de *R. etli* CFN42. Los resultados, que se muestran en la Figura 2.7, permitieron clasificar los aislados bacterianos en dos grupos. Por un lado, aquellos que presentaron señales de hibridación positivas frente a ambas sondas, y por otro, aquellos que no parecían hibridar con ninguna de las sondas en las condiciones de alta astringencia utilizadas. Todos aquellos aislados que mostraron hibridación positiva, presentaban además 3 copias del gen *nifH*, un hecho característico de los plásmidos simbióticos de *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Entre estos se encontraban cepas pertenecientes a 4 especies 16S, que además presentaban perfiles de hibridación idénticos, lo que indicaba que portaban el mismo plásmido simbiótico (Figura 2.7). Estos resultados indican que en esta población han ocurrido fenómenos de transferencia genética interespecífica de, al menos, ADN del plásmido simbiótico de *R. etli*. Este hecho no parece sorprendente, y simplemente se puede enmarcar en la misma línea de los



**FIGURA 2.6 . Filogenia de los alelos 16S encontrados entre los aislados de nódulos de *P. vulgaris*.**

Se indica la posición de diversos aislados del suelo de Granada dentro del árbol filogenético de especies de *Rhizobium*.



**FIGURA 2.7. Tipos de plásmidos simbióticos presentes entre los aislados de nódulos de *P. vulgaris*.**

Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *EcoRI* (izquierda) o *BamHI* (derecha) frente a sondas de los genes *nodB* y *nifH*, respectivamente, de *R. etli* CFN42.

M, marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina; 1, *R. etli* CFN42; 2, Rp 14; 3, Rp 75; 4, Rp 84; 5, Rp 18; 6, Rp 45; 7, Rp 3; 8, Rp 93; 9, Rp 64; 10, *R. leguminosarum* 2616.

resultados de otros autores que constatan evidencias de transferencia plasmídica en poblaciones naturales. Todas las cepas clasificadas como *S. fredii* o aquellas que contienen un 16S idéntico a *R. gallicum* no presentaron señal de hibridación frente a la sonda (Figura 2.7).

Para profundizar aún más en las relaciones filogenéticas de las cepas aisladas, se llevó a cabo un estudio de isoenzimas metabólicas, con la ayuda de los Dres. Martínez-Romero y Caballero-Mellado, del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, en Cuernavaca, México. Se ensayaron un total de 9 enzimas (ver Material y Métodos), todas ellas resultaron ser polimórficas. El número medio de alelos fue de 4'56 (Tabla 2.6). Este estudio permitió agrupar las cepas en 10 electroferotipos (ETs), irregularmente representados. Mientras la mayoría de aislados agrupaban dentro del ET1 (21 cepas), los ET 5 y ET12 estaban representados por 4 y 5 cepas, respectivamente. El resto de ETs estuvieron representados por 1 o 2 aislados solamente (Tabla 2.7). El análisis filogenético agrupó los 10 ETs en 4 grupos principales (grupos A, B, C y F en la Figura 2.8) Las distancias genéticas entre estos grupos fueron mayores de 0'8, lo que en teoría define el límite entre especies diferentes. El grupo A, formado por dos subgrupos, incluyó el genotipo más representado (ET1, subgrupo A<sub>1</sub>) y los aislados representados en el ET2 (subgrupo A<sub>2</sub>). El grupo B contenía 4 ETs (ET3 al ET6) que divergían de la cepa *R. meliloti* 2011, usada como referencia, a una distancia de 0'83, pero a una distancia de más de 0'9 del resto de grupos. El grupo C consiste de los ETs 8, 10 y 11, cada uno representado por un único aislado. La cepa CFN42 de *R. etli* y la cepa VF39 de *R. leguminosarum*, usadas como referencia, se encontraban en este grupo. El grupo F contenía sólo el ET12, que divergía a una distancia de 0'84 del grupo C y de varias cepas de referencia, incluida *R. tropici* CFN299.

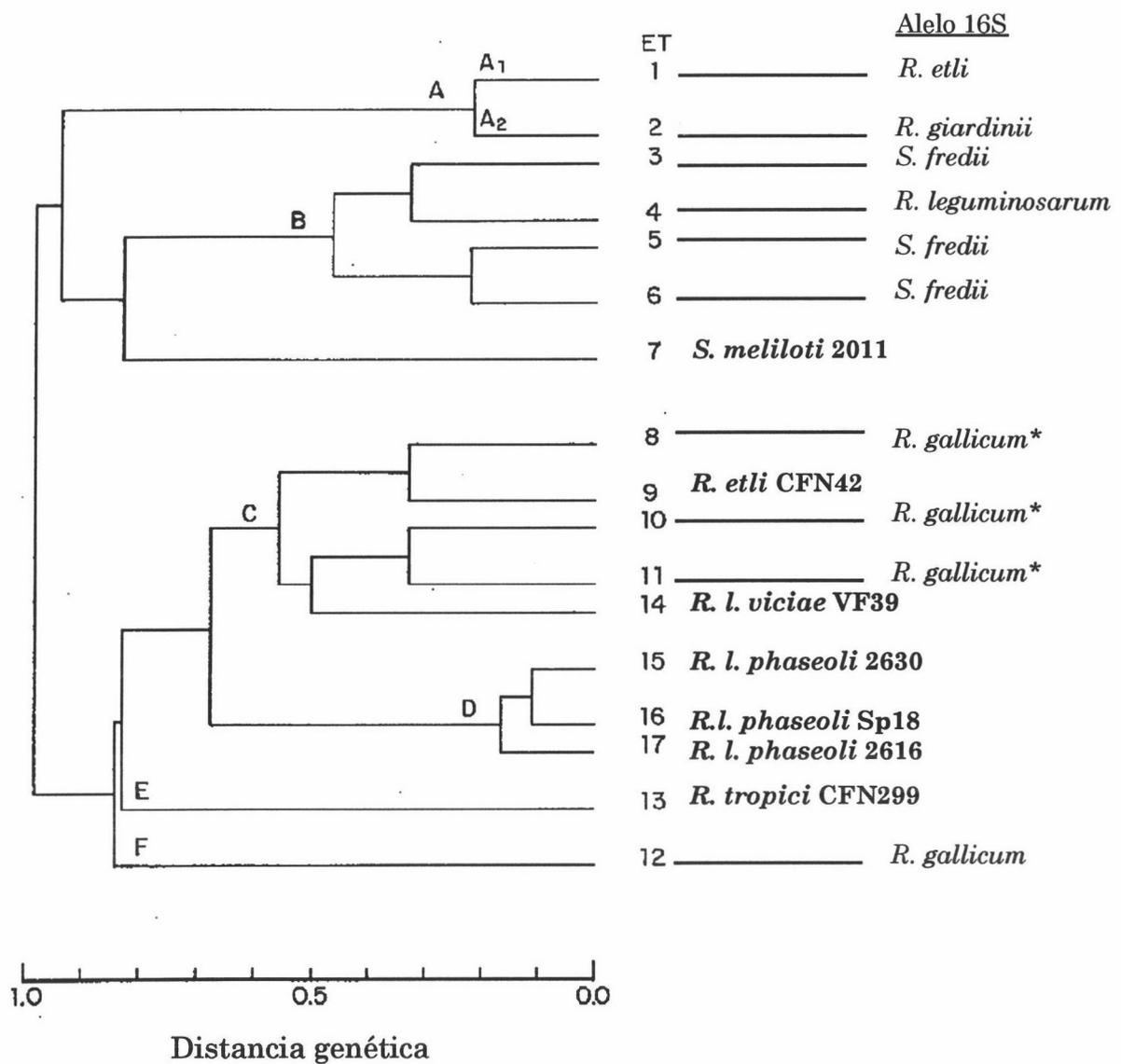
**TABLA 2.6. Diversidad genética de los 9 loci enzimáticos analizados entre los aislados de nódulos de *P. vulgaris* de un suelo de Granada.**

Enzima <sup>1</sup>	Número de alelos	Diversidad genética ( $h$ ) <sup>2</sup>
MDH	4	0'800
EM	5	0'836
IDH	5	0'782
PGI	5	0'836
G6P	6	0'891
HEX	4	0'782
PGM	6	0'836
IPO	3	0'691
ACO	3	0'564
Media	4'56	$H = 0'780$

<sup>1</sup> Las enzimas ensayadas se relacionan en Material y Métodos.

<sup>2</sup>  $h = (1 - \sum x_i^2) / [n / (n - 1)]$ , donde  $x_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  y  $n$  es el número de ETs.

Estos resultados, por sí solos, ya indican una gran diversidad genética en la población bacteriana analizada, lo que concuerda con los análisis de 16S, que identificaron al menos 5 especies diferentes. Sin embargo, el contraste del análisis isoenzimático y de los genes 16S presenta ciertos puntos de conflicto. Por ejemplo, mientras que las cepas de los ETs 1 y 2 presentan alelos 16S muy divergentes (Figuras 2.6 y 2.8), el análisis MLEE localiza a estas cepas como genéticamente cercanas. Y viceversa, según el estudio enzimático, las cepas de los ETs 8, 10 y 11 deberían, a priori, ser consideradas como pertenecientes a una especie distinta a las del ET12. Sin embargo, todas ellas poseen un alelo 16S tipo *R. gallicum*. Este desacuerdo entre los resultados de distintos parámetros taxonómicos recuerda a la situación descrita por Eardly *et al.* (1995), quienes especulan con la posibilidad de recombinación de alelos 16S entre cepas genéticamente diversas.



**FIGURA 2.8 . Dendrograma generado a partir de los resultados de análisis de isoenzimas metabólicas.**

Los tipos electroforéticos (ET) encontrados para las cepas aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* se incluyen junto a los de cepas de referencia (en negrita). Se indica además el tipo de alelo 16S identificado para las cepas en cada ET.

**TABLA 2.7. Relación de cepas incluidas dentro de cada electroferotipo identificado.**

Electroferotipo	Cepas (Rp)
1	5, 10, 12, 14, 20, 24, 29, 35,38, 56, 57, 62, 69, 73, 75, 81, 82, 87, 90, 91, 92
2	3, 93
3	64, 99
4	84
5	6, 9, 21, 28
6	54
8	42
10	60
11	18
12	15, 45, 46, 55, 89

Para el estudio de la transferencia en el laboratorio se eligieron cepas que representaban a todas las especies de 16S encontradas en esta población. Dichas cepas fueron las siguientes: Rp5, Rp10, Rp14, Rp20, Rp75, Rp87, Rp3, Rp93, Rp64, Rp18, Rp60, Rp45, Rp55.

#### 2.2.5. Transferencia de los plásmidos no simbióticos de GR4KG en condiciones de laboratorio.

Para el estudio de la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a los aislados que previamente hemos seleccionado, se hacía necesario introducir un marcador a dichas cepas, que nos permitiera seleccionar transconjugantes que hubieran recibido los plásmidos. Para ello a cada una de las cepas elegidas se les introdujo, por conjugación, el plásmido pRK290, un plásmido derivado de RK2 que confiere resistencia a tetraciclina y que puede mantenerse establemente dentro de las especies del género *Rhizobium*. Con las cepas así marcadas, se llevaron a cabo las conjugaciones con GR4KG como donadora para determinar las frecuencias de transferencia de

los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a cada una de las cepas elegidas. En este estudio de transferencia en el laboratorio hemos incluido una población bien caracterizada de *R. meliloti* (Villadas, *et al.*, 1995). Las cepas elegidas fueron: A17, A18, A111, A212, A215, A219, A312, A316, A318. También se eligieron algunas cepas pertenecientes a diferentes suelos de España (Villadas, *et al.*, 1995): RMS04, RMSA29, RMA01, SAP6, SANb y SAFa.

#### 2.2.5.1. Transferencia conjugativa a los diferentes aislados.

La transferencia conjugativa de los plásmidos marcados de GR4KG al grupo de aislados de trébol fueron muy poco eficientes (Tabla 2.8), detectándose en la mayoría de los casos sólo transferencia de pRmeGR4a. La transferencia de este plásmido ocurrió sólo a 9 aislados de las 16 cepas usadas, y a tan sólo 2 de ellos también se transfirió pRmeGR4b.

Dentro de los aislados de guisante, las frecuencias observadas fueron variables. Por ejemplo, mientras que el aislado Rv 35 fue un buen receptor para pRmeGR4a, en otros aislados la transferencia fue casi indetectable (Tabla 2.9).

Para los aislados de judía (Tabla 2.10) se pudo detectar la transferencia tanto de pRmeGR4a y pRmeGR4b o ambos a frecuencias relativamente altas, aunque sólo a unos pocos aislados.

La transferencia de los plásmidos de GR4KG a los aislados de *R. meliloti* fue casi indetectable y sólo se observaron transconjugantes para la cepa A215 (Tabla 2.11), aunque las frecuencias fueron realmente bajas.

Las frecuencias de transferencia observadas en el conjunto de las poblaciones nativas aisladas del suelo resultaron bastante bajas en todos los casos. Es posible que las condiciones ensayadas en el laboratorio no sean

suficientemente "óptimas" como para permitir la transferencia de estos plásmidos. Puede que existan factores incontrolados que estén limitando dicha transferencia. Alternativamente, la no detección de la transferencia no significa que ésta no ocurra, sino que es posible que exista iniciación de la transferencia, pero que el replicón transferido no sea estable en la célula receptora. Por ello se estudió la capacidad de replicación de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b en cada una de las cepas utilizadas como receptoras.

**TABLA 2.8. Frecuencia de tranferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a cepas aisladas de nódulos de *Trifolium repens*.**

Cepa	Frecuencia de conjugación		
	pRmeGR4a	pRmeGR4b	a+b
Rt 1	$3,6 \times 10^{-9}$	-	-
Rt 78	-	-	-
Rt 4	$4,3 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-7}$	-
Rt 28	-	-	-
Rt 7B	$3,3 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-7}$	-
Rt 12	-	-	-
Rt 97	-	-	-
Rt 20	-	-	-
Rt 23	$4,0 \times 10^{-7}$	-	-
Rt 79	$2,9 \times 10^{-7}$	-	-
Rt 79B	-	-	-
Rt 112B	$5,0 \times 10^{-8}$	-	-
Rt 103	$4,9 \times 10^{-7}$	-	-
Rt 90	$4,0 \times 10^{-8}$	-	-
Rt 102	$2,5 \times 10^{-7}$	-	-
Rt 10	-	-	-

**TABLA 2.9. Transferencia de pRmeGR4a y pRmeGR4b acepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum*.**

Cepa	Frecuencia de conjugación		
	pRmeGR4a	pRmeGR4b	a+b
Rv 11	$2.5 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$
Rv 28	$7.9 \times 10^{-8}$	"	"
Rv 35	$2.6 \times 10^{-5}$	"	"
Rv 38	$<10^{-8}$	"	"
Rv 13	"	"	"
Rv 21	$1.2 \times 10^{-7}$	"	"
Rv 37	$1.8 \times 10^{-7}$	"	"
Rv 206	$<10^{-8}$	"	"
Rv 12	"	"	"
Rv 306	"	"	"

**TABLA 2.10. Frecuencia de conjugación de pRmeGR4a y pRmeGR4b a cepas aisladas de *Phaseolus vulgaris*.**

Cepa	Frecuencia de conjugación		
	pRmeGR4a	pRmeGR4b	a+b
Rp 5	-	-	-
Rp 10	-	-	-
Rp 14	-	-	-
Rp 20	-	-	-
Rp 75	-	-	-
Rp 87	-	-	-
Rp 93	-	-	-
Rp 3	$3.3 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-6}$	-
Rp 64	-	-	-
Rp 18	$1.0 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{-7}$	$5.0 \times 10^8$
Rp 60	$2.0 \times 10^{-6}$	$2.4 \times 10^{-8}$	$1.0 \times 10^8$
Rp 45	$1.0 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-5}$	$3.3 \times 10^6$
Rp 55	$1.9 \times 10^{-4}$	$3.8 \times 10^{-5}$	$3.5 \times 10^6$

**TABLA 2.11. Frecuencia de conjugación de los plásmidos pRmeGR4a y b a cepas de *R. meliloti* aisladas *Medicago sativa*.**

Cepa	Frecuencia de conjugación		
	pRmeGR4a	pRmeGR4b	a+b
A17	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
A18	"	"	"
A111	"	"	"
A212	"	"	"
A215	$10^{-7}$	$2 \times 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
A219	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
A312	"	"	"
A316	"	"	"
A318	"	"	"
RMS04 <sup>1</sup>	$0'4 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$0'6 \times 10^{-6}$
RMSA29 <sup>1</sup>	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
RMA01 <sup>1</sup>	$0'3 \times 10^{-6}$	$0'4 \times 10^{-7}$	$< 10^{-8}$
SAP6 <sup>1</sup>	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
SANb <sup>1</sup>	$0'5 \times 10^{-5}$	$0'5 \times 10^{-6}$	$0'1 \times 10^{-5}$
SAFa <sup>1</sup>	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$

\*Estos resultados son la media de 2 experimentos.

<sup>1</sup> Estas cepas están aisladas de un suelo de Salamanca (España).

