

01019

Tesis Doctoral
Año 2001



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

**Identificación y caracterización molecular de
plásmidos transmisibles por conjugación en
aislamientos locales de *Sinorhizobium meliloti***

Mariano Pistorio

TESIS
Nº 1019



(043.2)
TESIS
01019

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/9 Int. 129



DEX-57095

09-10-03

67095



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS
Nº 1019

DONACION.....
A.....
Fecha 09-10-03.....
Inv. &..... Inv..... B.57095.

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Antonio Lagares y la codirección del Profesor Dr. Orlando Mario Aguilar.

A Viviana por darme su amor

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. Antonio Lagares, por dirigir mi trabajo y mi formación académica, por su estímulo y principalmente, por brindarme su apoyo, confianza y amistad.

Al Prof. Dr. Orlando M. Aguilar, por aceptar codirigir esta tesis.

A la Dra. Daniela F. Hozbor, por su estímulo, amistad, su apoyo intelectual y emocional en todos los momentos en que lo necesité.

A los profesores Gabriel Favelukes, Oscar Grau, y Victor Romanowski, por sus consejos.

A Laura J. Balagué por su amistad, su buen humor, sus reflexiones filosóficas, y por la realización de la acuarela de la tapa de esta Tesis.

A Maria Florencia Del Papa por su amistad, su constante buena disposición y en especial por las riquísimas tortas.

A Augusto J.L. Pich Otero por su amistad, su incondicional apoyo, y por enseñarme a abrir el desecador.

A Julieta Fernández y a Federico Sisti por su amistad, apoyo y por hacer divertidas las horas en el laboratorio.

A Aníbal Lodeiro, Silvina López García, y Tirso Vazquez, por su buena disposición, apoyo y compañerismo.

A Flavia Luna, Sebastian Cavalito, Alejandro Nocetti, Rubén Oltolina, Eugenia Rodriguez, por su compañerismo y amistad.

A Silvia Locatelli por su colaboración en la obtención de las cepas marcadas en el Capítulo V.

A Edgardo Donati y Gustavo Curutchet por permitirme realizar mis primeros pasos en la docencia e investigación y por su amistad.

A Patricia Schilardi, Tati Prieto, Cristina Pogliani y Horacio Thomas por su amistad y por hacerme divertidas las mañanas en la Cátedra

A mi familia, por su constante apoyo, cariño y aguante, mucho aguante.

A mis compañeros del IBBM: Pablo Riccilo, Juan Carlos López, Mario Lozano, Eugenia Wynne, Wendell, Verónica López, Cecilia Muglia, Katy López, Mónica Collavino, Germán Robles, Pedro David Gara, Daniel Grasso, Vanina Perez, Omar Riva, Gonzalo Legarreta, Daniel Ghiringuelli, Cesar Albariño, Selma Gago Zachert, María Laura García, Verónica El Mujtar, Diego Posik, Alejandra Manzán, Silvia Moya, Alejandra Tortoricci, Eloisa Arana, Cristina Mc Arthy, Ramiro Mendez, Cecilia Zaneck,.

A Carlitos Illiano y Rubén Bustos, por su apoyo técnico.

A “el Atleta”, Ozzy, Elanibal, Chuchula, Floppy, el Topy, Tato, el Galo, Mary July, Cachito, Isa, Tincho, Arturo, el tubarao, el Lava, Ortensio, el Bigbabousa, Tino y Gargamuza, July, el Chueco, Pity, Buenastardes, Artur, Guacamole, Loosen, al Indio, Bodo y Karen por soportarme a lo largo de todos estos años, con todos los humores y con todos mis estados de ánimo.

Al *Enterprise* por aislarme de la realidad.

A las reuniones místicas de SAAIBBM por lo bueno que fue mientras duró.

A Chucho y Checho por ser como son.

Y en especial a todos aquellos que en este momento me estoy olvidando.....que deben ser muchos

Tapa: “Evolución ” por Laura J. Balagué. Acuarela, 35x50 cm 2001. Laura J. Balagué es estudiante de Doctorado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Uuniversidad Nacional de La Plata.

Índice.

CAPÍTULO I	
Introducción	
1-	Elementos genéticos móviles como generadores de diversidad y adaptabilidad bacteriana 2
1-	Caracteres más comunes introducidos por transferencia horizontal horizontal de genes 3
2-	Mecanismos de transferencia genética en bacterias 5
1-	Transformación 5
2-	Transducción 7
3-	Conjugación 8
3-	Sistemas de transferencia conjugativa 11
1-	Características generales del origen de transferencia 12
2-	Organización de las regiones de transferencia de distintos grupos de incompatibilidad 13
1-	Plásmidos autotransmisibles (conjugativos) 13
	Funciones de transferencia en plásmidos tipo-F 13
	Funciones de transferencia en los plásmidos IncP 13
	Funciones de transferencia de plásmidos IncN 15
	Funciones de transferencia en los plásmidos IncW 16
	Funciones de transferencia en los plásmidos Ti 17
2-	Plásmidos movilizables 18
	Funciones de movilización en los plásmidos IncQ 18
3-	Transposones conjugativos 19
4-	Características generales y de transferencia de plásmidos de rizobios 20
1-	Aislamiento de los plásmidos 21
2-	Los plásmidos simbióticos 21
3-	Plásmidos no simbióticos 23
4-	Replicación y estabilidad de plásmidos de rizobios. Rango de hospedadores 25
5-	Transmisibilidad de los plasmidos de rizobios y su estudio 27
OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS 29	
CAPÍTULO II	
Materiales y Métodos	
1-	Cepas bacterianas y plásmidos 31
2-	Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos 34
3-	Antibióticos 35
4-	Procedimientos microbiológicos 36
1-	Obtención de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos. 36
2-	Métodos de conjugación 36
1-	Conjugaciones biparentales 36
2-	Conjugaciones triparentales 36
3-	Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de <i>E. coli</i> 37
5-	Técnicas de biología molecular 37

1-	Geles de lisis <i>in situ</i>	37
2-	Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	38
1-	Amplificaciones de secuencias específicas	39
2-	Generación de "huellas digitales" de ADN total por PCR	39
3-	Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreps")	39
4-	Extracción de ADN total	40
5-	Preparación de lisados celulares	40
6-	Determinación de la concentración de ADN y oligonucleótidos	40
7-	Tratamientos enzimáticos del ADN	41
8-	Electroforesis de ADN	41
1-	Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa	41
2-	Revelado de geles y fotografía	41
3-	Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa	41
9-	Ensayos de hibridación (<i>Southern blot</i>)	42
10-	Construcción de sondas marcadas con digoxigenina (DIG) por PCR	42
11-	Clonado de regiones de ADN rizobiano flanqueante al transposón Tn5	42
12-	Subclonado de los fragmentos de ADN rizobiano flanqueante al transposón Tn5B13	43
13-	Clonado de la secuencia codificante del gen <i>rpt1</i> de la cepa LPU88	43
14-	Clonado de un fragmento interno del gen <i>rpt1</i> de la cepa LPU88	44
15-	Mutagénesis en sitios específicos	44
16-	Secuenciación de ADN	45
6-	Evaluación de Diversidad.	45
7-	Ensayos con plantas	45
1-	Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación. Alfalfa	45
2-	Condiciones de cultivo	45
3-	Cultivo axénico de plantas	46
4-	Medida de la competitividad para la nodulación	46
5-	Reaislamiento de rizobios de los nódulos	47

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III Caracterización genotípica de aislamientos locales de *S. meliloti*: Evaluación de la diversidad genómica y plasmídica.

1-	Construcción de una colección de aislamientos de <i>S. meliloti</i> como material de base para la búsqueda de plásmidos conjugativos	50
2-	Caracterización genómica de los aislamientos de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	51
3-	Análisis del contenido de plásmidos en la colección de aislamientos locales de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	53
4-	Estimación de la diversidad genética de los aislamientos a través de parámetros numéricos. (Co-)Relación entre los genotipos de "huella digital" y los perfiles de plásmidos	54

	5- La colección de aislamientos una como parte del germoplasma presente de los suelos muestreados	57
CAPÍTULO IV	Identificación, aislamiento y caracterización funcional de un plásmido transmisible por conjugación a partir de uno de los aislamientos locales de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	
	1- Transferencia conjugativa de material genético entre rizobios. Plásmidos crípticos de <i>S. meliloti</i> como mediadores de transferencia génica horizontal	60
	2- Búsqueda de plásmidos crípticos de <i>S. meliloti</i> movilizables por conjugación: Estrategia empleada sobre el aislamiento LPU88	61
	3- Caracterización de los transconjugantes <i>S. meliloti</i> 2011 Sm ^r Sp ^r Nmr	63
	4- Estudio de las propiedades de movilización del plásmido pSmeLPU88::Tn5	64
	5- Localización de las funciones de movilización presentes en la cepa LPU88 y requeridas para la transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5	67
	6- Caracterización simbiótica de cepas a las que se ha incorporado alguno de los plásmidos pSmeLPU88a/b. Ensayos de competitividad	68
CAPÍTULO V	Evaluación de la presencia de funciones conjugativas de ayuda (<i>helper</i>) y de plásmidos movilizables en aislamientos locales de <i>S. meliloti</i>	
	1- Introducción.	72
	2- Análisis de complementación de las funciones de ayuda entre dos sistemas binarios de movilización plasmídica de <i>S. meliloti</i> : pSmeLPU88a / pSmeLPU88b vs pRmeGR4a / pRmeGR4b	72
	3- Reconocimiento de funciones de ayuda (<i>helper</i>) capaces de movilizar el plásmido modelo pSmeLPU88b, en cepas de los distintos grupos de diversidad establecidos en el Capítulo I	73
	4- Incompatibilidad de replicación del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 con plásmidos presentes en cada uno de las cepas estudiadas	76
	5- Búsqueda de nuevos plásmidos crípticos movilizables por conjugación en cada uno de los aislamientos presentados en la Tabla V.1	78
CAPÍTULO VI	Caracterización molecular de mutaciones del plásmido pSmeLPU88a que conducen a la pérdida de la función de ayuda (<i>helper</i>)	
	1- Introducción	83
	2- Obtención de variantes mutantes del plásmido pSmeLPU88a que hayan perdido la capacidad de movilizar el plásmido pSmeLPU88b	84