#### 2.2.5.2. Estabilidad de los orígenes de replicación de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b.

Para profundizar un poco más, se decidió estudiar la estabilidad de los replicones de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b. El *oriV* de pRmeGR4a está caracterizado, secuenciado y clonado en pSUP202 (pJM100, Mercado-Blanco y Olivares, 1993). Se llevó a cabo la clonación del *oriV* de pRmeGR4b. Para ello se utilizó una banco de genes de pRmeGR4b (Toro y Olivares, 1986) disponible en nuestro laboratorio. El ADN extraído individualmente de los diferentes clones del banco se digirió con *EcoRI* y se usó en hibridaciones ADN-

ADN frente a un fragmento *EcoRV* de 1'5 kb, conteniendo *repC* de pRmeGR4a (Mercado-Blanco y Olivares, 1993), que se usó como sonda. Sólo un clon, el GRT127, mostró señal de hibridación con la sonda en un fragmento *EcoRI* de unas 16 kb (datos no mostrados). Posteriormente se siguió el estudio con este clon, digiriéndolo con el enzima *SaII*. Los fragmentos obtenidos de dicha digestión se clonaron independientemente en pUC18 y los plásmidos resultantes se digirieron de nuevo con *SaII* y se usaron en hibridaciones con la sonda *repC* de pRmeGR4a. Se observó una señal de hibridación en uno de los clones analizados que se correspondía con un fragmento *SaII* de unas 3 kb (datos no mostrados). A continuación se subclonó dicho fragmento *SaII* de 3 kb en el sitio *EcoRI* de pSUP202 mediante la creación de extremos romos. El plásmido resultante se denominó pORI13. Para comprobar que el fragmento clonado contiene el origen de replicación de pRmeGR4b, se llevaron a cabo conjugaciones triparentales con la cepa GRM8SR usando el plásmido movilizador pRK2013 y seleccionando para tranconjugantes resistentes a Tc, Sm y Rif. Si el fragmento clonado en pSUP202 contiene el origen de replicación del plásmido pRmeGR4b junto con las funciones de replicación necesarias para su mantenimiento autónomo, los tranconjugantes aparecidos de GRM8SR deben contener pORI13 de manera que pueda ser extraído por los procedimientos normales de aislamiento de ADN plasmídico. En caso contrario, pORI13 no podría mantenerse establemente (puesto que el vector que lo soporta no es estable en *Rhizobium*) y bajo presión de antibiótico se integraría en algún lugar del genoma de GRM8SR. De los tranconjugantes aparecidos se aisló su ADN y se comprobó, mediante las digestiones oportunas, que los plásmidos contenían el fragmento *SaII* de 3 kb que contenía el posible *repC* de pRmeGR4b.

Con los orígenes de replicación de los plásmidos pRmeGR4a (pJM100) y pRmeGR4b (pORI13), se llevaron a cabo conjugaciones triparentales para

determinar la estabilidad de estos replicones en cada uno de los aislados. A todos los aislados se les pudo transferir eficientemente tanto pJM100 como pORI13. Sin embargo, para comprobar que estos replicones eran verdaderamente estables, se decidió aislar el ADN de dichos plásmidos y comprobar que no se habían integrado por no poder replicarse en un fondo genético diferente al de *R. meliloti*. Con la solución de ADN obtenida para cada replicón en cada uno de los aislados se transformaron células competentes de DH5a. La aparición de transformantes en todos los casos indicaba que los replicones pudieron ser extraídos de los diferentes aislados, lo que nos indicaba que dichos replicones podían mantenerse establemente.

Parece, por tanto, que la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a un número relativamente bajo de receptores aislados del suelo no es un problema de estabilidad de los mismos, pues sus replicones son estables, sino que lo más probable es que las condiciones en las que se ha llevado a cabo no son las más "óptimas" para detectar su transferencia.

En la tabla 2.12 se esquematiza un resumen de la transferencia genética de *R. meliloti* GR4 a las poblaciones indígenas del suelo.

#### 2.2.7. Determinación del número mínimo de receptores y el número mínimo de transconjugantes para la detección de transferencia genética.

Puesto que la transferencia genética en suelo es bastante difícil de detectar, se han considerado otros factores que puedan influenciar la transferencia genética así como su detección.

Por un lado, se determinó el número mínimo de receptores potenciales en suelo necesarios para que la transferencia sea detectable. Para ello se realizó un ensayo de microcosmos que contenían suelo estéril y que fue coinoculado con la cepa GR4KG y con cepas receptoras, que previamente habían demostrado

**TABLA 2.12. Resumen de la transferencia de los plásmidos de *R. meliloti* GR4 a las poblaciones indígenas del suelo.**

<u>Bacterias aisladas de</u>	<u>Nº bacterias g/suelo<sup>1</sup></u>	<u>Nº potencial de receptores por g/suelo<sup>2</sup></u>	<u>Nº actual de receptores por g/suelo<sup>3</sup></u>	<u>Transferencia en microcosmos</u>
<i>Medicago sativa</i>	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$ (100%)	0	No observada
<i>Phaseolus vulgaris</i>	$1.7 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$ (100%)	$3.9 \times 10^3$ (23%)	No observada
<i>Pisum sativum</i>	$1.7 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$ (100%)	$6 \times 10^3$ (35%)	No observada
<i>Trifolium repens</i>	$2 \times 10^2$ - $1.5 \times 10^3$	$2 \times 10^2$ - $1.5 \times 10^3$ (100%)	$7.4 \times 10^1$ - $5.5 \times 10^2$ (37%)	No observada
TOTAL	$2.35 \times 10^5$	$> 2.18 \times 10^5$	$> 1 \times 10^4$	No observada

<sup>1</sup> Número de bacterias determinado por el método del número más probable (NMP).

<sup>2</sup> De acuerdo con la abundancia relativa (porcentaje en paréntesis) de las bacterias aisladas capaces de mantener establemente los replicones de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b de *R. meliloti* GR4, determinado en el laboratorio.

<sup>3</sup> De acuerdo con la abundancia relativa (porcentaje en paréntesis) de las bacterias aisladas que adquirieron los plásmidos de *R. meliloti* GR4 en cruces independientes bajo condiciones de laboratorio.

ser buenas receptoras de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b en el laboratorio, a diferentes cantidades por gramo de suelo. Las cepas usadas fueron Rp 55, A215, (marcadas con pRK290). Como control de este experimento también se inoculó otro microcosmos con la cepa *R. meliloti* GRM8SR. La cantidad de células inoculadas de GR4KG fue aproximadamente  $8 \times 10^9$  por gramo de suelo y los receptores fueron inoculados a cantidades de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  células por gramo de suelo en los diferentes microcosmos. La selección de los posibles transconjugantes se hizo sembrando una suspensión de suelo del microcosmos en medio selectivo adicionado de cicloheximida ( $150 \mu\text{g/ml}$ ) para evitar el crecimiento de posibles hongos. Varios meses después de la inoculación, sólo aparecieron unos pocos transconjugantes de la cepa GRM8SR en la concentración inoculada más alta ( $10^6$ ). Por tanto, el límite de detección es de  $10^6$  células de receptor por gramo de suelo, al menos para *R. meliloti*. No se observó la aparición de ningún tranconjugante de las cepas Rp55 a ninguna de las densidades celulares probadas, a pesar de que en condiciones de laboratorio esta cepa fue una buena receptora de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b.

También se estimó el número mínimo de transconjugantes necesarios para ser detectados a través de la planta. Para ello se escogieron tranconjugantes del plásmido pRmeGR4a de algunas de las cepas que habían soportado transferencia conjugativa de dicho plásmido y se inocularon en microcosmos de suelo no estéril a distintas cantidades ( $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , y  $10^5$  células por gramos de suelo). Las cepas elegidas fueron transconjugantes para el plásmido pRmeGR4a de Rp55, Rp60 y GRM8SR (que se usó como control). Varios meses después de la inoculación estas cepas fueron "capturadas" mediante su correspondiente planta hospedadora. Solamente fue posible detectar nódulos azules en el caso de GRM8SR portando el plásmido pRmeGR4a. Así, por ejemplo en los microcosmos donde esta cepa fue inoculada

a  $10^5$  células por gramo de suelo, el 45% de los nódulos analizados fueron azules y en el caso de los microcosmos donde la inoculación fue de  $10^4$  células por gramo de suelo, el 26% de los nódulos estaban ocupados por dicha cepa. Hay que tener en cuenta que GRM8SR portando sólo el plásmido pRmeGR4a es una cepa poco competitiva, pues en ensayos de microcosmos donde la cepa inoculada fue GR4KG (GRM8SR+pRmeGR4a+pRmeGR4b) el porcentaje de nódulos azules a  $10^5$  células por gramo de suelo fue del 45% y en los microcosmos de  $10^4$  células por gramo de suelo fue del 10%. La razón de esta mayor competitividad es que pRmeGR4b contiene una región denominada *nfe* relacionada con la mayor eficiencia competitiva de esta cepa (Sanjuán y Olivares, 1993).

En breve, a pesar de que existe un número relativamente abundante de posibles receptores en el suelo (según el cálculo realizado mediante el método del número más probable) que ha sido objeto de este estudio, no se ha podido detectar transferencia genética durante el período de tiempo experimental a pesar de que, en teoría, todas estas cepas pueden servir como receptores de los plásmidos marcados en el laboratorio.

### 2.3. Discusión.

La conclusión de este grupo de experimentos es que a pesar del número relativamente alto de posibles receptores en el suelo, no se ha podido detectar transferencia a lo largo del tiempo que duraron los experimentos. Muchos factores pueden influir en este fallo en la detección de la transferencia. En primer lugar el método de selección. Cuando surge un transconjugante, éste debe competir en el suelo con el resto de las poblaciones nativas, predadores, etc hasta alcanzar una densidad poblacional tal que sea posible aislarlo a través de la planta. Por otro lado, la transferencia también es una cuestión

temporal. Han de producirse las condiciones adecuadas para que en un determinado momento ocurra un evento de transferencia y que éste sea amplificado durante las siguientes generaciones de la célula que ha recibido el material genético, es decir, que exista una presión selectiva adecuada para que la incorporación de genes nuevos suponga una ventaja adaptativa. A diferencia de las condiciones de transferencia ensayadas en el laboratorio, el suelo está sujeto a variaciones en cuanto a las características propias del suelo, por ejemplo, cambios de pH, temperatura, humedad, nutrientes, etc que pueden favorecer o no el que se produzca en evento de transferencia. Por tanto, son muchos los factores que determinan que ocurra o no transferencia genética y que la población transconjugante florezca. El fallo en su detección puede estar provocado por una conjunción de todos estos elementos.

La consecuencia fundamental de la transferencia genética es un cambio de la biodiversidad en las poblaciones microbianas. Un ejemplo de biodiversidad originada por la introducción o inoculación de bacterias nuevas en el suelo es el estudio llevado a cabo en este trabajo de caracterización de la población que nodula judía. Esta planta es originaria de América y por tanto es probable que las cepas europeas que nodulan judía hayan surgido como consecuencia de la transferencia genética de los genes simbióticos desde las cepas americanas (*R. etli*) hasta cepas europeas que originariamente no eran simbioses de judía. Por tanto la introducción de las semillas de esta planta leguminosa puede ser considerada como un ejemplo de inoculación, aunque involuntaria, hace más de 500 años. Parece claro que tras la llegada de cepas de *R. etli*, los genes simbióticos de estas bacterias han sido transferidos a otras especies bacterianas. Es posible que hayan sido éstos los únicos eventos de transferencia. La discordancia entre el análisis filogenético de los genes 16S y electrofenotipos de enzimas metabólicas, sugiere que se hayan dado transferencia y recombinación de otro tipo de genes, posiblemente

cromosómicos. Es posible que estos otros eventos de transferencia hayan sido paralelos a la transferencia de los plásmidos simbióticos de *R. etli* a otras especies. Es muy significativo que en los 2 grupos de bacterias donde los resultados de 16S e isoenzimas son discordantes, existan cepas que han recibido el plásmido simbiótico de *R. etli*.

### 3. INHIBICION POR AMONIO DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS NO SIMBIOTICOS DE *Rhizobium meliloti* GR4.

#### 3.1. Transferencia conjugativa en diferentes fuentes de nitrógeno.

Un aspecto interesante fue el hecho de que la transferencia de los plásmidos crípticos de *R. meliloti* fue ligeramente mayor en medio mínimo (MM) adicionado de glutamato como fuente de nitrógeno que en medio rico TY (Tabla 1.1). Este hecho nos animó a realizar ensayos de transferencia en diferentes fuentes de nitrógeno y comprobar si las frecuencias de conjugación se ven afectadas por este factor nutritivo. Para ello, alícuotas de una misma mezcla de conjugación de GR4KL x GRM8SR se depositaron en filtros colocados sobre placas de MM conteniendo diferentes aminoácidos, sulfato amónico o nitrato potásico como únicas fuentes de nitrógeno (Tabla 3.1). Las frecuencias de transferencia observadas cuando la fuente de nitrógeno fue algún aminoácido cargado positivamente (tirosina, lisina o histidina), o bien amonio, resultaron significativamente inferiores que cuando en el medio de conjugación había glutamato o aminoácidos no cargados (alanina, leucina, etc). Se obtuvieron frecuencias intermedias cuando la fuente de nitrógeno fueron nitrato u otros aminoácidos.

La conjugación es un proceso que necesita un estado metabólicamente activo tanto del donador como del receptor y por tanto la eficiencia de la transferencia puede depender de los requerimientos nutritivos celulares. Para averiguar la posible relación entre la transferencia plasmídica y las tasas de crecimiento del donador o receptor en las distintas fuentes nitrogenadas, se obtuvieron curvas de crecimiento de las cepas donadora y receptora en medio rico (TY) o en MM adicionado del correspondiente aminoácido o amonio como

**TABLA 3.1. Frecuencia de transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b en distintas fuentes de nitrógeno<sup>1</sup>.**

Medio <sup>2</sup>	pRmeGR4a	pRmeGR4b	pRmeGR4a,b
T.Y.	$2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$
Amonio	$3 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Glutamato	$2 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-6}$
Prolina	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$
Hidroxiprolina	$8 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6}$
Leucina	$2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6}$
Isoleucina	$2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6}$
Serina	$3 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$
Fenilalanina	$3 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$
Alanina	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-7}$
Aspartato	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$
Glicina	$1 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$
Triptofano	$7 \times 10^{-6}$	$7 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$
Valina	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Metionina	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Treonina	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$
Arginina	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Ornitina	$1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Tirosina	$1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Cisteina	$4 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Lisina	$1 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
Histidina	$1 \times 10^{-7}$	$< 10^{-7}$	$< 10^{-7}$

<sup>1</sup> El donador fue GR4KL y el receptor GRM8SR.

<sup>2</sup> El medio utilizado fue Medio Mínimo que contenía cada una de los compuestos indicados. Amonio, sulfato o cloruro amónico 5 mM; la concentración de aminoácidos fue del 0'1%.

únicas fuentes de nitrógeno. Los resultados no relacionan las tasas de crecimiento del donador o receptor (Figura 3.1) con las frecuencias de transferencia en las diferentes fuentes de nitrógeno ensayadas (Tabla 3.1). Por

ejemplo, GR4KL y GRM8SR crecían bien en lisina o amonio pero la transferencia de plásmidos en MM conteniendo estos compuestos fue casi indetectable. Por el contrario, el crecimiento en metionina como única fuente de nitrógeno fue muy pobre, mientras que la transferencia ocurría a frecuencias intermedias (Tabla 3.1).

### 3.2. Efecto del amonio sobre la transferencia conjugativa de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b.

Se realizaron diversos experimentos para clarificar el efecto del amonio sobre la transferencia conjugativa de los plásmidos no simbióticos de la cepa GR4.

En primer lugar, se ensayó si el efecto del amonio era dependiente de la concentración de este compuesto en el medio. Para ello, alícuotas de una mezcla de conjugación GR4KL x GRM8SR se depositaron sobre filtros en placas de MM adicionado de distintas concentraciones de sulfato amónico o nitrato potásico. Como se observa en la Tabla 3.2, la transferencia del plásmido pRmeGR4a fue prácticamente indetectable a cualquier concentración de amonio empleada, entre 0,1 y 10 mM, mientras que no variaron a concentraciones crecientes de nitrato.