3-	Análisis de uno de los plásmidos mutantes que ha perdido las funciones de ayuda: Mutagénesis reversa de la cepa <i>S. meliloti</i> LPU88 para introducirle la alteración presente en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5	84
4-	Secuenciamiento y análisis de la organización genética de la región interrumpida por el transposón en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5	86
5-	El requerimiento del gen <i>rpt1</i> para las funciones conjugativas de ayuda es dependiente del hospedador. Ensayos de complementación	88
DISCUSIÓN GENERAL - CONCLUSIONES FINALES		94
ANEXO		102
	Construcción y caracterización de una cepa de <i>Sinorhizobium meliloti</i> marcada en forma estable en su cromosoma con el gen de la proteína de fluorescencia verde (GFP)	
REFERENCIAS		106

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Alineación de las regiones de corte de diferentes <i>oriT</i>	12
Figura I.2	Mapa físico y genético de la región de transferencia del plásmido F	14
Figura I.3	Mapa físico y genético de la región de transferencia de los plásmidos RK2/RP4.	15
Figura I.4	Regiones de transferencia del plásmido IncN pKM101y del plásmido IncW pSU1087	16
Figura I.5	Estructura genética de los componentes del regulon <i>tra</i> del plásmido Ti	18
Figura III.1	Perfiles de "huella digital" genómica generada mediante MBOREP1-PCR a partir de aislamientos locales de <i>S. meliloti</i>	52
Figura III.2	Perfiles de plásmidos correspondientes a los diferentes patrones obtenidos a partir de aislamientos locales de <i>S. meliloti</i> en geles de lisis <i>in situ</i> tipo-Eckhardt	53
Figura III.3	Curva de diversidad acumulativa de Shannon-Weaver	58
Figura IV.1	Diagrama de la estrategia general utilizada para el aislamiento de plásmidos movilizables de <i>S. meliloti</i>	61
Figura IV.2	Perfiles de plásmidos y perfiles de "huella digital" genómica por PCR-MBOREP de los aislamientos obtenidos en el laboratorio a partir del suelo 24	62
Figura IV.3	Perfil plasmídico de los clones Sp^r - Nm^r obtenidos en la conjugación <i>S. meliloti</i> LPU88::Tn5 (en masa) x <i>S. meliloti</i> 2011 Sp^r	63
Figura IV.4	Estimación de los pesos moleculares de los plásmidos crípticos presentes en el aislamiento salvaje LPU88	64
Figura IV.5	Amplificación por PCR de secuencias específicas del gen <i>nptII</i> y de la secuencia de inserción IS50 para determinar la presencia y localización del Tn5 en los clones Sp^r Nm^r obtenidos de la conjugación <i>S. meliloti</i> LPU88::Tn5 (en masa) x <i>S. meliloti</i> 2011 Sp^r	65
Figura IV.6	Perfil plasmídico de los clones obtenidos de la conjugaciones de <i>S. meliloti</i> LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) x <i>S. meliloti</i> 2011 Sp^r y <i>S. meliloti</i> LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) x <i>A. tumefaciens</i> UBAPF2	66
Figura V.1	Perfiles plasmídicos de las cepas <i>S. meliloti</i> LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5), de la cepa <i>S. meliloti</i> GR4 y de los transconjugantes <i>S. meliloti</i> GR4 (pSmeLPU88b::Tn5	73
Figura V.2	Estrategia de marcación de aislamientos salvajes locales de <i>S. meliloti</i> por integración cromosomal del plásmido pSM10 en la región cromosomal <i>recA-alaS</i>	74
Figura V.3	Perfiles de plásmidos de los aislamientos en los que se observó incompatibilidad con el plásmido introducido pSmeLPU88b	77
Figura V.4	Perfil plasmídico de los clones Rif^r Nm^r obtenidos de la conjugación <i>S. meliloti</i> LPU87::Tn5 (en masa) x <i>A. tumefaciens</i> UBAPF2	78

Figura V.5.	Amplificación por PCR de la secuencia de inserción IS50 para determinar la presencia del Tn5 en los clones Rif^r Nm^r obtenidos de la conjugación <i>S. meliloti</i> LPU57::Tn5 (en masa) x <i>A. tumefaciens</i> UBAPF2 y <i>S. meliloti</i> LPU87::Tn5 (en masa) x <i>A. tumefaciens</i> UBAPF2	79
Figura V.6.	Esquema en el que se muestran los distintos destinos posibles del plásmido pSmeLPU88b cuando el mismo es transferido a aislamientos locales de los diferentes grupos de diversidad plasmídica que hemos definido en el Capítulo III	81
Figura VI.1	Secuencia y mapa genético propuesto para una región de ADN de 4859 pb que contiene el sitio de transposición del plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5	87
Figura VI.2	Esquema del procedimiento experimental empleado en la mutagénesis sitio específica sobre el gen <i>rpt1</i> en la cepa <i>S. meliloti</i> LPU88	89
Figura VI.3	Análisis de la nueva estructura genómica en la región <i>rpt1</i> del plásmido pSmeLPU88a generada por la inserción sitio específica del plásmido pMP4	90
Figura VI.4	Perfil plasmídico de los clones Rif^r Nm^r obtenidos de la conjugación <i>S. meliloti</i> (pSmeLPU88a::Tn5B13-5, pSmeLPU88b::Tn5, pMP3) x <i>A. tumefaciens</i> UBAPF2	91
Figura A.1	Estudio de la estabilidad del marcador Tc-<i>gfp</i> en la cepa <i>S. meliloti</i> 2011-Tc-<i>gfp</i>	103
Figura A.2	Experimento de inoculación simple y de co-inoculación de alfalfa en las cepas <i>S. meliloti</i> 2011 y <i>S. meliloti</i> 2011-Tc-<i>gfp</i>	104
Figura A.3	Visualización de eventos de infección usando la cepa <i>S. meliloti</i> 2011::<i>gfp</i>-Tc	105

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1.	Especies procariotas naturalmente competentes	7
Tabla I.2.	Transformación de bacterias en el medio ambiente	6
Tabla I.3.	Descripción de diferentes eventos de transferencia horizontal de marcadores genéticos por conjugación entre bacterias en diferentes ambientes naturales	9
Tabla II. 1.	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el presente trabajo de tesis	31
Tabla II.2.	Cepas bacterianas de la colección de LPU de <i>S. meliloti</i> utilizadas en el presente trabajo de tesis	33
Tabla II.3.	Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en reacciones de PCR en este trabajo	38
Tabla III.1.	Indices de diversidad de Shannon y Simpson calculados en base a la distribución de aislamientos de <i>S. meliloti</i> entre los diferentes tipos de "huella digital" genómica y perfiles plasmídicos definidos en este estudio	55
Tabla III.2.	Número de aislamientos correspondientes a las diferentes combinaciones de patrón de MBOREP1-perfil plasmídico	57
Tabla IV.1.	Porcentaje de ocupación de nódulos en experimentos de coinoculación de alfalfa con la cepa 2011 Tc-<i>gfp</i> y sus derivados portadores de los plásmidos pSmeLPU88a y pSmeLPU88b marcados	69
Tabla V.1.	Capacidad de cepas representativas de cada uno de los grupos de diversidad plasmídica para movilizar el plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Fenómenos de incompatibilidad de replicación del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 con plásmidos presentes en cada uno de las cepas estudiadas	75

ABREVIATURAS

Ap:	Ampicilina
Cm:	Cloranfenicol
D.O.:	Densidad Óptica
EPS:	Exopolisacárido
FBN:	Fijación Biológica de Nitrógeno
Gm:	Gentamicina
IS:	Secuencia de Inserción
Km:	Kanamicina
LB:	Medio de cultivo Luria Bertani
LPS:	Lipopolisacárido
Nm:	Neomicina
Rif:	Rifancina
RNAsa:	Ribonucleasa
SD:	“ <i>Standard Deviation</i> ”, desviación estándar.
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
Sm:	Estreptomicina
Sp:	Espectinomicina
Tc:	Tetraciclina
TY:	Medio de cultivo triptona extracto de levadura
ufc:	unidades formadoras de colonias bacterianas
X-gal:	5-bromo-4cloro-3indolil- β -galactopiranósido