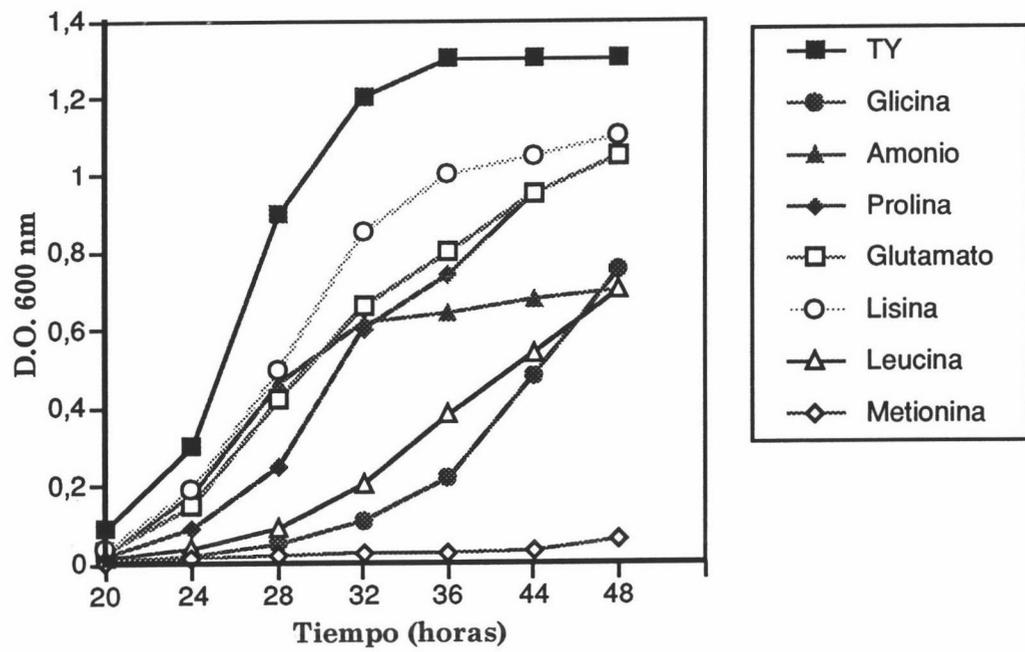
En otro grupos de experimentos pudo observarse que en combinación con glutamato o glutamina, el amonio ejercía un efecto claramente inhibitorio de la transferencia de pRmeGR4a a concentraciones iguales o superiores a 2,5 mM (Tabla 3.3). Este efecto inhibitorio no se observó con el nitrato ni con metilamina, un análogo del ión  $\text{NH}_4^+$  que no es metabolizado por la célula (Tabla 3.3). Quedaba claro, por tanto, que la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b no tiene lugar cuando la única fuente de nitrógeno disponible es amonio. Además este compuesto presenta un efecto inhibitorio de la transferencia conjugativa aún en combinación con otras fuentes de nitrógeno.

**TABLA 3.2. Frecuencias de conjugación de pRmeGR4a desde GR4KL a GRM8SR en amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno.**

Medio Mínimo	Frecuencia de conjugación
Glutamato (0.1%)	$2 \times 10^{-4}$
Amonio 0.1 mM	$1 \times 10^{-7}$
Amonio 0.5 mM	$1 \times 10^{-7}$
Amonio 1mM	$1 \times 10^{-7}$
Amonio 2.5 mM	$1 \times 10^{-7}$
Amonio 5 mM	$1 \times 10^{-7}$
Amonio 10 mM	$1 \times 10^{-7}$
Nitrato 1 mM	$1 \times 10^{-5}$
Nitrato 2.5 mM	$2 \times 10^{-5}$
Nitrato 5 mM	$2 \times 10^{-5}$
Nitrato 10 mM	$7 \times 10^{-5}$

\* Amonio, sulfato amónico; nitrato, nitrato potásico

Para profundizar más en este fenómeno se determinó la cinética de transferencia conjugativa de pRmeGR4a desde GR4KL a GRM8SR, tanto en medio TY como en MM+glutamato, MM+amonio y MM+glutamato+amonio. Como se observa en la Figura 3.2 la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b exhibe una cinética logarítmica en todos los medios ensayados, excepto para MM+amonio, en dónde no se detectaron transconjugantes durante un periodo de 48 h. Tanto en TY como en MM+glutamato, el número de transconjugantes incrementaba exponencialmente entre 3 y 12 h alcanzando un número máximo a las 24 h. Es de destacar que el número de tranconjugantes, tras 6 h de conjugación, fue aproximadamente un orden de



**FIGURA 3.1. Crecimiento de la cepa GR4KL en distintas fuentes de nitrógeno.**

**TABLA 3.3. Inhibición por amonio de la transferencia conjugativa del plasmido pRmeGR4a entre las cepas GR4KL y GRM8SR.**

Medio de conjugación	Frecuencias de transferencia
Glutamato 0,1%	$2 \times 10^{-4}$
Glutamato+Amonio 0,1 mM	$2 \times 10^{-4}$
Glutamato+Amonio 0,5 mM	$3 \times 10^{-4}$
Glutamato+Amonio 1 mM	$3 \times 10^{-4}$
Glutamato+Amonio 2,5 mM	$8 \times 10^{-6}$
Glutamato+Amonio 5 mM	$3 \times 10^{-6}$
Glutamato+Amonio 10 mM	$3 \times 10^{-6}$
Glutamato+Nitrato 10mM	$2 \times 10^{-4}$
Glutamato+Metilamina 10mM	$1 \times 10^{-4}$
Glutamina 0,1%	$1 \times 10^{-4}$
Glutamina+Amonio 2,5 mM	$1 \times 10^{-5}$
Glutamina+Amonio 5 mM	$5 \times 10^{-6}$
Glutamina+Amonio 10 mM	$5 \times 10^{-6}$

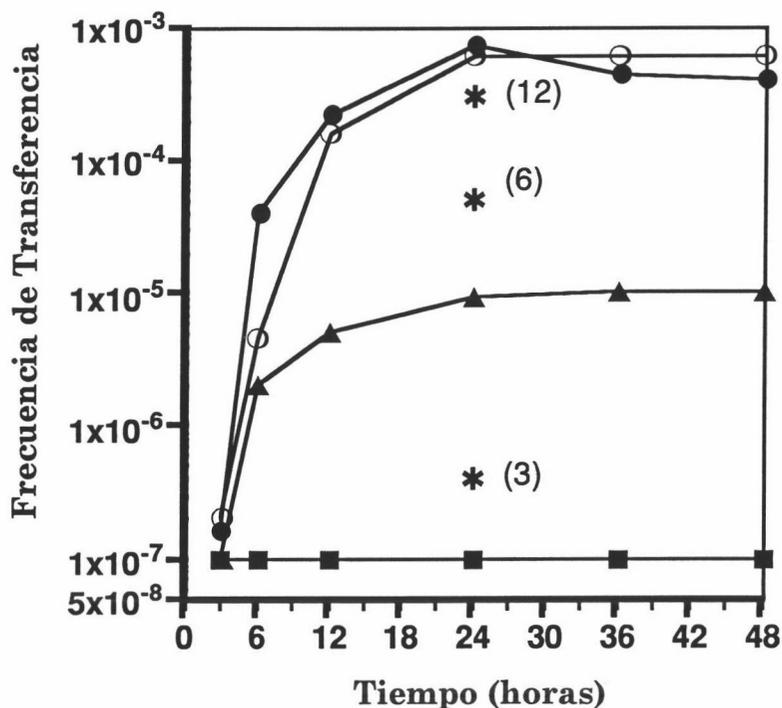
\* Amonio, sulfato amónico; nitrato, nitrato potásico.

magnitud mayor en MM+glutamato que en TY, aunque estos valores se igualaron a las 12 h de conjugación. En MM adicionado de glutamato y amonio, la cinética de conjugación fue también logarítmica, aunque los valores de transferencia fueron entre uno y dos órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos en MM con glutamato. Esto sugiere que la inhibición por amonio de la transferencia de pRmeGR4a es debida a una reducción en la eficiencia de conjugación más que a una baja velocidad de conjugación. Paralelamente a estos experimentos de cinética conjugativa, mezclas de conjugación cargadas inicialmente en MM+glutamato fueron transferidas a diferentes tiempos de conjugación (3, 6 y 12 h) a MM+amonio e incubadas hasta 24 h. Las frecuencias de transferencia observadas en estos casos están marcadas con asteriscos en la Figura 3.2. Como se observa, la inhibición de la transferencia por amonio fue

muy rápida. El efecto de la transferencia de las mezclas de conjugación desde MM+glutamato hasta MM+amonio fue muy parecido al efecto de la interrupción de la conjugación.

### 3.3. Efecto del amonio sobre la transferencia del plásmido RP4.

Para averiguar si el efecto negativo del amonio sobre la transferencia de los plásmidos indígenas de *R. meliloti* también podía hacerse extensivo a otro tipo de plásmidos, se estudió la transferencia de RP4, un plásmido de amplio rango de hospedador (Pansegrau *et al.*, 1994), desde GR4KL hasta GRM8SR. Como se muestra en la Tabla 3.4, la transferencia de RP4 desde GR4KL a GRM8SR no fue afectada por la presencia de amonio en el medio, en comparación con otras fuentes de nitrógeno. Sin embargo, un hecho bastante sorprendente fue que la transferencia de RP4 parecía interferir con la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b en los medios donde no se adicionó amonio. Esta inhibición puede estar relacionada con un fenómeno denominado inhibición de la fertilidad, por el cual algunos plásmidos bloquean la transferencia de otros plásmidos presentes en la misma célula. La inhibición de la fertilidad de plásmidos del grupo de incomaptibilidad IncW por RP4 ya ha sido demostrada previamente (Guiney, 1993).



**FIGURA 3.2. Cinéticas de conjugación del plásmido pRmeGR4a en varias fuentes de nitrógeno.**

Alícuotas de una mezcla de conjugación fueron incubadas en M.M. adicionado de (■) amonio, (▲) glutamato+ammonio, (●) glutamato, o en (○) TY, y la conjugación interrumpida a diferentes tiempos. Los asteriscos indican las frecuencias observadas en las mezclas de conjugación inicialmente incubadas en glutamato y transferidas a amonio a los tiempos indicados entre paréntesis.

**TABLA 3.4. Efecto del amonio en la transferencia de RP4 entre cepas de *Rhizobium meliloti*.**

<u>Cruce</u>	<u>Medio</u>	Frecuencias de conjugación		
		RP4	pRmeGR4a	pRmeGR4b
GR4KL(RP4) x				
GRM8SR	TY	$8 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-7}$
	G-MM	$3 \times 10^{-3}$	$7 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7}$
	G+NH <sub>4</sub> -MM	$6 \times 10^{-3}$	$< 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
	NH <sub>4</sub> -MM	$1 \times 10^{-3}$	$< 10^{-7}$	$< 10^{-7}$

**3.4. Efecto del amonio sobre la transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b a cepas de *Agrobacterium*.**

Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos para determinar si el amonio puede afectar a la transferencia de los plásmidos de GR4KL hasta especies fuera del género *Rhizobium*. Para ello se llevaron a cabo cruces entre GR4KL y *Agrobacterium tumefaciens* GMI9023 como receptor. La transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b no se inhibió por la presencia de amonio en el medio de conjugación (Tabla 3.5), indicando que la maquinaria conjugativa para la transferencia de pRmeGR4a desde GR4KL no está afectada por la presencia de amonio.

**TABLA 3.5. Efecto del amonio sobre la transferencia de pRmeGR4a y pRmeGR4b hasta *Agrobacterium tumefaciens* GMI9023.**

<u>Cruce</u>	<u>Medio</u>	<u>Frecuencias de conjugación</u>	
		pRmeGR4a	pRmeGR4b
GR4KL x GMI9023	TY	$6 \times 10^{-5}$	$9 \times 10^{-6}$
	G-MM	$8 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
	G+NH <sub>4</sub> -MM	$4 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-5}$

### 3.5. Discusión.

Los resultados presentados en esta sección permiten concluir que la transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4a, y por tanto también de pRmeGR4b, a *R. meliloti* es específicamente inhibida por la presencia de amonio en el medio, sin que esta circunstancia afecte de forma significativa a la velocidad de crecimiento de las bacterias. Desde un punto de vista más general, los resultados indican que dependiendo de factores medioambientales (en este caso, la fuente de nitrógeno) una misma cepa puede comportarse como buena, regular o mala receptora en términos de transferencia conjugativa.

Cuando el amonio es la única fuente de nitrógeno, o en combinación con otros como glutamato o glutamina, se inhibe la transferencia conjugativa de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b, a *R. meliloti* GRM8SR, pero no a *A. tumefaciens* GMI9023. Esto indica de forma inequívoca que la inhibición de la transferencia ocurre al nivel del receptor. Además, el hecho de que el amonio no afectase la transferencia conjugativa de RP4, indica que el amonio inhibe específicamente la transferencia de los plásmidos de *Rhizobium* y que esta inhibición no es debida a una respuesta metabólica general del receptor GRM8SR a la presencia de amonio en el medio. Sí parece probable que es el

amonio exógeno, y no el producido intracelularmente, el que provoca esta respuesta negativa específica de GRM8SR para la transferencia de pRmeGR4a, puesto que el nitrato, cuyo metabolismo da lugar a amonio intracelular, no tuvo ningún efecto negativo sobre la conjugación de este plásmido.

Los resultados sugieren que en presencia de amonio debe existir alguna modificación en las células receptoras que conduce a una reducción en la eficiencia de la transferencia conjugativa de los plásmidos rizobiáceos, pero no de RP4. ¿Qué se afecta en la célula receptora y de qué manera ejerce el amonio su efecto inhibitorio?. Es difícil proporcionar una explicación sobre qué es modificado en las células de GRM8SR en presencia de amonio para que la eficiencia de transferencia se reduzca. La inhibición probablemente ocurra en algún paso de la conjugación previo a la transferencia de ADN a la célula receptora, puesto que la estabilidad de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b no parece afectarse cuando las células crecen en medio con amonio como única fuente de nitrógeno (datos no mostrados).

La conjugación bacteriana mediada por plásmidos conjugativos en bacterias gram-negativas ocurre en los siguientes pasos: (i) reconocimiento del receptor por la célula donadora; (ii) contacto entre donador y receptor mediante una retracción del pilus; (iii) formación del agregado conjugativo y estabilización; (iv) transferencia de ADN al receptor y establecimiento del plásmido en ambas células; (v) disociación del agregado conjugativo. Puesto que la transferencia de pRmeGR4a hacia *A. tumefaciens* GMI9023 no se afecta por el amonio, se podría especular que el amonio, en *R. meliloti*, puede tener un efecto sobre la formación de la pareja conjugativa o sobre la estabilización del agregado debido a modificaciones en la superficie celular de la célula receptora. Se sabe muy poco sobre el paso del ADN a través de las membranas de los receptores durante la conjugación. En *E. coli* se han identificado dos clases de mutantes afectados en funciones de superficie y que son incapaces de servir

como receptores en procesos conjugativos. Estudios en mutantes Con-, defectivos en conjugación, han revelado que la proteína de membrana externa OmpA y el lipopolisacárido (LPS) son componentes importantes de la célula receptora. Alteraciones en el LPS o en OmpA previenen la formación de un agregado conjugativo estable (Anthony *et al.*, 1994; Dreiseikelmann, 1994). Es posible, por tanto, que en presencia de amonio algún componente de la superficie de las células receptoras de *R. meliloti*, importante para la formación del agregado conjugativo y/o su estabilización se modifique previniendo o reduciendo la transferencia de los plásmidos. Hay que hacer notar que la inhibición del amonio sobre la transferencia de los plásmidos fue rápida cuando las mezclas conjugativas se transfirieron desde MM+glutamato a MM conteniendo amonio (Figura 3.2), indicando que la mayoría de los puentes conjugativos ya formados no progresaron más, quizás por una desestabilización inducida tras el cambio a MM+amonio, o que no se formaron nuevos puentes conjugativos. Cualquiera que sea el componente que se altere en la superficie de *R. meliloti*, podría ser importante para la supervivencia celular, ya que los intentos para conseguir mutantes de GRM8SR capaces de servir como receptores en medios conteniendo amonio han resultado infructuosos hasta el momento.

Por otro lado, no existe una explicación clara del mecanismo por el cual el amonio conduce a una disminución en la eficiencia de la transferencia de plásmidos. El amonio, *per se*, podría afectar algunas funciones generales o componentes de la superficie celular, tales como el potencial electroquímico de la membrana, influenciando el pH intracelular o periplásmico, lo que podría conducir a una desestabilización del agregado conjugativo. Si este es el caso, este efecto es específico para la transferencia de los plásmidos de *R. meliloti*, puesto que el amonio no afecta la transferencia de RP4 entre cepas de *R. meliloti*. Además, dicho efecto no tendría lugar en células receptoras de *A. tumefaciens* GMI9023. Otra posibilidad es que el amonio interfiera con la

síntesis o ensamblaje correcto de un componente de la célula de *R. meliloti* receptora que fuese esencial para una transferencia conjugativa eficiente. En cualquier caso, si el efecto del amonio sobre GRM8SR es exclusivamente iónico, este debe ser muy específico, ya que la metilamina, iónicamente análogo, no provocó este efecto, e interfiere exclusivamente con la transferencia de pRmeGR4a, y por tanto, de pRmeGR4b.

Alternativamente, un producto del metabolismo del amonio podría ser responsable de los efectos observados en la transferencia de los plásmidos de *R. meliloti*. En esta bacteria, el amonio se asimila por la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS/GOGAT). Aunque existe una actividad glutamato deshidrogenasa, ésta no interviene en la asimilación del amonio, pues mutantes que carecen de actividad GOGAT son incapaces de crecer en amonio a pesar de tener actividad glutamato deshidrogenasa (Osburne y Signer, 1980; Lewis *et al.*, 1990). En medios que contienen glutamato y amonio, se puede observar una actividad máxima tanto de GOGAT como de glutamato deshidrogenasa. Puesto que el nitrato, asimilado via nitrato reductasa/nitrito reductasa acoplada a GS/GOGAT, no tiene una influencia sobre la transferencia de plásmidos, es bastante improbable que un producto del metabolismo del amonio sea el responsable de la inhibición de la transferencia conjugativa de los plásmidos de *R. meliloti*. Con los datos disponibles es difícil dar una explicación acertada de como el amonio ejerce su efecto inhibitorio sobre la transferencia plasmídica.