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

1. Elementos genéticos móviles como generadores de diversidad y adaptabilidad bacteriana.

La habilidad de las bacterias para explotar nuevos entornos y responder a nuevas presiones de selección a lo largo de la evolución puede muchas veces explicarse en base a mecanismos de adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal, más que por modificación secuencial de genes por la acumulación de mutaciones puntuales (Syvanen, 1994; Lawrence, 1997). La transferencia horizontal de genes entre organismos relacionados o no, es uno de los tópicos más estudiados en el campo de las biociencias desde 1940. Ello no sólo ha sido de interés por las implicancias a nivel evolutivo sino también por el potencial riesgo para el medio ambiente debido a la liberación accidental o deliberada de microorganismos modificados genéticamente. El debate generado a raíz de esta posibilidad reveló los escasos conocimientos que existen respecto a la transferencia de genes en condiciones naturales. Ese conocimiento es asimismo necesario en vista de la liberación de microorganismos no recombinantes con fines agronómicos para mejorar la fijación de nitrógeno (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*), solubilización de fosfato (*Burkholderia*, *Erwinia*), el control de hongos y bacterias fitopatógenas (*Pseudomonas*, *Erwinia*), la estimulación del crecimiento de plantas (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*), el control de insectos (*Bacillus thuringiensis*), y bioremediación de zonas contaminadas con compuestos xenobióticos (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*) (Revisado en Davison, 1988; Wilson y Lindow, 1993). Es por tanto muy importante el estudio racional de los mecanismos y extensión de la transferencia genética en los sistemas antes mencionados. Mas aún en la perspectiva que varios de los organismos que hoy son liberados podrán ser mejorados genéticamente

La secuencia completa del genoma de *E. coli* ha permitido un análisis molecular retrospectivo de la frecuencia de transferencia con que ha intercambiado material cromosomal (Lawrence y Ochman, 1998). Se ha podido estimar así que los linajes de *S. enterica* y *E. coli* se separaron aproximadamente hace 100 millones de años. Un análisis basado en la diferencia en composición y patrones de utilización de codones, ha permitido una estimación de la extensión de la transferencia horizontal de genes. Aproximadamente el 17% de los genes de *E. coli* han sido adquiridos por transferencia horizontal.

La diseminación de la resistencia a antibióticos y de los genes de degradación de xenobióticos, en distintas bacterias se debe a transferencia horizontal de genes, acoplada con la presión de selección causada por la presencia de estas sustancias en el medio ambiente (Levy, 1994; Davies, 1996; Salyers y Shoemaker, 1996; Van der Meer *et al.*, 1992). Similarmente, varias islas de patogenicidad fueron adquiridas en el pasado por una variedad de patógenos como: *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Dichelobacter nodosis*, *Helicobacter pylori* y algunas variantes de *Escherichia coli* (Hacker *et al.*, 1997).

1.1. Caracteres más comunes introducidos por transferencia horizontal de genes.

Para que la transferencia horizontal sea exitosa los genes donados deben persistir en los genomas recipientes. Genes esenciales, como los que codifican para el ARN ribosomal, son poco probables de ser sujetos de transferencia exitosa debido a que el recipiente ya posee funciones ortólogas. En esos eventos los productos de los genes ortólogos nativos han experimentado una coevolución a lo largo del tiempo con el resto de la maquinaria celular y es poco probable que sean desplazados. En cambio, los genes con poca selección o selección transiente (genes catabólicos no esenciales) pueden beneficiar a otras bacterias al adquirir esas funciones. Así, la transferencia horizontal evita la pérdida debida a eventuales deleciones de estos genes con poca selección, al distribuirlos entre distintos linajes. Si consideramos a las especies bacterianas como poblaciones explotando un espacio ecológico definido, entonces la transferencia horizontal de funciones, atrapadas en operones, puede promover la especiación bacteriana en un sólo evento simple de transferencia horizontal (Lawence y Roth, 1998; Lawence, 1997). Aunque la transferencia horizontal está en general asociada a la movilización de operones que confieren funciones metabólicas simples y no esenciales, existen ejemplos en los que se transfieren funciones esenciales como ha sido la transferencia del gen de la isolecil-tRNA sintasa en *Mycobacterium tuberculosis* (Sassanfar *et al.*, 1996).

El impacto de la transferencia horizontal se aprecia cuando se hace una correlación entre la adquisición de una capacidad particular y la habilidad de explotar nuevos ambientes o modos de vida. Sin embargo, mientras que las funciones de algunos genes adquiridos han sido determinadas, no es siempre claro cuáles son los ambientes mejor explotados usando la nueva capacidad adquirida. En otros casos, es conocido qué genes pueden mediar la expansión en un nicho dado, pero la contribución fisiológica precisa de las nuevas funciones no siempre es tan clara (Lawrence, 1999).

Existen varios de ejemplos bien documentados en los que la transferencia ha favorecido claramente procesos de adaptación bacteriana:

Resistencia a antibióticos. La diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre patógenos (humanos y animales) y poblaciones comensales es uno de los paradigmas de la transferencia horizontal de genes. Los genes de resistencia a antibióticos posibilitan al microorganismo expandir su nicho ecológico permitiendo su proliferación en presencia de ciertos compuestos tóxicos. En los últimos 50 años se ha podido recabar mucha información acerca de las respuestas de distintos ecosistemas bacterianos a la adición de antibióticos. Los genes de resistencia a antibióticos están asociados con elementos genéticos altamente móviles. Los plásmidos son capaces de movilizarse entre distintas especies y representan la manera más común de adquirir los determinantes de resistencia (Götz *et al.*, 1996, Mazel y Davies, 1999).