Es posible que los cambios inducidos por el amonio en la cepa GRM8SR, que conducen a su ineficiencia para actuar como receptora de plásmidos, sean expresados constitutivamente en otras cepas. Esto podría explicar las diferentes frecuencias de transferencia de plásmidos obtenidas cuando se han usado otras cepas de *R. meliloti* como receptores. Por ejemplo, las tasas de transferencia pRmeGR4a a *R. meliloti* 2011, y a los aislados de *R. meliloti* que han sido objeto de estudio en el presente trabajo (Mercado-Blanco y Olivares,

1993b; capítulo 2 de resultados, este trabajo), son varios órdenes de magnitud inferiores a las obtenidas para la cepa GRM8SR. Todas estas especulaciones podrían explicar las dificultades encontradas para detectar transferencia genética en experimentos de suelo en donde las poblaciones de *Rhizobium* son relativamente abundantes. La transferencia genética por conjugación puede estar condicionada, además de las propiedades físicas y químicas del suelo, por el estado metabólico y nutricional de los posibles receptores. Los resultados presentados para la cepa GRM8SR indican claramente que los factores nutritivos pueden afectar al éxito de esta cepa como posible receptor sin que ello suponga tara metabólica alguna que interfiera con el crecimiento normal de las células. En este sentido, parece bastante difícil averiguar las condiciones óptimas para la transferencia conjugativa de un plásmido en concreto, pues existen una amplia variedad de factores bióticos y abióticos que pueden afectar las tasas de conjugación (en este caso la fuente de nitrógeno). En concordancia con esto, no todos los individuos de un suelo pueden ser considerados como posibles receptores bajo unas condiciones determinadas y, en cada caso, sería necesario definir las condiciones óptimas de transferencia de plásmidos concretos hasta receptores concretos.

#### 4. IDENTIFICACION DE ORIGENES DE TRANSFERENCIA

##### CONJUGATIVA (*oriT*) EN EL GENOMA DE *Rhizobium meliloti* GR4.

Son varios los requisitos necesarios para la cuantificación de transferencia genética horizontal por conjugación:

1. Que el ADN transferible codifique para una o varias funciones (marcadores) que confieran ventaja selectiva a los transconjugantes.

2. Que el ADN transferible se replique (autónomamente o no) de forma estable en los transconjugantes.

3. Que tales marcadores se expresen adecuadamente en los transconjugantes.

4. Que se den las condiciones selectivas adecuadas para que la población de transconjugantes prolifere en respuesta a la ventaja adaptativa conferida por la expresión del ADN adquirido.

Siempre que se den estas 4 condiciones, se podrá cuantificar los fenómenos de transferencia lateral de un determinado replicón o región de ADN no autorreplicativa. Sin embargo, en ausencia de uno cualquiera de estos requisitos, la transferencia genética será indetectable y simplemente se concluirá que no se han dado procesos de transferencia genética del ADN o replicón en cuestión.

Es obvio, que si no se da el requisito 4, la transferencia genética será no sólo imperceptible, sino que posiblemente carecerá de interés.

Sin embargo, si un ADN codifica para otras funciones, además de las que nosotros consideramos “útiles” (en este caso, los marcadores), que en muchos casos desconocemos, ¿como sabremos si existe condiciones naturales selectivas para ese otro ADN?. Es más, si en una misma célula coexisten distintos replicones susceptibles de transferencia, ¿como podemos detectar la transferencia de aquellos que no están “útilmente” marcados?. En definitiva, podríamos estar desestimando eventos de transferencia genética de replicones,

o partes de replicones, que no han sido adecuadamente marcados simplemente porque desconocemos su potencial de transferencia, o porque desconocemos las funciones para las que codifica y, por tanto, las condiciones ambientales que favorecería su transferencia estable a otras bacterias. Con todas estas cuestiones sobre la mesa, parece claro que los estudios de transferencia de 1 replicón marcado, son sólo estudios parciales de lo que puede significar la transferencia genética horizontal en bacterias. Tal vez debería considerarse los fenómenos de transferencia genética horizontal como un proceso global, en el que no siempre es el mismo ADN el que resulta transferido y seleccionado, sino que dependiendo de las condiciones mediambientales, se seleccionarán sólo determinados eventos de transferencia.

Este tipo de estudios “globales” del fenómeno de transferencia requerirían un conocimiento muy detallado del genoma bacteriano. Una forma de abordarlo podría ser el conocer los replicones que son susceptibles de transferencia, cosa poco menos que imposible si no se conocen en detalle al menos las funciones para las que codifican. En el caso de la conjugación, si sería posible determinar el potencial de transferencia conjugativa del genoma de una bacteria, simplemente identificando los sitios de inicio de la transferencia. Está aceptado universalmente que la transferencia de ADN por conjugación requiere de una región específica, que sirve de sitio de inicio y terminación de la transferencia conjugativa, *oriT* o *mob*. El *oriT* es la única función en *cis* requerida para la transferencia conjugativa de ADN, y puede ser fácilmente reconocida por su capacidad para convertir en transmisible a un plásmido no movilizable.

Con la finalidad de reconocer el potencial de transferencia conjugativa de los distintos replicones que componen el genoma de *R. meliloti* GR4, se diseñó una estrategia de selección de orígenes de transferencia en esta bacteria. Para ello se hizo uso de un banco de genes de *R. meliloti* GR4 y de cepas deficientes en recombinación homóloga.

Se obtuvieron cepas derivadas de GR4KLR, curadas de los plásmidos crípticos, mediante crecimiento de la misma a temperatura supraóptima (37 °C) tal y como lo describe Mercado-Blanco y Olivares (1993b). De esta manera se obtuvieron: GRM10KR (curada de pRmeGR4a), GRM6LR (curada de pRmeGR4b) y GRM8R (curada de pRmeGR4a y pRmeGR4b). La obtención de estas cepas permitió abarcar el estudio del aislamiento de regiones movilizables en *R. meliloti* GR4 desde diferentes fondos genéticos.

#### 4.1. Selección e identificación de cósmidos movilizables.

Para identificar regiones de ADN de *Rhizobium meliloti* GR4 capaces de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable, se utilizó un banco de genes de GR4 construido en pLAFR1. Este cósmido es un derivado de RK2 que codifica resistencia a tetraciclina y que contiene el origen de transferencia de RK2 (*mob*), pero carece de la mayoría de las funciones *tra* necesarias para su propia movilización (Ditta *et al.*, 1980). pLAFR1 puede ser movilizadado en *trans* por plásmidos portadores de funciones *tra* específicas de RK2, pero no puede ser movilizadado desde *R. meliloti* en ausencia de un plásmido movilizadador adecuado.

Se transfirió el banco de genes de la cepa GR4 desde *E. coli* HB101 a cada una de las cepas *recA*<sup>-</sup> (GR4KLR, GRM10KR, GRM6LR) mediante conjugación triparental, usando pRK2013 como plásmido movilizadador, y obteniéndose las correspondientes poblaciones merodiploides donde cada célula individual es portadora de un sólo cósmido híbrido. Cada una de estas poblaciones merodiploides se usó como donador en masa en conjugaciones con la cepa receptora de *R. meliloti* GRM8SR, seleccionando transconjugantes para Sm<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup> y Tc<sup>r</sup>. La transferencia de la resistencia a tetraciclina, codificada por pLAFR1, a la cepa receptora ocurre sólo en caso de que los cósmidos contengan ADN de *R. meliloti* que pueda servir como un origen de transferencia funcional

y que su transferencia a la célula receptora sea mediada o bien por el propio ADN adyacente al *oriT*, o bien por la funciones aportadas desde el genoma de la célula donadora. La utilización de cepas donadoras  $\text{RecA}^-$  limita la falsa movilización debido a fenómenos de cointegración, por recombinación homóloga, del cósmido híbrido con alguno de los replicones autotransmisibles o movilizables de GR4.

Usando la población merodiploide de GR4KLR como donadora, se obtuvieron transconjugantes de GRM8SR resistentes a tetraciclina a una frecuencia de  $6 \times 10^{-7}$ . Se escogieron 24 transconjugantes al azar y se aislaron los cósmidos presentes en cada uno de ellos mediante procedimientos estándar. Posteriormente estos cósmidos se sometieron a un análisis de restricción con la endonucleasa *EcoRI* (Tabla 4.1). Todos los cósmidos presentaron un perfil de restricción idéntico, lo que indicaba que este cósmido se transfiere a altas frecuencias desde GR4KLR (Tabla 4.1). El cósmido se denominó pRmOR69. Cuando la población merodiploide de GRM6LR se usó como donadora, se identificaron 4 cósmidos diferentes entre los transconjugantes de GRM8SR analizados (Figura 4.1). Uno de ellos presentó idéntico perfil de restricción que pRmOR69 y compartía dos fragmentos con otros dos cósmidos, pRmOR610 y pRmOR612, lo cual indicaba que estos tres plásmidos contenían insertos de ADN solapantes. El cuarto cósmido (pRmOR65) tenía un perfil de restricción completamente diferente y estaba presente en 2 de los 24 transconjugantes analizados (Tabla 4.1).

Usando GRM10KR como población merodiploide donadora, los transconjugantes de GRM8SR aparecieron a frecuencias del orden de  $10^{-5}$ . En este caso, la mayoría de los cósmidos transconjugantes analizados no pudieron ser completamente digeridos con *EcoRI* ni con varias otras enzimas de restricción. Se desconoce la razón de este problema en las restricciones de los ADNs de los cósmidos, pero pudiera estar relacionada con una conformación o protección particular de los insertos de ADN de *R. meliloti*, ya que sí se

**TABLA 4.1. Identificación de los cósmidos en los transconjugantes de GRM8SR aparecidos en los cruces usando donadores merodiploides.**

Donador merodiploide	Frecuencia de conjugación	Transconjugantes analizados	Tipos de cósmidos <sup>1</sup>	No. cósmidos no solapantes
GR4KLR	6.0 X 10 <sup>-7</sup>	24	pRmOR69 (24)	1
GR4M6LR	8.2 X 10 <sup>-7</sup>	24	pRmOR69 (10) pRmOR610 (4) pRmOR612 (8) pRmOR65 (2)	2
GRM10KR	1 x 10 <sup>-5</sup>	44 <sup>2</sup>	pRmOR106 (1) pRmOR1012 (1) pRmOR1026 (1) pRmOR1030 (1) pRmOR1033 (1) pRmOR1034 (3) pRmOR1035 (1) pRmOR1041 (1) pRmOR1042 (4)	9

puedieron detectar fragmentos de restricción específicos del vector pLAFR1. En vista de estos resultados, se decidió usar algunos de los ADNs extraídos de los transconjugantes de GRM8SR para transformar células competentes de *E. coli* HB101. Una vez aislados los cósmidos transformantes a partir de *E. coli*, éstos se pudieron digerir exitosamente y se identificaron 14 cósmidos de los cuales 9 eran no solapantes y que además fueron completamente de los movilizados a partir de GR4KLR y GRM6LR (Tabla 4.1). En la Figura 4.2 se presenta el perfil de restricción de los cósmidos *mob* totales obtenidos.

Para volver a verificar que los cósmidos aislados eran efectivamente movilizables, se transfirieron individualmente desde *E. coli* a las cepas RecA<sup>-</sup> de *R. meliloti*, y las correspondientes cepas se conjugaron individualmente con la cepa receptora GRM8SR. Excepto para pRmOR65 y pRmOR69, que no pudieron ser movilizados desde el donador GRM10KR (cepa curada de pRmeGR4a), todos los cósmidos híbridos se movilizaron a alta frecuencia desde todos los donadores (Tabla 4.2). La eficiencia de transferencia, sin embargo, varió dependiendo del fondo genético del donador. Plásmidos que originalmente fueron aislados de cruces GRM10KR x GRM8SR se movilizaban desde GRM10KR a una mayor frecuencia que desde GR4KLR o GRM6LR (Tabla 4.2), lo que explica su abundancia entre los transconjugantes aparecidos de cada cruce inicial en particular (Tabla 4.1). Sin embargo, esto no fue tan obvio en otros casos, y por ejemplo, todos los cósmidos se movilizaron desde GR4KLR a frecuencias similares. Estos resultados indican, por un lado, que la estrategia empleada es efectiva seleccionando cósmidos híbridos movilizables presentes en el banco de genes de GR4 y, por otro, que la eficiencia de transferencia de los ADNs clonados depende del contenido en plásmidos de la cepa donadora.

**TABLA 4.2. Frecuencias de transferencia de cósmidos *mob* individuales desde los diferentes donadores *recA* de *R. meliloti* a *R. meliloti* GRM8SR.**

Cosmido	GR4KLR	GRM6LR	GRM10KR
pRmOR69	$1.4 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-5}$	$< 10^{-8}$
pRmOR65	$7.5 \times 10^{-5}$	$6.2 \times 10^{-6}$	$< 10^{-8}$
pRmOR106	$1.7 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-2}$
pRmOR1012	$1.8 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$3.7 \times 10^{-2}$
pRmOR1026	$2.7 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-2}$
pRmOR1030	$3.0 \times 10^{-3}$	$8.5 \times 10^{-4}$	$6.0 \times 10^{-2}$
pRmOR1033	$2.4 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-2}$
pRmOR1034	$9.3 \times 10^{-4}$	$1.7 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-2}$
pRmOR1035	$3.2 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-3}$
pRmOR1041	$5.4 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-4}$	$9.0 \times 10^{-3}$
pRmOR1042	$2.0 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-4}$	$5.5 \times 10^{-3}$

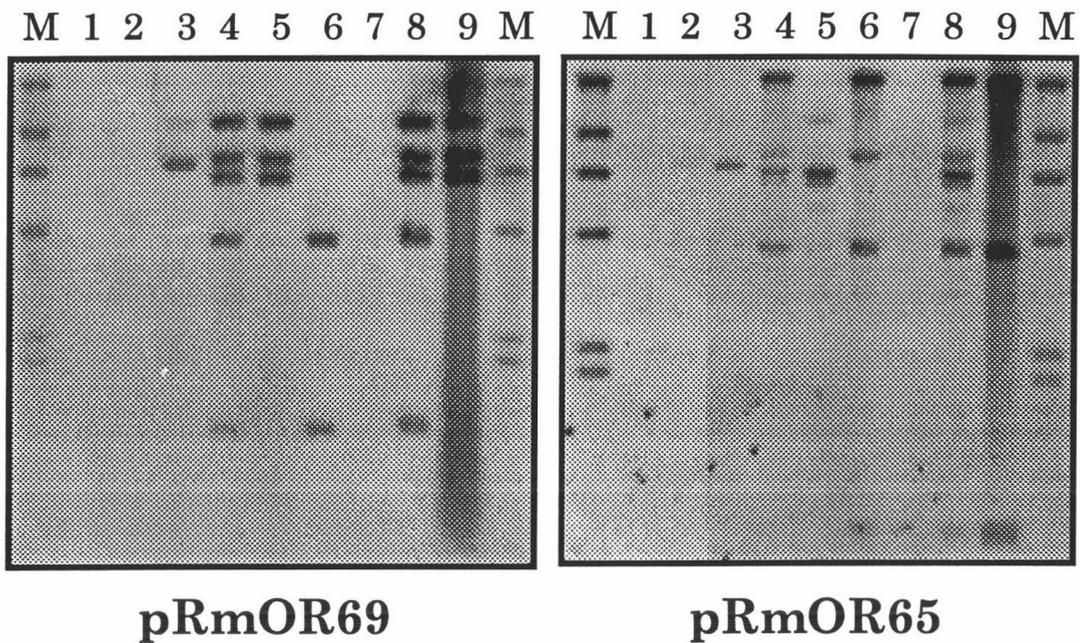
#### 4.2. Localización genómica de las regiones *mob* clonadas.

Para encontrar la localización genómica de los ADNs *mob* clonados, se utilizó cada cósmido individualmente como sonda en hibridaciones frente ADNs genómicos de varias cepas de *R. meliloti* con diferentes contenidos en plásmidos, así como frente a ADNs de cepas de *A. tumefaciens* portando el pSym1 o el pSym2 de *R. meliloti*. El uso de ADN genómico de estas cepas permite: i) averiguar la localización de los diferentes cósmidos entre los diferentes replicones de *R. meliloti*, puesto que una cepa que carece de un replicón en concreto no debería presentar una señal de hibridación, además de discernir la posible hibridación cruzada o no específica con otros replicones y ii) para verificar que los ADNs clonados no han sufrido ninguna reorganización

debido a las diferentes manipulaciones a las que han estado sujetos, p.e. el ADN genómico de la cepa silvestre GR4 y el ADN del cósmido deben presentar los mismos perfiles de hibridación.