Biodegradación de compuestos xenobióticos. No es sorprendente que la transferencia horizontal de genes también lleve a la diseminación de operones involucrados en la degradación de xenobióticos en entornos contaminados (van der Meer, 1997; Williams y Sayers, 1994). Las presiones de selección son similares a la de los antibióticos, pero el

proceso de degradación de compuestos xenobióticos requiere sistemas genéticos más complejos, generalmente operones de 10 o más genes, o regulones de varios operones con los sistemas de control. Por ejemplo, el plásmido pNL1 de *Sphingomonas aromaticovorans* contiene un grupo de 15 genes directamente asociado con el catabolismo o transporte de compuestos aromáticos (Romine *et al.*, 1999). La diseminación de elementos móviles asociados a la degradación de compuestos aromáticos no ha sido tan estudiada como la diseminación de las resistencias a antibióticos. Sin embargo, los mecanismos parecen ser similares: plásmidos y transposones distribuyen operones a través de un amplio espectro de bacterias (Di Gioia *et al.*, 1998).

Determinantes de patogenicidad y de simbiosis. Algunos plásmidos en bacterias patógenas están cargados de determinantes de virulencia, que pueden variar desde aquellos asociados a la producción de toxinas hasta otros vinculados al sabotaje de la maquinaria celular, como en el caso del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Existen plásmidos "patogénicos" que por su sola presencia modifican la conducta de la bacteria huésped. A este grupo pertenecen el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y plásmidos de virulencia de *Yersinia*, *Shigella* y *Escherichia coli*. Estos plásmidos al ser adquiridos por una nueva bacteria huésped, crean en esencia una nueva especie.

Los cambios fenotípicos asociados al nuevo germoplasma están muchas veces asociados sólo a una parte del material genómico adquirido. Las islas de patogenicidad (Barinaga, 1996; Groisman y Ochman 1997; Hacker *et al.*, 1997) son un ejemplo de ello. En general codifican funciones fisiológicas bien definidas (por ejemplo: adhesinas, sistema de secreción tipo III, sistema de incorporación de Fe) y están asociados al desarrollo de un modo de vida bien definido como puede ser el crecimiento dentro de un huésped eucariota específico. La promiscuidad de las islas de patogenicidad permite además a bacterias de distintas taxa adquirir un comportamiento patogénico complejo en un único evento de transferencia (Lawrence, 1999). En contraste con ello, la evolución de las islas de patogenicidad representa el paradigma de funciones bacterianas de evolución lenta. Aunque la mayoría están integradas al cromosoma, existen evidencias que sugieren que son, o han sido, elementos móviles.

A través de mecanismos aún no caracterizados en detalle, se han publicado evidencias que apoyan la transferencia horizontal de genes en suelos de Nueva Zelandia desde cepas inoculadas de *Mesorhizobium loti* hacia bacterias receptoras nativas no simbióticas (Sullivan *et al.*, 1995; 1996). En esas especies bacterianas, los genes simbióticos se localizan en una isla simbiótica grande (~ 500kb) de localización cromosomal. Por análisis de genotipificación se encontró que las cepas aisladas de los nódulos de *L. corniculatus* en los campos inoculados, eran diferentes de la cepa original introducida (en los campos no existía población nativa de bacterias noduladoras de esa leguminosa). Estas nuevas cepas, sin embargo contenían la isla simbiótica de la cepa original inoculada indicando que esa porción cromosomal ha sido transferida e integrada al cromosoma de otro "rizobio" (originalmente no simbiótico) que ha adquirido la capacidad de nodular *L. corniculatus*. La confirmación de esta hipótesis surgió del aislamiento de suelos vecinos de cepas similares no simbióticas, que se presume corresponden a las recipientes indígenas. La hipótesis se verificó por la transferencia exitosa

de la isla simbiótica desde una cepa simbiótica a otra cepa no simbiótica. La integración es sitio específica, en el gen de phe-tRNA, el cual es reconstituido en el proceso. La isla simbiótica se halló que codifica para una colifago integrasa del tipo P4, posiblemente responsable de la integración sitio específica (Sullivan y Ronson, 1998).

2. Mecanismos de transferencia genética en bacterias.

La transmisión lateral de material entre bacterias es llevada a cabo a través de al menos tres mecanismos conocidos: transformación, transducción y conjugación. La transformación se define como la incorporación, integración y posterior herencia estable de ADN libre por parte de las bacterias. En la transducción la información genética es transferida desde la célula donadora a la receptora a través de bacteriófagos. La conjugación es un proceso que requiere contacto célula-célula y por el cual los plásmidos son transferidos desde una célula donadora a una receptora. Ya que muchos plásmidos conjugativos exhiben un rango amplio de transferencia y replicación autónoma, la conjugación se considera un importante factor para el flujo de genes entre bacterias. La transferencia conjugativa de genes ha sido considerada como el mecanismo posiblemente más frecuente para la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Fry y Day, 1990; Amábile-Cuevas y Chicurel, 1993),

2.1 Transformación.

La transformación es un proceso en el cual las células competentes adquieren ADN y lo incorporan en su genoma. La competencia es la habilidad fisiológica de incorporar ADN. Cuando células competentes entran en contacto con el ADN extracelular, éste es unido a las células y luego es incorporado. Las bacterias competentes pueden incorporar el ADN libre en solución, como también el asociado a partículas (Lorenz y Wackernagel, 1990; Lorenz et al., 1988; Stewart *et al.*, 1991) y a restos celulares (Juni, 1972).