Como se muestra en la Figura 4.3, el plásmido pRmOR69 contenía ADN del plásmido críptico pRmeGR4a, ya que las bandas de hibridación que corresponden a las del cósmido usado como sonda (carril 9) estaban presentes sólo en las cepas portadoras de pRmeGR4a (carriles 4, 5 y 8), aunque dicho cósmido también presenta hibridación cruzada con el ADN de cepas que portan el plásmido pRmeGR4b. El cósmido pRmOR65 contiene ADN perteneciente al plásmido pRmeGR4b (carriles 4, 6 y 8) e hibrida también con el ADN del plásmido pRmeGR4a (Figura 4.3). La localización del AND clonado en estos dos cósmidos (pRmOR65 y pRmOR69) en los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b explicaría por que no pueden ser movilizados desde cepas que carecen de pRmeGR4a (donador GRM10KR, Tabla 4.2). Puesto que este plásmido es autotransmisible y se requiere para la movilización en *trans* de pRmeGR4b, como ya hemos visto en el capítulo 1, también sería necesaria su presencia para movilizar los clones que contengan el *oriT* de estos plásmidos, en este caso, pRmOR65 y 69. Más aún, las frecuencias de transferencia de pRmOR69 y pRmOR65 fueron similares a las obtenidas para pRmeGR4a y pRmeGR4b respectivamente (Tabla 4.3).

También se han identificado 4 plásmidos *mob*, pRmOR106, 1012, 1026 y 1034, que contienen ADN del megaplásmido simbiótico 1. Los perfiles de hibridación fueron similares, cuando no idénticos, a los que presentaban las cepas de *R. meliloti* GR4 y 2011 y *A. tumefaciens* C58 (pRme2011a) (carriles 1, 3, 4 de las correspondientes hibridaciones en la Figura 4.4). Los cósmidos pRmOR1026 y 1034 no mostraban señales de hibridación con la cepa GRT3, una cepa derivada de GR4 que presenta una delección en el megaplásmido 1 que comprende varios cientos de kilobases alrededor de los genes *nod-nif* (Toro y Olivares, 1986), (carril 8 de las correspondientes hibridaciones en la Figura



**FIGURA 4.3. Localización genómica de los ADNs contenidos en los cósmidos *mob* pRmOR69 y pRmeOR65.**

Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *EcoRI* frente a los correspondientes cósmidos usados como sonda.  
 Carriles: M, marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina;  
 1, R.m. 2011; 2, A.t. C58; 3, A.t. C58(pRme2011a); 4, R.m. GR4;  
 5, R.m. GRM6; 6, R.m. GRM10; 7, R.m. GRM8; 8, R.m. GRT3;  
 9, cósmido digerido con *EcoRI*.



4.4), lo que confirma que los ADNs clonados en estos dos cósmidos pertenecen al pSym1. El inserto de ADN en el cósmido pRmOR106 porta dos fragmentos *EcoRI* de un tamaño aproximado de 13 kb, ambos presentes en las cepas derivadas de GR4, mientras que en 2011 y C58 (pRme2011a) sólo se observaba una señal de hibridación de un tamaño aproximado de 25 kb. Las diferencias pueden ser debidas a variaciones en los sitios de restricción entre las dos cepas silvestres GR4 y 2011 (la cepa 2011 presentaría un sitio *EcoRI* menos con respecto a GR4).

El cósmido pRmOR1035, claramente tiene clonado ADN perteneciente al megaplásmido 2, puesto que se observan perfiles de hibridación idénticos entre las cepas 2011 y At 104 (carriles 1 y 3 de la correspondiente hibridación en la Figura 4.5). Sin embargo este perfil coincide sólo parcialmente con el encontrado en GR4 y en el cósmido. Otro plásmido *mob*, pRmOR1030 parece contener ADN que podría estar repetido dentro del genoma de GR4, a tenor de las múltiples bandas de hibridación no específicas presentes en el ADN de GR4 y sus derivados (carriles 4 a 8 de la Figura 4.6). Parte de estas señales no específicas pueden ser debidas al ADN del megaplásmido 1, pues también se detectaron en la cepa 2011 y C58 (pRme2011a) (carriles 1, 3 de la Figura 4.6). Sin embargo el ADN clonado en pRmOR1030 pudiera ser específico de GR4 pues las bandas de hibridación específicas del cósmido sólo se detectaron en la cepa GR4 y sus derivadas. Dada la metodología empleada, no se puede asignar una localización genómica al ADN clonado en este cósmido.

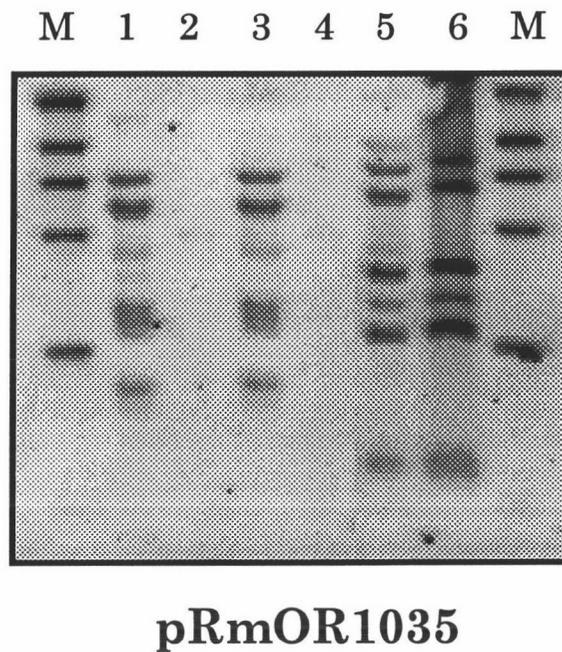
Finalmente, los cósmidos pRmOR1033, 1041 y 1042, claramente contienen ADN presente en las cepas silvestres de *R. meliloti* 2011 y GR4, pues los perfiles de hibridación son similares, cuando no idénticos, entre sí y con el propio cósmido. Sin embargo estos ADNs clonados en los cósmidos no parecen corresponderse con ninguno de los replicones extracromosómicos que portan estas cepas (carriles 3 y 4 de las correspondientes hibridaciones en la Figura

4.7). Por exclusión, estos ADNs deben ser considerados como regiones *mob* cromosómicas.

Es de destacar el hecho de que la mayoría de los cósmidos *mob* seleccionados porten ADN perteneciente a plásmidos (7 de 11). Sin embargo, en base a la estrategia seguida, debería haber sido posible también seleccionar ADN cromosómico que pueda servir como origen de transferencia conjugativa, como de hecho indican los resultados.

#### 4.3. Caracterización de la región mínima de transferencia del plásmido pRmeGR4a.

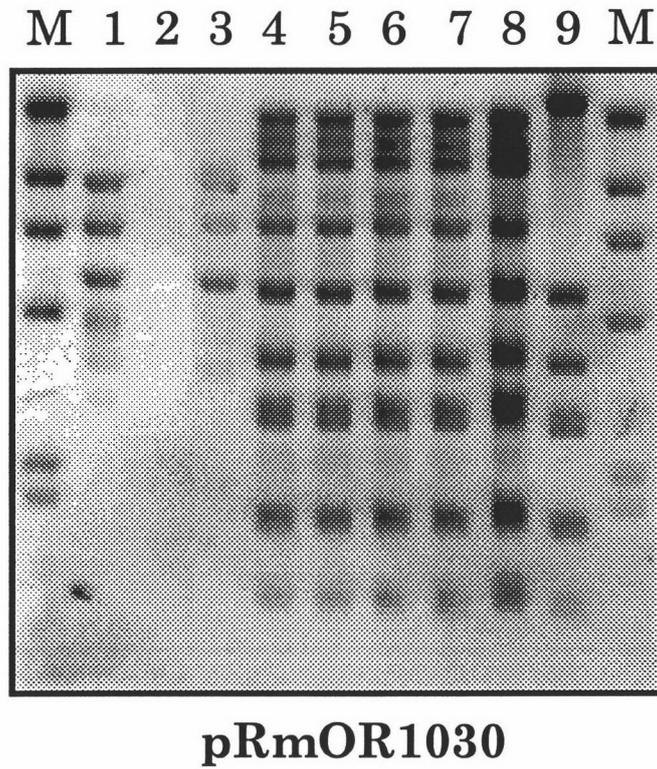
Se llevó a cabo la identificación del fragmento mínimo capaz de soportar la transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4a. Como se mostró en la Figura 4.1, los cósmidos pRmOR69, pRmOR610 y pRmOR612 presentaban 2 fragmentos solapantes de 6 y 7 kb respectivamente. Es lógico deducir, pues, que en alguno de estos 2 fragmentos se encuentre el posible *oriT* de pRmeGR4a. Para averiguarlo se llevó a cabo la clonación independiente de cada uno de los fragmentos en el vector pJB3Tc19 (Blatny *et al.*, 1997). Este vector se replica establemente en *Rhizobium*, pero no puede ser movilizado por funciones de transferencia codificadas en *Rhizobium*, por lo que, al igual que pLAFR1, supone un buen sistema para comprobar si los fragmentos clonados contienen o no el posible *oriT*. Una vez clonados ambos fragmentos de 6 y 7 kb, se transfirieron independientemente por conjugación desde *E. coli* hasta la cepa GRM6LR, la cual se usó entonces como donadora en conjugación con GRM8SR, calculándose las frecuencias de transferencia, en el caso de que las hubiera. Sólo el fragmento *EcoRI* de 6 kb seguía manteniendo su capacidad de movilizar a pJB3. A partir de este fragmento se subclonaron de nuevo en pJB3 2 fragmentos *EcoRI-BamHI* de 2'5 y 3'5 kb, respectivamente. En la Figura 4.8 se representan los pasos llevados a cabo hasta la identificación del menor



**FIGURA 4.5. Localización genómica del ADN contenido en el cósmido *mob* pRmOR1035.**

Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *Eco*RI frente al cósmido pRmOR1035 usado como sonda.

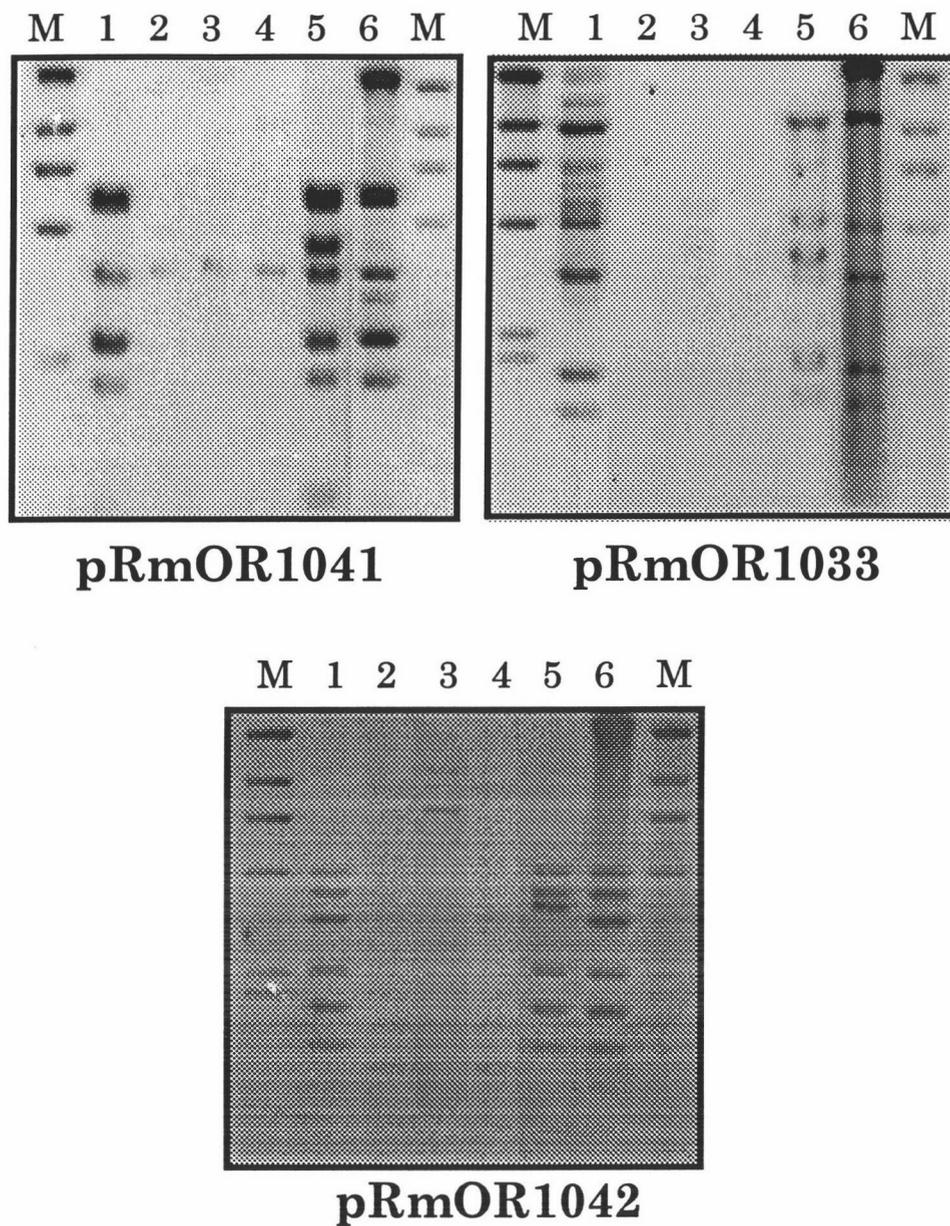
Carriles: M, marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina; 1, R.m. 2011; 2, A.t. C58; 3, A.t. 104 (C58 con pRmeSU47b); 4, A.t. 117 (C58 con pRmeSU47a); 5, R.m. GR4; 6, pRmeOR1035 digerido con *Eco*RI.



**FIGURA 4.6. Localización genómica del ADN contenido en el cósmido *mob* pRmOR1030.**

Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *EcoRI* frente al correspondiente cósmido usado como sonda.

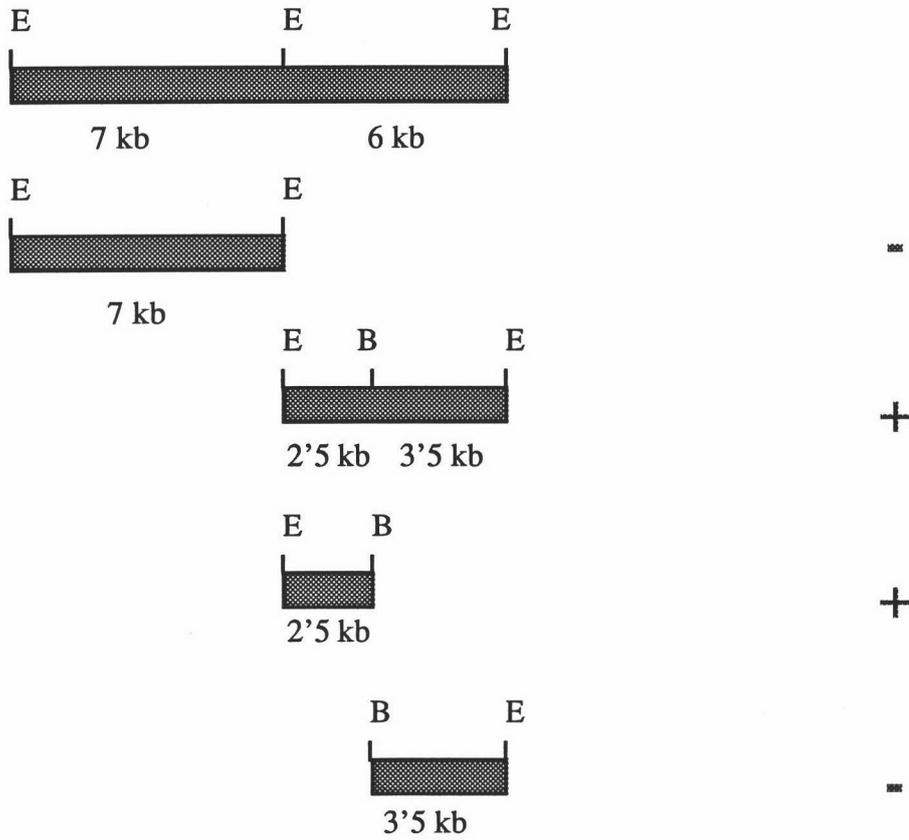
Carriles: M, marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina; 1, R.m. 2011; 2, A.t. C58; 3, A.t. C58(pRme2011a); 4, R.m. GR4; 5, R.m. GRM6; 6, R.m. GRM10; 7, R.m. GRM8; 8, R.m. GRT3; 9, pRmOR1030 digerido con *EcoRI*.



**FIGURA 4.7. Localización genómica del ADN contenido en los cósmidos *mob* pRmOR1033, 1041 y 1042.**

Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *Eco*RI frente a los correspondientes cósmidos usados como sonda.  
 Carriles: M, marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina; 1, R.m. 2011; 2, A.t. C58; 3, A.t. 104 (C58 con pRmeSU47b); 4, A.t. 117 (C58 con pRmeSU47a); 5, R.m. GR4; 6, cósmido digerido con *Eco*RI.

## Capacidad de Movilización



**FIGURA 4.8.** Capacidad de movilización de los diferentes subclones para determinar el fragmento mínimo que contiene el posible *oriT* de pRmeGR4a.

fragmento de ADN capaz de convertir a pJB3 en un plásmido movilizable desde GRM6LR hasta GRM8SR. Esta función seguía mantenida en el fragmento *EcoRI-BamHI* de 2,5 kb. Posteriormente se inició la caracterización de dicho fragmento mediante el análisis de su secuencia. Para ello se clonó en el vector pBSKS(+) y se inició su secuenciación a partir de cebadores específicos del vector, continuándose la secuenciación mediante cebadores diseñados a partir de la secuencia obtenida. Aunque hasta el momento no se ha podido caracterizar de forma precisa el *oriT*, si existe una organización genética característica de los orígenes de transferencia de plásmidos. Por ejemplo, existen dos posibles ORFs, que presentan homología con proteínas Mob y proteínas relacionadas con estabilización de ADN, que se transcriben en dirección contraria, separados por una región rica en A+T. Además en dicha región existen un número elevado de repeticiones directas e invertidas características de las regiones de ADN cercanas al *oriT*. Por tanto todas las evidencias parecen indicar que, probablemente, dentro de este fragmento se encuentre el *oriT* de pRmeGR4a. Sin embargo, un estudio más profundo a nivel funcional del origen de transferencia es necesario para poder determinar en la secuencia el sitio exacto donde se produce el corte o mella que sirve para el inicio de la transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4a.

#### 4.4. Transferencia conjugativa de los plásmidos *mob* de *Rhizobium meliloti* a *Escherichia coli*.

Es bien sabido que la transferencia conjugativa de los plásmidos de *Rhizobium* puede ocurrir dentro de especies de la familia *Rhizobiaceae*, en donde los plásmidos pueden replicarse y mantenerse establemente (Mercado-Blanco y Toro, 1996). Sin embargo, no se sabe si los plásmidos de *Rhizobium* pueden transferirse a hospedadores bacterianos incapaces de mantener una replicación estable de los mismos. Para estudiar un poco más a fondo la

transferencia de las regiones *mob* clonadas, se ha elegido *E. coli* HB101 como un ejemplo extremo de una bacteria gram-negativa no relacionada con *Rhizobium*, donde los plásmidos de *Rhizobium* no pueden replicarse (Mercado-Blanco y Toro, 1996).

Se llevaron a cabo conjugaciones individuales entre los donadores *recA*<sup>-</sup> de *R. meliloti* (GR4KLR, GRM10KR, GRM6LR Y GRM8R) portando los cósmidos *mob* identificados, con la cepa de *E. coli* HB101 como receptora. El vector pLAFR1 puede replicarse establemente tanto en *Rhizobium* como en *E. coli*. Los transconjugantes se seleccionaron para la adquisición de la resistencia a tetraciclina, codificada por pLAFR1, en placas de ENDO agar, un medio selectivo para coliformes en el cual *R. meliloti* es incapaz de crecer. Todos los plásmidos *mob* se transfirieron eficientemente desde *Rhizobium* a HB101 y, al igual que ocurría con *Rhizobium* como receptor, las eficiencia de transferencia dependieron nuevamente del contenido en plásmidos del donador (Tabla 4.4). Las frecuencias de transferencia de las cepas GR4KLR y GRM10KR (ambos portan el plásmido no simbiótico pRmeGR4b) fueron varios órdenes de magnitud inferiores a las detectadas a partir de GRM6LR (que carece de pRmeGR4b) o GRM8R (que carece de pRmeGR4a y pRmeGR4b), lo cual indica que la presencia de pRmeGR4b en la cepa donadora fue responsable de una reducción significativa en la eficiencia de transferencia. Por otro lado, fue bastante sorprendente el hecho de que en la mayoría de los casos la transferencia desde GRM6LR a *E. coli* fue mucho más eficiente que la transferencia a *R. meliloti* GRM8SR. Excepto para el plásmido pRmeGR4a, la mutación *recA*, y la resistencia a antibióticos, las cepas GRM6LR y GRM8SR son genéticamente idénticas (ambas portan los mismo plásmidos simbióticos y cromosoma). Por ello, es posible que algunos mecanismos de exclusión superficial puedan operar en GRM8SR como cepa receptora, que pudieran ser responsables de la reducción en la eficiencia de transferencia. La alta eficiencia de transferencia a *E. coli* podría explicar por qué en este caso se puede detectar

la transferencia de pRmOR65 y 69, incluso en ausencia de pRmeGR4a (usando como donador GRM8R, Tabla 4.4). Es posible, lo mismo que sucede para otros plásmidos (Lanka y Wilkins, 1995), que funciones *tra* específicas de pRmeGR4a y pRmeGR4b estén codificadas por genes próximos al origen de transferencia, que podrían estar presentes en pRmOR65 y 69, respectivamente.

**TABLA 4.3. Frecuencias de transferencia de cósmidos *mob* individuales desde los diferentes donadores *recA* de *R. meliloti* a *E. coli* HB101.**

Cosmido	GR4KLR	GRM6LR	GRM10KR	GRM8R
pRmOR69	$4.1 \times 10^{-6}$	$3.3 \times 10^{-4}$	$6.3 \times 10^{-8}$	$3.2 \times 10^{-6}$
pRmOR65	$4.1 \times 10^{-8}$	$1.0 \times 10^{-3}$	$2.9 \times 10^{-7}$	$6.8 \times 10^{-4}$
pRmOR106	$3.1 \times 10^{-7}$	$5.8 \times 10^{-1}$	$2.1 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-1}$
pRmOR1012	$1.0 \times 10^{-7}$	$3.9 \times 10^{-1}$	$5.6 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-1}$
pRmOR1026	$8.3 \times 10^{-8}$	$1.5 \times 10^{-1}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-2}$
pRmOR1030	$3.3 \times 10^{-6}$	$2.1 \times 10^{-1}$	$8.9 \times 10^{-5}$	$9.1 \times 10^{-5}$
pRmOR1033	$8.3 \times 10^{-8}$	$5.6 \times 10^{-2}$	$< 10^{-8}$	$1.4 \times 10^{-1}$
pRmOR1034	$5.4 \times 10^{-7}$	$1.8 \times 10^{-1}$	$1.0 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-1}$
pRmOR1035	$3.3 \times 10^{-7}$	$2.1 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-6}$	$3.7 \times 10^{-2}$
pRmOR1041	$< 10^{-8}$	$3.5 \times 10^{-1}$	$3.3 \times 10^{-5}$	$3.3 \times 10^{-1}$
pRmOR1042	$1.9 \times 10^{-7}$	$8.3 \times 10^{-1}$	$4.5 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-1}$

En tal caso, puede especularse que la movilización desde ambos *ori*Ts puede ser iniciada por proteínas específicas codificadas en el cósmido híbrido, y que el complejo de iniciación pueda ser eficientemente acoplado al aparato de

conjugación codificado por otros plásmidos, tales como los pSyms. Como se muestra en la Tabla 4.4, los cósmidos *mob* cromosomales fueron transferidos a *E. coli* tan eficientemente como aquellos cósmidos *mobs* de localización plasmídica.

El hecho de que los plásmidos *mob* puedan ser movilizados a *E. coli*, una bacteria gram-negativa filogenéticamente distante de la familia *Rhizobiaceae*, muestra que *R. meliloti* puede transferir su ADN a especies bacterianas fuera de la familia *Rhizobiaceae*, lo cual es indicativo de que la promiscuidad de los plásmidos de *Rhizobium* puede ser mucho mas amplia de lo que hasta ahora se conocía.

#### 4.5. Discusión.

El complejo de iniciación para la transferencia conjugativa de plásmidos transmisibles, denominado relaxosoma, es una estructura específica de ADN-proteína que incluye la relaxasa, una proteína que cataliza el corte específico en el sitio *nic* dentro del origen de transferencia, así como proteínas accesorias de unión al ADN (Lanka y Wilkins, 1995). El origen de transferencia (*oriT*, *mob*) de plásmidos conjugativos o movilizables es la única función que se requiere en *cis* para la transferencia de ADN. Se ha diseñado una estrategia simple para identificar regiones de ADN de *R. meliloti* que cumplan con la definición de *oriT*, esto es, que tengan la capacidad de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable (Lanka y Wilkins, 1995). De acuerdo con esto, secuencias de AND capaces de servir como orígenes de transferencia conjugativos deben estar presentes en un banco de genes de cualquier organismo y, por tanto, pueden ser seleccionados por sus características intrínsecas, siempre que se demuestre que el vector donde está construido el banco no se moviliza desde un fondo genético concreto. Este es el caso del vector pLAFR1, que no puede ser movilizado desde *R. meliloti* en ausencia de

funciones *tra* específicas de RK2. Siguiendo esta estrategia, se han identificado 11 regiones de ADN de *R. meliloti* GR4 capaces de convertir pLAFR1 en un vector movilizable y que, por tanto, deben contener orígenes de transferencia o sitios *mob*. El uso de cepas deficientes en recombinación ha facilitado indudablemente la selección, limitando la posibilidad de cointegración por recombinación homóloga entre los cósmidos híbridos y los replicones conjugativos residentes, lo que podría haber dado lugar a la aparición de falsos transconjugantes. De acuerdo con el razonamiento utilizado, 7 de las regiones clonadas se correspondieron con alguno de los 4 plásmidos portados por *R. meliloti* GR4. Estos hallazgos confirman más aún la fiabilidad de la estrategia usada, ya que fue diseñada para seleccionar *oriT*s plasmídicos. Al menos 3 de las regiones *mob* clonadas parecen corresponder al cromosoma, tal y como indican los resultados. Sin embargo, no se ha podido asignar ninguna localización específica en el genoma de GR4 para el ADN clonado en pRmOR1030. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se demuestra físicamente la presencia natural de *oriT*s en un cromosoma bacteriano. Sin embargo, si realmente existen *oriT*s cromosómicos, no es sorprendente que una estrategia como la usada en este trabajo haya sido capaz de seleccionarlos. Es bien sabido que la integración estable de un plásmido conjugativo en el cromosoma da lugar a cepas donadoras con una alta frecuencia de recombinación (las denominadas cepas Hfr, Reimmann y Haas, 1993). Es posible que las cepas de *R. meliloti* usadas en este trabajo sean cepas Hfr naturales conteniendo uno o más episomas. Alternativamente, las regiones *mob* no plasmídicas también podrían corresponder a transposones conjugativos que podrían estar presentes en estas cepas, al igual que han sido encontrados en otras bacterias gram-negativas (Salyers *et al.*, 1995). La posible existencia de elementos conjugativos en los cromosomas de *Rhizobium* podría no ser un fenómeno raro. Sullivan *et al.*, (1995, 1997) han encontrado

transferencia lateral conjugativa de una región simbiótica localizada en el cromosoma de *R. loti* a bacterias residentes en suelo.

Se desconoce si se han identificado todas las posibles regiones *mob* de *R. meliloti* GR4, dado el número limitado de transconjugantes analizados y debido, sobre todo, a los inesperados problemas encontrados con el análisis de restricción de algunos cósmidos. Es posible, por tanto, que aún existan regiones *mob* por identificar dentro del genoma de *R. meliloti*. Por otro lado, dado el tamaño de los cósmidos híbridos seleccionados (una media de 25 kb de inserto), es probable que otros genes relacionados con el proceso de transferencia estén clonados junto con los *ori*Ts, al igual que en otros muchos sistemas donde los *ori*Ts se localizan en posición adyacente a genes implicados en la formación del complejo de transferencia (Lanka y Wilkins, 1995). Esto podría facilitar la posterior caracterización de los varios sistemas conjugativos que cada *ori*T pueda representar.

Se ha identificado una única región *mob* para cada uno de los plásmidos crípticos residentes en *R. meliloti* GR4, pRmeGR4a y pRmeGR4b, clonados en pRmOR69 y pRmOR65 respectivamente. pRmeGR4a es autotransmisible y es capaz de movilizar a pRmeGR4b en *trans*. La eficiente transferencia de los dos plásmidos *mob* hasta cepas de *R. meliloti* requiere la presencia del plásmido pRmeGR4a en la cepa donadora, y es significativo el hecho de que ambos cósmidos se transfieran a frecuencias similares a las de los plásmidos enteros. Estos resultados demuestran que los cósmidos pRmOR69 y 65 tienen clonados los orígenes de transferencia de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b, respectivamente. Más aún, la región movilizadora correspondiente al plásmido pRmeGR4a ha sido delimitada a un fragmento *Bam*HI-*Eco*RI de 2,5 kb. Si bien no se ha podido caracterizar el sitio de corte dentro del *ori*T, parece probable que dentro de este fragmento haya regiones de ADN con funciones relacionadas con la transferencia, a tenor de las homologías encontradas en los bancos de datos.

Se han identificado varios cósmidos movilizables cuyos insertos corresponden a ADN pertenecientes al megaplásmido simbiótico 1, pero sólo uno (pRmOR1035) ha sido localizado en el megaplásmido 2. Es presumible que, por similitud al pSym 1, existan más regiones *mob* en el pSym 2 que no han sido identificadas en este trabajo. La existencia de múltiples regiones movilizables en los pSyms puede estar relacionado con el gran tamaño de estas moléculas, en concordancia también con las evidencias que indican que los megaplásmidos de *R. meliloti* poseen varios orígenes de replicación (Margolin y Long, 1993). Los pSyms de *R. meliloti* pueden representar una cointegración evolutiva de varios plásmidos que han mantenido algunas o todas sus funciones *rep* y *tra*. En comparación con otros trabajos anteriores, que han investigado sobre la autotransferencia de los pSyms (Finan *et al.*, 1986; Pretorius-Guth *et al.*, 1990), en este trabajo se demuestra que la transferencia de plásmidos *mob* individuales puede ser hasta  $10^6$  veces superior que la transferencia del plásmido entero.

Aunque las regiones *mob* identificadas en este trabajo son 30-40 veces mas pequeñas que los pSyms, esto explicaría sólo parcialmente la diferencia en las frecuencias de transferencia. Parece, por tanto, que la transferencia del plásmido completo es ineficiente comparada con las tasas en la iniciación de la transferencia. La presencia de varios *ori*Ts puede representar una desventaja para la transferencia del plásmido entero, ya que la movilización del ADN puede empezar (y terminar) en varios sitios simultáneamente. Esto implica que la transferencia del plásmido completo podría tener lugar como fragmentos separados y que sería necesaria la reconstrucción del plásmido tras su transferencia a la célula receptora. Esta posibilidad tiene precedentes, ya que varios plásmidos tipo R y plásmidos catabólicos forman cointegrados que se disocian o reasocian tras la transferencia (Hardman y Gowland, 1985). Por otro lado, se ha demostrado que la existencia de múltiples *ori*Ts funcionales en el mismo plásmido produce la transferencia preferente de versiones de plásmidos

delecionados, que carecen de la regiones localizadas entre *ori*Ts y que contienen *ori*Ts híbridos (Rao y Meyer, 1994; Gao *et al.*, 1994; Lanka y Wilkins, 1995). Puesto que la terminación de la transferencia en el *ori*T no es 100% efectiva, eventualmente se transfieren copias completas de plásmidos. La presencia de varios *ori*Ts en los pSym de *R. meliloti* podría explicar la gran diferencia en la eficiencia de transferencia del replicón entero (Pretorius-Güth *et al.*, 1990; Finan *et al.*, 1986) y las de las regiones *mob* identificadas en este trabajo, puesto que la existencia de varios *ori*Ts podría conducir a la transferencia preferente de plásmidos delecionados, que no podrían replicarse en los receptores a menos que un origen de replicación y las funciones de estabilización se transfieran conjuntamente. Sin embargo, la existencia de varios orígenes de transferencia podría también estar relacionado con la promiscuidad del plásmido, permitiendo la transferencia a una mayor diversidad de posibles especies receptoras. Por ejemplo la movilización del plásmido podría iniciarse preferentemente desde un *ori*T concreto dependiendo de las condiciones medioambientales y de los receptores disponibles. Esto podría incrementar las posibilidades de dispersión plasmídica. Es razonable que a una bacteria en concreto puedan llegar ADNs de diferentes células donadoras y que, por tanto, el genoma de dicha bacteria esté compuesto de un mosaico génico en donde determinadas regiones de ADN son más parecidas a regiones de otras especies. Recientemente, Freiberg y colaboradores (1997) han mostrado que el plásmido pNGR234a de *Rhizobium* sp. NGR234, que permite a la bacteria asociarse simbióticamente con plantas leguminosas, contiene secuencias mosaico y elementos de inserción que dividen el replicón en grandes bloques de genes relacionados funcionalmente (*ori*V-*ori*T, *nif*, *fix*, etc) y cuyas secuencias se asemejan más a otras bacterias (*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Escherichia*). En relación con esto, también se han descrito los denominados amplicones, que son estructuras genéticas susceptibles de ser amplificadas y que consisten en fragmentos de ADN

flanqueados por repeticiones de ADN directas. Un amplicón de estas características ha sido descrito para *R. etli* (Romero *et al.*, 1995). Estos amplicones poseen una gran cantidad de secuencias repetidas que por recombinación pueden generar grandes reorganizaciones genómicas, provocando fenómenos de cointegración, traslocación, duplicación, delección o amplificación de secuencias específicas. Además, las amplificaciones en tandem podrían conferir beneficios a corto plazo a las poblaciones bacterianas, especialmente bajo condiciones medioambientales que demanden la sobreexpresión de algunos genes (Palacios *et al.*, 1997).