Muchas especies de bacterias son naturalmente competentes. Lorenz y Wackernagel (1994) listan 44 especies de procariontes competentes naturales con características fisiológicas distintas: fotolitótrofos, quimiolitótrofos, heterótrofos, metilótrofos y patógenos (Tabla I.1.). Muchas especies bacterianas adquieren competencia en el curso de su ciclo celular, por ejemplo: *Streptococcus pneumoniae* (Lunssford, 1998). Otras especies (por ejemplo: *Neisseria gonorrhoeae*) se encuentran siempre en estado competente (Lorenz y Wackernagel, 1994). Algunas especies, como *E. coli*, pueden ser inducidas a ser competentes mediante procesos químicos o físicos incluyendo tratamientos con CaCl₂, EDTA, cambios de temperatura y formación de protoplastos.

A pesar de su sensibilidad a las nucleasas, el ADN es relativamente común en casi todos los entornos y puede ser liberado por bacterias vivas o en procesos de autólisis (Lorenz y Wackernagel, 1994). El ADN en el medio ambiente puede ser degradado por nucleasas o bien estabilizado por adsorción a partículas de arena y arcilla. De esa manera se vuelve de 100 a 1000 veces más resistentes a las DNAsas y mantiene su capacidad transformante por semanas

(Romanoswki *et al.*, 1993; Khana y Stotzky, 1992; Charmier *et al.*, 1993; Lorenz y Wackenagel, 1994). La potencial dilución del ADN en medios acuáticos parece ser una barrera para la interacción con las células recipientes potenciales. Contrapuesto a ello, Baur *et al.* (1996) determinaron que en condiciones naturales una bacteria lisada en un biofilm puede aportar ADN en cantidades significativas como para contribuir a la transferencia horizontal.

TABLA I.1. Especies procariotas naturalmente competentes ^a.