Todos los plásmidos *mob* identificados en este trabajo se movilizaron eficientemente desde *R. meliloti* a *E. coli*. Esta es la primera vez que se demuestra físicamente la transferencia de ADN desde *R. meliloti* a *E. coli* sin la asistencia de funciones *tra* codificadas desde un plásmido heterólogo. Sin embargo, la eficiencia de transferencia depende claramente del contenido en plásmidos de la cepa donadora, lo que refleja la complejas interacciones entre diferentes replicones, que portan fundamentalmente ADN de funciones desconocidas, hospedados en la misma bacteria. En términos de transferencia horizontal, estos resultados muestran que los plásmidos de *R. meliloti*, y probablemente el cromosoma, son capaces de promover transferencia eficiente de ADN a especies donde los replicones no pueden ser establemente mantenidos y que, por tanto, pueden estar sujetos a una transferencia conjugativa "suicida". El resultado de un ADN así transferido a un fondo genético particular puede ser su pérdida, o su incorporación al genoma de la célula receptora, por recombinación homóloga o por otro tipo de mecanismos cointegrativos, por ejemplo mediante secuencias de inserción, abundantes en *R. meliloti* (Mercado-Blanco y Toro, 1996). El resultado es una situación donde la oportunidades de intercambio de ADN son mucho mayores que las observadas previamente.



*CONCLUSIONES*

---

1. La transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4b mediada por pRmeGR4a ocurre por un mecanismo de movilización en *trans* y a frecuencias mucho más elevadas de las descritas previamente.
2. La presencia de amonio en el medio de conjugación interfiere negativamente, y de forma muy específica, con la transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4a, y por tanto de pRmeGR4b, desde la cepa GR4KL hasta la cepa GRM8SR de *Rhizobium meliloti*. Sin embargo, el amonio no ejerce su efecto inhibitorio cuando el receptor es *Agrobacterium tumefaciens* GMI9023.
3. La especie mayoritaria aislada de nódulos de plantas *Phaseolus vulgaris* crecidas en un suelo de Granada es *Rhizobium etli*, una bacteria originaria de Centroamérica. Muy posiblemente, desde su importación a España hace unos 500 años, estas bacterias han transferido parte de su material genético a otras especies de *Rhizobium* presentes en este suelo.
4. No ha sido posible detectar transferencia de los plásmidos no simbióticos de *Rhizobium meliloti* GR4 hasta rizobios nativos de un suelo, aún cuando en el mismo se ha estimado la presencia de al menos  $2.5 \times 10^5$  células de rizobios por gramo de suelo, que podrían actuar como receptores de tales plásmidos.
5. La existencia de múltiples orígenes de transferencia conjugativa tanto en el plásmido simbiótico 1 como en el cromosoma de *Rhizobium meliloti*, indica que el potencial de transferencia conjugativa de estos replicones es mucho mayor de lo establecido hasta el momento.
6. Es la primera vez que se demuestra la transferencia conjugativa de ADN desde *Rhizobium meliloti* hasta bacterias no pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, sin la ayuda de funciones movilizadoras heterólogas.

*BIBLIOGRAFIA*

---

Abaidoo, R.C., George, T. Bohlool, B.B. y Singleton, P.W. 1990. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean. *Can. J. Microbiol.* **36**:92-96.

Albano, M. y Dubnay, D. 1989. Cloning and characterization of a cluster of linked *Bacillus subtilis* late competence mutants. *J. Bacteriol.* **171**:5376-5385.

Ayoubi, P., Kilic, A., y Vijayakumar, M. 1991. Tn5253, the pneumococcal omega (*cat tet*) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252. *J. Bacteriol.* **173**:1617-1622.

Baldani, J.I., Weaver, R.W., Hynes, M.F. y Eardly, B.D. 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2308-2314.

Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Kones, C., Kiss, A., Dusha, I. y Kondorosi, A. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**:318-325.

Barany, F., Kahn, M.E. y Smith, H.O. 1983. Directional transport and integration of donor DNA in *Haemophilus influenzae* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7274-7278.

Barea, J.M. y Azcón-Aguilar, C. 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Adv. Agron.* **36**:1-54.

Barouki, R. y Smith, H.O. 1985. Reexamination of phenotypic defects in *rec-1* y *rec-2* mutants of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **163**: 629-634.

Bauer, W.D. y Caetano-Anollés, G. 1990. Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil.* **129**:45-52.

Bedzyk, L.A., Shoemaker, N.B., Young, K.E. y Salyers, A.A. 1992. Insertion and excision of *Bacteroides* conjugative chromosomal elements. *J. Bacteriol.* **174**:166-172.

Boivin, C., Malpica, C., Rosenberg, C., Goldman, A., Flevry, V., Maille, M., Message, B., Pamboukdjian, N. y Tepfer, D. 1990. Catabolism of the plant secondary metabolites calystegins and trigonelline by *Rhizobium meliloti*. *Symbiosis* **9**:147-154.

Boulanger, P. y Letellier, L. 1988. Characterization of ion channels involved in the penetration of phage T4 DNA into *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **263**:9767-9775.

Boyer, H.W. y Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-465.

Bradley, D.E. y Whelan, J. 1989. *E. coli tolQ* mutants are resistant to filamentous bacteriophage that adsorb to the tips, not to the shafts, on conjugative pili. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1857-1863.

Brom, S., García de los Santos, A., Girard, M.L., Dávila, G., Palacios, R. y Romero, D. 1991. High frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.* **173**:1344-1346.

Bukhardt, B., Schilik, D. y Pühler, A. 1987. Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. *Plasmid* 17:13-25.

Burdette, V. 1991. Purification and characterization of Tet (M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. *J. Biol. Chem.* 226:2872-2877.

Caparon, M.G. y Scott, R. 1989. Excision and insertion of the conjugative transposon Tn916 involves a novel recombination mechanisms. *Cell* 59:1027-1034.

Cassé, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M. y Dénarié, J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gels electrophoresis. *J. Bacteriol.* 113:229-242.

Cebolla, A., Ruiz-Berraquero, F. y Palomares, A.J. 1993. Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2511-2519.

Charles, T.C. y Finan T.M. 1991. Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated *in vivo*. *Genetics.* 127:8-15.

Clewell, D.B., Yagi, Y., Dunny, G.M. y Schultz, S.K. 1974. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.* 117:283-289.

Clewell, D.B. 1981. Plasmids, drug resistance and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.* 45:409-436.

Clewell, D.B. y Gawron-Burke, C. 1986. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:635-659.

Clewell, D.B., An, F.Y., Mori, M. Ike, Y. y Suzuki, A. 1987. *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cADi) response: evidence that the peptide inhibitor excreted by pAD1-containing cells may be plasmid determined. *Plasmid* 17:65-68.

Clewell, D.B., Flannagan, S.E., Ike, Y., Jones, J.M. y Gawron-Burke, C. 1988. Sequence analysis of termini of conjugative transposon Tn916. *J. Bacteriol.* 170:3046-3052.

Clewell, D.B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:90-102.

Clewell, D.B., Pontius, L.T., Weaver, K.E., An, F.Y., Suzuki, Y. y Nakayama, J. 1991. *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin plasmid pAD1: regulation of the pheromone response in: Genetics and Molecular Biology of *Streptococci*, *Lactococci*, and *Enterococci* (G. Dunny, P. Cleary y L. Mackay, eds). ASM Washington, DC pp3-8.

Clewell, D.B. 1993. Sex pheromones and the plasmid-encode mating response on *Enterococcus faecalis*. En: D.B. Clewell (ed): Bacterial conjugation. pp. 349-367. Plenum Press, New York.

Coyne, J.A. 1992. Genetics and speciation. *Nature* (Londres) 355:511-515.

Crabb, W. D., Streips, U.N. y Doyle, R.J. 1977. Selective enrichment for genetic markers in DNA released by competent cultures of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 155:179-183.

Danner, D.B., Deich, R.A., Sisco, K.L. y Smith, H.O. 1980. An 11-base pair sequence determines the specificity of DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Gene*: 311-318.

Dash, P.K., Traxler, B.A., Panicker, M.N., Hackney, D.D. y Minkley, E.G. 1992. Biochemical characterization of *Escherichia coli* DNA helicase I. *Mol. Microbiol.* 6:1163-1172.

DeFlaun, M.F. y Levy, S.B. 1989. Genes and their varied hosts. pp 1-32. En S.B. Levy y R.V. Miller (eds.), Gene transfer in the environment. McGraw-Hill Co., New York.

DeJong, T.M., Brewin, N.J. y Phillips, D.A. 1981. Effects of plasmid content in *Rhizobium leguminosarum* on pea nodule activity and plant growth. *J. Gen. Microbiol.* 124:1-7.

Dénarié, J., Debelle, F. y Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Anu. Rev. Microbiol.* 46: 497-531.

Dorward, D.W. y Garon, C.F. 1990. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but no gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1960-1962.

Dreiseikermann, B. 1994. Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev.* 58(3):293-316.

Dubnau, D. 1991. Genetic competence on *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55:395-424.

Dubnau, D. 1991. The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5:11-18.

Dunny, G.M., Craig, R.A., Carron, R.L. y Clewell, D.B. 1979. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid* 2:454-465.

Dunny, G.M., Zimmerman, D.L. y Tortorello, M.L. 1985. Induction of surface exclusion (entry exclusion) by *Streptococcus faecalis* sex pheromone: use of monoclonal antibodies to identify an inducible surface antigen involved in the exclusion process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8582-8586.

Dupuy, B., Taha, M.K., Possot, O, Marchal, C. y Pugsley, A.P. 1992. PulO, a component of the pullulanase secretin pathway of *Klebsiella oxytoca*, correctly and efficiently processes gonococcal type IV prepilin in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 6:1887-1894.

Dürrenberger, M.B., Villiger, W. y Bächli, T. 1991. Conjugational junctions: morphology and specific contacts in conjugating *Escherichia coli* bacteria. *J. Struct. Biol.* 107:146-156.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.

Ehrenfeld, E.E., Kessler, R.E. y Clewell, D.B. 1986. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a

role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J. Bacteriol.* **168**:6-12.

Feucht, A., Schmid, A., Benz, R. Schwarz, H. y Heller, H.J. 1990. Pore formation associated with the tail-tip protein pb2 of bacteriophage T5 *J. Biol. Chem.* **265**:18561-18567.

Figurski, D.H. y Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:1648-1652.

Finan, T.M., Kunkel, B., de Vos, G.F. y Singer, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolisaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**:66-72.

Flannagan, S.E. y Clewell, D.B. 1991. Conjugative transfer of Tn916 in *Enterococcus faecalis*: *trans*-activation of homologous transposons. *J. Bacteriol.* **173**:7136-7141.

Flannagan, S.E., Zitzow, L.A., Su, Y.A. y Clewell, D.B. 1994. Nucleotide sequence of the 18 kbp conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis* *Plasmid* **32**:350-354.

Forbes, B.A. y Schaberg, D.R. 1983. Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *S. aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *J. Bacteriol.* **153**:627-634.

Franke, A.E. y Clewell, D.B. 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of

“conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J. Bacteriol.* 145:494-502.

Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J. y Ausubel, F.M. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium meliloti* mutants. *Gene* 18:289-296.

Frost, L.S., Ippem-Ihler, K. y Skurray, R.A. 1994. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* 58:162-210.

Fürste, J.P., Pansegrau, W., Ziegelin, G. Kröger, M. y Lanka, E. 1989. Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: Interaction of plasmid-encode products with the transfer origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1771-1775.

Furukawa, H., Kuroiwa, T. y Mizushima, S. 1983. DNA injection during bacteriophage T4 infection of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 154:983:945.

Gajendiran, N. y Mahadevan, A. 1990. Plasmid-borne catechol dosimilation in *Rhizobium* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73:125-130.

Galli, D. Lottspeich, F. y Wirth, R. 1990. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Molec. Microbiol.* 4:895-904.

Gawron-Burke, C. y Clewell, D.B. 1982. A transposon in *Streptococcus faecalis* with fertility properties. *Nature (Londres)* 300:281-284.

Gilbert, W. y Dressler, D. 1968. DNA replication: the rolling circle model, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**:473-484.

Gray, J.X., de Maagad, R.A., Rolfe, B.G., Johnston, A.W.B. y Lugtenberg, B.J.J. 1992. The role of the *Rhizobium* cell surface during symbiosis. In: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. pp359-376. Verma, D.P.S. (ed), CRC Press, Londres.

Griffiths, A.J.F. 1995. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiol. Rev.* **59**:673-685.

Hahn, J., Albano, M. y Dubnau, D. 1987. Isolation and characterization of Tn917 lac-generated competence mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**:3104-3109.

Halula, M. y Macrina, F.L. 1990. Tn5030: a conjugative transposon conferring clindamycin resistance on *Bacteroides* species. *Rev. Infect. Dis.* **12**(Suppl.):S235-S242.

Hashem, F.M. y Angle, J.S. 1990. Rhizobio-phage effects on nodulation, nitrogen fixation and yield of field-grown soybeans (*Glycine max* L. Merr). *Biol. Fertil. Soils.* **9**:330-334.

Hassani, M., Pincus, D.H., Bennett, G.N. y Hirshfield, I.N. 1992. Temperature-dependent induction of an acid-inducible stimulon of *Escherichia coli* in broth. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2704-2707.

Heinemann, J.A. 1991. Genetics of gene transfer between species. *Trends Genet.* **7**:181-185.

Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. 1990. Transposons vector containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.

Hirsch, P.R. 1979. Plasmid determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **113**:219-228.

Hirsch, P.R., van Montagu, M., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J. y Schell, J. 1980. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation, and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:403-412.

Hirsch, P.R. y Spokes, J.D. 1994. Survival and dispersion of genetically modified rhizobia in the field and genetic interactions with the native strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**:147-160.

Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villiger, W. y Kellenberger, E. 1984. Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell wall ultrastructure by new methods. *J. Bacteriol.* **160**:3539-3541.

Hodgson, A.L.M., Roberts, W.P. y Waid, J.S. 1985. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii* *Soil Biol. Biochem.* **17**:475-478.

Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K. y Tiedje, J.M. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacteria community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:703-711.

Horand, T. Bouguenec, C.L. y Pepper, K. 1985. Molecular genetics of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS) in *Streptococci*. *J. Antimicrob. Chemother.* **16** (suppl. A):111-135.

Horowitz, B. y Deonier, R.C. 1985. Formation of  $\Delta$  tra F' plasmids: specific recombination at *oriT*. *J. Mol. Biol.* **108**:267-274.

Hynes, M.F. and McGregor, N.F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmids are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**:576-574.

Ike, Y. y Clewell, D.B. 1984. Genetic analysis of the pAD1 pheromone response in *Streptococcus faecalis*, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. *J. Bacteriol.* **158**:777-783.

Ippen-Ihler, K. y Skurray, R.A. 1993. Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids. En: D.B. Clewell (ed): Bacterial conjugation. pp. 23-52. Plenum Press, New York.

Ippen-Ihler, K. 1989. Bacterial conjugation, pp33-72. En S.B. Levy y R.V. Miller (eds.), Gene transfer in the environment. McGraw-Hill Co., New York.

Jiménez-Zurdo, J.I., van Dillewijn, P., Soto, M.J., de Felipe, M.R., Olivares, J. y Toro, N. 1995. Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:492-498.

Joseph, M.V., Desai, J.D. y Desai, A.J. 1983. Possible involvement of phage-like structures in antagonism of cowpea rhizobia by *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:459-461.

**Keya, S.O. y Alexander, M.** 1975. Regulation of parasitism by host density: the *Bdellovibrio-Rhizobium* interrelationship. *Soil Biol. Biochem.* **7**:231-237.

**Khanna, M. y Stotzky, G.** 1992. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1930-1939.

**Kilbane, J.J. y Malamy, M.H.** 1980. F factor mobilization of non-conjugative chimeric plasmids on *Escherichia coli*: General mechanisms and a role for site-specific *recA*-independent recombination at *oriV1*. *Mol. Biol.* **143**:73-93.

**Kilic, A.O., Vijayakumar, M.N. y Al-khaldi, S.F.** 1994. Identification and nucleotide sequence analysis of a transfer-related region in the streptococcal conjugative transposon Tn5252. *J. Bacteriol.* **176**:5145-5150.

**Kucey, R.M.N. y Hynes, M.F.** 1989. Populations of *Rhizobium leguminosarum* biovars *phaseoli* and *viciae* in fields after bean or pea in rotation with nonlegumes. *Can. J. Microbiol.* **35**:661-667.

**Lacks, S.A., Mannarelli, B.M., Springhorn, S.S. y Greenberg, B.** 1986. Genetic basis of the complementary *DpnI* and *DpnII* restriction system of *S. pneumoniae*: an intracellular cassette mechanism. *Cell* **46**:993-1000.

**Laguerre, G., Geniaux, E. Mazurier, S.I., Casartelli, R.R. y Amarger, N.** 1993. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* **39**:412-419.

Lamb, J.W., Hombrecher, G. y Johnston, A.W.B. 1982. Plasmid determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* 186:449-452.

Lanka, E. y Wilkins, B.M. 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* 64:141-169.

LeBouguenec, C., de Cespedes, C. y Horaud, T. 1990. Presence of chromosomal elements resembling the composite structure of Tn3701 in streptococci. *J. Bacteriol.* 172:727-734.

Lederberg, J. y Tatum, E.L. 1946. Gene recombination in *E. coli*. *Nature* (Londres) 158:558.

Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119: 1 072-1074.

Leigh, J.A. y Coplin, D.L. 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:307-346.

Levengood-Freyermuth, S.K., Click, E.M. y Webster, R.E. 1993. Role of carboxyl-terminal domain of TolA in protein import and integrity of the outer membrane. *J.Bacteriol.* 175:222-228.

Leyva, A., Palacios, J.M. y Ruiz-Argüeso, T. 1987. Conserved plasmid hydrogen-uptake (*hup*)-specific sequences within *Hup*<sup>+</sup> *Rhizobium leguminosarum* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2539-2543.

**Li, D.M. y Alexander, M.** 1986. Bacterial growth rates and competition affect nodulation and root colonization by *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:807-811.

**Li, M., Stern, B. y Kamp, D.** 1992. Ultrafast plasmid DNA preparation for rapid transformation. *Biotechniques* **13**:692-693.

**Long, S.R.** 1992. Genetic analysis of *Rhizobium* nodulation. In: Biological Nitrogen Fixation. pp. 561-597. Stacey, G., Brewin, R.H. y Evans, H.J. (eds), Chapman and Hall, New York.

**Lorenz, M.G., Gerjets, D. y Wackernagel, W.** 1991. Release of transforming plasmid on chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Arch. Microbiol.* **156**:319-326.

**Lorenz, M.G., Wackernagel, W.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Reviews* **58** (3): 563-602.

**Mahmoud, A.L. y Abd-Alla, M.H.** 1994. Natural occurrence of mycotoxins in broad bean (*Vicia faba* L.) seeds and their effect on *Rhizobium*-legume symbiosis. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1081-1085.

**Maneewannakul, S., Kathir, P. y Ippen-Ihler, K.** 1992. Characterization of the F plasmid mating aggregation gene *traN* and of a new F transfer region locus *trbE*. *J. Mol. Biol.* **225**:299-311.

**Manoil, C. y Rosenbusch, J.P.** 1982. Conjugation-deficient mutants of *Escherichia coli* distinguish classes of functions of the outer membrane protein. *Mol. Gen. Genet.* **187**:148-156.

- Masters, M. 1996. Generalized transduction. En: F.C. Neidhardt (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. 2nd edition. pp. 2421-2441. ASM Press, Washington, D.C.
- Matin, A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:3-10.
- Matson, S.W., Nelson, W.C. y Morton, B.S. 1993. Characterization of the reaction product of the *oriT* nicking reaction catalyzed by *Escherichia coli* helicase I. *J. Bacteriol* 175:2599-2606.
- Maynard, J., Dowson, C.G. y Spratt, B.G. 1991. Localized sex in bacteria. *Nature* (Londres) 349:29-31.
- Mazodier, P. y Davies, J. 1991. Gene transfer between distantly related bacteria. *Anu. Rev. Genet.* 25:147-171.
- McDonnell, R.W., Sweeny, H.M. y Cohen, S. 1983. Conjugational transfer of gentamycin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:151-160.
- Meinhardt, F. y Rohe, M. 1993. Extranuclear inheritance: Linear protein-primed replicating genomes in plants and microorganisms. *Prog. Bot.* 54:334-357.
- Meinhardt, F., Schaffrath, R. y Larsen, M. 1997. Microbial linear plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:329-336.
- Mejean, V. y Claverys, J.P. 1988. Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 213:444-448.

**Mercado-Blanco, J., García, F., Fernández-López, M. y Olivares, J. 1993a.** Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: Cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. *J. Bacteriol.* **175**:5403-5410.

**Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. 1993b.** Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. *Arch. Microbiol.* **160**:477-485.

**Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. 1994a.** A protein involved in stabilization of a large non-symbiotic plasmid of *Rhizobium meliloti* shows homology to eukariotic cytoskeletal proteins and DNA-binding proteins. *Gene* **139**:133-134.

**Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. 1994b.** The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* **32**:75-79

**Mercado-Blanco, J. y Toro, N. 1996.** Plasmids in rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:535-545.

**Meyer, T.F., Gibbs, C.P. y Haas, R. 1990.** Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**:451-477.

**Michod, R.E., Wojciechowshi, M.F. y Hoelzer, M.A. 1988.** DNA repair and the evolution of transformation in the bacterium *Bacillus subtilis*. *Genetics* **118**:31-39.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS, New York.

Mori, M., Isogai, A., Sakagami, Y., Fujino, M., Kitada, C., Clewell, D.B. y Suzuki, A. 1986a. Isolation and structure of *Streptococcus faecalis* sex pheromone inhibitor, iAD1, that is excreted by donor strains harboring plasmid pAD1. *Agric. Biol. Chem.* **50**:539-541.

Mori, M., Tanaka, H., Sakagami, Y., Isogai, A., Fujino, M., Kitada, C., White, B.A., An, F.Y., Clewell, D.B. y Suzuki, A. 1986b. Isolation and structure of the *Streptococcus faecalis* sex pheromone, cAM373. *FEBS Lett.* **206**:69-72.

Mori, M., Sakagami, Y., Ishii, Y., Isogai, A., Kitada, C., Fujino, M., Adsit, J.C. Dunny, G.M. y Suzuki, A. 1988. Structure of cCF10, a peptide sex pheromone which induces conjugative transfer of the *Streptococcus faecalis* tetracycline-resistance plasmid pCF10. *J. Biol. Chem.* **263**:14574-14578.

Mori, M., Sakagami, Y., Narita, M., Isogai, A., Fujino, M., Kitada, C., Craig, R., Clewell, D.B. y Suzuki, A. 1984. Isolation and structure of the bacterial sex pheromone, cAD1, that induces plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*. *FEBS Lett.* **178**:97-100.

Mori, M., Tanaka, H., Sakagami, Y., Isogai, A., Fujino, M., Kitada, C., Clewell, D.B. y Suzuki, A. 1987. Isolation and structure sex pheromone inhibitor, iPD1, excreted by of *Streptococcus faecalis* donor strains harbouring plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* **169**:1747-1749.

Morris, R.O. 1986. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phyto pathogens. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **37**:509-538.

**Morrison, D.A.** 1977. Transformation in *Pneumococcus*: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. *J. Bacteriol.* **132**:576-583.

**Morrison, D.A. y Baker, M.F.** 1979. Competence for genetic transformation in *Pneumococcus* depends on synthesis of a small set of proteins. *Nature* (Londres) **282**:215-217.

**Murphy, P.J. y Saint, C.P.** 1992. Rhizopines in the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. pp. 377-390. Verma, D.P.S. (ed). CRC Press, Londres.

**Murphy, P.J., Heycke, N., Trenz, S.P. Ratet, P., de Bruijn, F.J. y Schell, J.** 1988. Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9133-9137.

**Mylona, P., Pawlowski, K. y Bisseling, T.** 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**:869-885.

**Norgren, M.G. y Scott, J.R.** 1991. Presence of the conjugative transposon Tn916 in the recipient strain does not impede transfer of a second copy of the element. *J. Bacteriol.* **173**:319-324.

**Olivares, J., Casadesus, J. y Bedmar, E.J.** 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:967-970.

**Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., Helinski, D.R., Schwab, H., Stanisich, V.A., y Thomas, C.M.** 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP $\alpha$  plasmid. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.

Phillips, D.A. 1992. Flavonoids: plant signals to soil microbes. In: Phenolic Metabolism in Plants. pp. 201-321. Stafford, H.A. y Ibrahim, R.K. (eds). Plenum Press, New York.

Piechowska, M. y Fox, M.S. 1971. Fate of transforming deoxyribonucleate in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 108:680-689.

Pontius, L.T. y Clewell, D.B. 1992. Conjugative transfer of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1: nucleotide sequence and transcriptional fusion analysis of a region involved in positive regulation. *J. Bacteriol.* 174:3152-3160.

Porteus, L.A. y Armstrong, J.L. 1993. A simple minimethod to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification. *Curr. Microbiol.* 27:115-118.

Prentki, P. y Krisch, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 101-106

Priebe, S.D. y Lacks, S.A. 1989. Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* 171:4778-4784.

Ramos, M.G.L. y Ribeiro, W.Q. Jr. 1993. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152:145-152.

Rastogi, V.K., Bromfield, E.S.P., Whitwill, S.T. y Barran, L.R. 1991. A cryptic plasmid of indigenous *Rhizobium meliloti* possesses reiterated *nodC* and *nifE* genes and undergoes DNA rearrangement. *Can. J. Microbiol.* 38:563-568.

**Rauch, P.J. y De Vos, W.M.** 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 174:1280-1287.

**Reimmann, C. y Haas, D.** 1993. Mobilization of chromosomes and nonconjugative plasmids by cointegrative mechanisms. En: D.B. Clewell (ed): Bacterial conjugation. pp:137-173. Plenum Press, New York.

**Reush, R.N., Hiske, T.W. y Sadoff, H.L.** 1986. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 168:553-562.

**Robertson, B.K., Aiman, P., Darvill, A.G., Mcneil, M. y Albersheim, P.** 1981. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67:389-400.

**Romanowski, G., Lorenz, M.G., Sayler, G. y Wackernagel, W.** 1992. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation-assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3012-3019.

**Rosenberg, C. y Huguet, T.** 1984. The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol. Gen. Genet.* 196:533-536.

**Rosenthal, A.L. y Lacks, S.A.** 1980. Complex structure of the membrane nuclease of *Streptococcus pneumoniae* revealed by two-dimensional electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 141:133-146.

**Sakaguchi, K.** 1990. Invertrons, a class of structurally and functionally related genetics elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses. *Microbiol. Rev.* **54**:66-74.

**Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. y Li, L.Y.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* **59**:579-590.

**Sambrook, J. Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanjuan, J. y Olivares, J.** 1989. Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. *J. Bacteriol.* **171**:4154-4161.

**Sanjuan, J. y Olivares, J.** 1991. NifA-NtrA regulatory system activates transcription of *nfe*, a gene locus involved in nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* **155**:543-548.

**Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. y Watson, J.M.** 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2942-2947.

**Scott, J.R. y Churchward, G.G.** 1995. Conjugative transposons. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:367-397.

Selbitschka, W., Pühler, A. y Simon, R. 1992. The construction of *recA*-deficient *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* strains marked with *gusA* or *luc* cassettes for use in risk assessment studies. *Mol. Ecol.* 1, 9-19.

Selbitschka, W., Dresing, U., Hagen, M., Niemann, S. y Pühler, A. 1995. A biological containment system for *Rhizobium meliloti* based on the use of recombination-deficient (*recA*) strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16:223-232.

Short, J.M., Fernández, J.M., Sorge, J.A. y Huse, W.D. 1988. 1 ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16:7583-7600.

Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-791.

Skurray, R.A., Hancock, R.E.W. y Reeves, P. 1974. Con- mutants: class of mutants in *Escherichia coli* K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage. *J. Bacteriol.* 119:726-735.

Sobral, B.W.S., Honeycutt, R.J., Arthley, A.G. y McClelland, M. 1991. Electrophoretic separation of the three *Rhizobium meliloti* replicons. *J. Bacteriol.* 173:5173-5180.

Soto, M.J., Zorzano, A., Olivares, J. y Toro, N. 1992a. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* GR4 insertion sequence *ISRm3* linked to the nodulation competitiveness locus *nfe*. *Plant. Mol. Biol.* 20:307-309.

Soto, M.J., Zorzano, A., Olivares, J. y Toro, N. 1992b. Sequence of ISR<sub>m4</sub> from *Rhizobium meliloti* strain GR4. *Gene* **120**:125-126.

Soto, M.J., Zorzano, A., Mercado-Blanco, J. Lepek, V., Olivares, J. y Toro, N. 1993. Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nfe*. *J. Mol. Biol.* **229**:570-576.

Soto, M.J., Zorzano, A., García-Rodríguez, F., Mercado-Blanco, J., López-Lara, I.M., Olivares, J. y Toro, N. 1994. Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency *nfe* gene homolog of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:703-707.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **170**: 1721-1729.

Stewart, G.J. y Carlson, C.A. 1986. The biology of natural transformation. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:211-235.

Su, Y.A., He, P. y Clewell, D.B. 1992. Characterization of the *tet(M)* determinat of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:769-778.

Sugawara, E. y Nikaido, H. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:2507-2511.

Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B. y Ronson, C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8985-8989.

Svarachorn, A., Shinmyo, A. Tsuchido, T. y Takano, M. 1989. Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by monovalent cations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:299-304.

Swartley, J.S., McAllister, C.F., Hajjeh, R.A., Heinrich, D.W. y Stephens, D.S. 1993. Deletions of Tn916-like transposons are implicated in *tetM*-mediated resistance in pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* 10:299-310.

Tepfer, D., Goldman, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Dénarié, J. y Rosenberg, C. 1988. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *J. Bacteriol.* 170:1153-1161.

Thurman, N.P., Lewis, D.M. y Jones, D.G. 1985. The relationship of plasmid number to growth, acid tolerance, and symbiotic efficiency in isolates of *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bacteriol.* 58:1-6.

Tomich, P.K., An, F.Y. y Clewell, D.B. 1980. Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 141:1366-1374.

Toro, N. y Olivares, J. 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* 202:331-335.

Trieu-Cuot, O., Carlier, C. y Courvalin, P. 1988. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:4388-4391.

Van den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Van Montagu, M. y Holsters, M. 1987. Identification and cloning of nodulation genes from the stem-nodulating bacterium ORS571. *Mol. Gen. Genet.* **206**:291-299.

Van der Lelie, D. Wösten, H.A.B., Bron, S., Oskam, L. y Venema, G. 1990. Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* **172**:47-52.

van Rensburg, H.J. y Strijdom, B.W. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:127-131.

van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.

Vicent, J.H. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria (IBP handbook 15). Blackwell Scientific publications, Oxford.

Vidor, C. y Miller, R.H. 1980. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (FA). *Soil Biol. Biochem.* **12**:483-487.

Vijayakumar, M.N. y Morrison, D.A. 1986. Localization of competence-induced proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **165**:689-695.

Villadas, P.J., Velázquez, E., Martínez-Molina, E. y Toro, N. 1995. Identification of nodule dominant *Rhizobium meliloti* strains carrying pRmeGR4b type plasmid within indigenous soil populations by PCR using primers derived from specific DNA sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**:161-168.

Vlassak, K.M., Vanderleyden, J. y Franco, A. 1996. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biol. Fertil. Soils* 21:61-68.

Vlassak, K.M. y Vanderleyden, J. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant *Rhizobia*. *Crit. Rev. in Plant Sci.* 16:163-229.

Vosman, B., Kuiken, G., Kooistra, J. y Venema, G. 1988. Transformation in *Bacillus subtilis*: involvement of the 17-kilodalton DNA-entry nuclease and the competence-specific 18-kilodalton protein. *J.Bacteriol.* 170:3703-3710.

Wanner, G. Furmanek, H., Galli, D. y Wirth, R. 1989. Localization of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* after induction by sex pheromones. An ultrastructural comparison using immunolabeling, transmission and high resolution scanning electron microscopic techniques. *Arch. Microbiol.* 151:491-497.

Warren, G.J. y Clark, A.J. 1980. Sequence-specific recombination of plasmid ColeI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6724-6728.

Weaver, K.E. y Clewell, D.B. 1990. Regulation of the pAD1 sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: effects of host strain and *traA*, *traB* and *traC* region mutants on expression of an E region pheromone-inducible *lacZ* fusion. *J. Bacteriol.* 172:2633-2641.

Weisberg, R.A. 1996. Specialized transduction. En: F.C. Neidhardt (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. 2nd edition. pp. 2442-2448. ASM Press, Washington, D.C.

Wheatcroft, R., McRae, D.G. y Miller, R.W. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**:9-17

Wheatcroft, R. y Laberge, S. 1991. Identification and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* sequence IS*Rm*3: similarity between the putative transposase encode by IS*Rm*3 and those encoded by *Staphylococcus aureus* IS256 and *Thiobacillus ferrooxidans* IST2. *J. Bacteriol.* **173**:2530-2538.

Willetts, N. 1993. Bacterial conjugation: a historicak perspective, pp. 1-22. In D.B. Clewell (ed), Bacterial conjugation. Plenun Press, New York.

Yanisch-Perron, C. Vieira, J. y Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Young, J.P.W. 1985. *Rhizobium* populations genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans, and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol.* **131**:2399-2408.

Zekri, S. y Toro, N. 1996. Identification and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* sequence IS*Rm*6, a small transposable element that belongs to the IS3 family. *Gene* **175**:43-48.

Zoon, K.C. y Scocca, J.J. 1975. Constitution of the cell envelope of *Haemophilus influenzae* in relation to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* **123**:666-677.



Biblioteca Universitaria de Granada



01052662