Especies aisladas de habitats terrestres o acuáticos	Frecuencia de transformación (marcador cromosomal de transformación/ célula viable)	Referencia(s)
<i>Fotolitotróficos</i>		
<i>Agmenellum quadruplicamm</i>	$4,3 \times 10^{-4}$	Stevens y Porter, 1986
<i>Anacystis nidulans</i>	$8,0 \times 10^{-4}$	Shestakov y Khyen, 1970
<i>Chlorobhuh limicola</i>	$1,0 \times 10^{-5}$	Ormerod, 1988
<i>Nostoc muscorum</i>	$1,2 \times 10^{-3}$	Trehan y Sinha, 1981
<i>Synechocystis sp. strain 6803</i>	$5,0 \times 10^{-4}$	Grigorieva y Shestakov, 1982
<i>Synechocystis sp. strain OL50</i>	$2,0 \times 10^{-4}$	Lorenz y Wackenagel, 1993
<i>Quimilitotróficos</i>		
<i>Thiobacillus thioparns</i>	10^{-3} - 10^{-2}	Yankofsky <i>et al.</i> , 1983
<i>Thiobacillus sp. strain Y</i>	$1,7 \times 10^{-3}$	Yankofsky <i>et al.</i> , 1983
<i>Heterotróficos</i>		
<i>Achromobacter spp.</i>	⁺ ^b	Juni y Heym, 1980
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	$7,0 \times 10^{-3}$	Juni y Janik, 1969
<i>Azotobacter vinelandii</i>	$9,5 \times 10^{-2}$	Page, 1985
<i>Bacillus subtilis</i>	$3,5 \times 10^{-2}$	Mulder y Venema, 1982
<i>Bacillus lichernformis</i>	$1,2 \times 10^{-2}$	Goldberg <i>et al.</i> , 1966
<i>Deinococcus (Alicococcus) radiodurans</i>	$2,1 \times 10^{-2}$	Tirgari y Moseley, 1980
<i>Lactobacillus lactis</i>	$2,3 \times 10^{-5}$	Hofer, 1985
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	10^{-7} - 10^{-6}	Norgard y Imaeda, 1978
<i>Pseudomonas stutzeri (and related species)</i>	$7,0 \times 10^{-5}$	Carlson <i>et al.</i> , 1983
<i>Rhizobiurn meliloti</i>	$7,0 \times 10^{-4}$	Courtois <i>et al.</i> , 1988
<i>Streptomyces spp.</i>	⁺ ^c	Roleants <i>et al.</i> , 1976
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	$2,7 \times 10^{-3}$	Hopwood y wright, 1972
<i>Thermus thennophilus</i>	$1,0 \times 10^{-2}$	Koyama <i>et al.</i> , 1986
<i>Thermus flavus</i>	$8,8 \times 10^{-3}$	Koyama <i>et al.</i> , 1986
<i>Thermus caldophilus</i>	$2,7 \times 10^{-3}$	Koyama <i>et al.</i> , 1986
<i>Thermus aquaticus</i>	$6,4 \times 10^{-4}$	Koyama <i>et al.</i> , 1986
<i>Vibrio sp. strain D19</i>	$2,0 \times 10^{-7}$	Jeffrey <i>et al.</i> , 1990
<i>Vibrio sp. strain WJT-1C^d</i>	$2,5 \times 10^{-4e}$	Frischer <i>et al.</i> , 1990
<i>Vibrio parahaenrolyticus</i>	$1,9 \times 10^{-9e}$	Frischer <i>et al.</i> , 1990
<i>Metilotróficos</i>		
<i>Methylobacterium organophilum</i>	$5,3 \times 10^{-3}$	O'Connor <i>et al.</i> , 1977
<i>Arqueas</i>		
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	⁺ ^b	Worrell <i>et al.</i> , 1989
<i>Methanococcus voltae</i>	$8,0 \times 10^{-6}$	Bertani y Baresi, 1987
<i>Aislamientos Clínicos de especies patógenas</i>		
<i>Campylobacter jejuni</i>	$2,0 \times 10^{-11}$	Wang y Taylor, 1990
<i>Campylobacter coli</i>	$1,2 \times 10^{-3}$	Wang y Taylor, 1990
<i>Haemophilus influenzae</i>	$7,0 \times 10^{-3}$	Mathis y Scocca, 1982
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	$8,6 \times 10^{-3}$	Gromkova y Googal, 1979
<i>Helicobacter pylori</i>	$5,0 \times 10^{-4}$	Haas <i>et al.</i> , 1993
<i>Monrxella spp.</i>	⁺ ^b	Juni, 1974; Juni <i>et al.</i> , 1988
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$1,0 \times 10^{-4}$	Mathis y Scocca, 1982
<i>Neisseria meningitidis</i>	$1,1 \times 10^{-2}$	Catlin, 1960
<i>Staphylococcus aureus</i>	$5,5 \times 10^{-6}$	Rudin <i>et al.</i> , 1974
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$2,9 \times 10^{-2}$	Lacks <i>et al.</i> , 1975
<i>Streptococcus sanguis</i>	$2,0 \times 10^{-2}$	Behnke, 1981
<i>Streptococcus mutans</i>	$7,0 \times 10^{-4}$	Shah y Caufield, 1993

^a Tomado de Lorenz y Wackenagel, 1994, ^b Determinación cualitativa (Juni y Janik, 1969), ^c Medida de la incorporación de ADN marcado con tritio, ^d Mutante de alta frecuencia de transformación de D19, ^e Marcador de resistencia a rifampicina codificado en plásmidos.

La transformación ha sido demostrada en diferentes bacterias y en una variedad de ecosistemas naturales (Tabla I.2.). A modo de ejemplo, Steward y Sinigalliano (1991)

demonstraron la transformación de *Pseudomonas stutzeri*, con ADN cromosomal portador del determinante de resistencia a rifampicina. Así mismo Nielsen *et al.* (1997a, b) estudiaron las condiciones que afectan la transformación de *A. calcoaceticus* en diferentes tipos de suelos, observando que cantidades elevadas de nutrientes y de fosfato incrementaban la frecuencia de transformación.

TABLA I.2. Transformación de bacterias en el medio ambiente^a

Bacteria huésped	Situación medio-ambiental	Marcador genético	Referencias
<i>P. stutzeri</i>	Microcosmos de agua marina	Rif ^r cromosomal	Stewart and Sinigalliano, 1991;
<i>Pseudomonas sp.</i>	Microcosmos de agua y sedimentos marinos	Multimeros de plásmidos	Paul <i>et al.</i> , 1991, 1992
<i>A. calcoaceticus</i>	Agua subterránea y extracto de suelo	<i>trp</i> cromosomal	Lorenz <i>et al.</i> , 1991, 1992
<i>A. calcoaceticus</i>	Agua subterránea y acuíferos	Plásmido	Chamier <i>et al.</i> , 1993
<i>A. calcoaceticus</i>	epiliton de ríos	<i>his</i> cromosomal	Williams <i>et al.</i> , 1996
<i>A. calcoaceticus</i>	Microcosmos de suelo	ADN cromosomal + cassette Km ^r , Gm ^r	Nielsen <i>et al.</i> , 1997a,b
<i>E. coli</i>	Agua de ríos y manantiales	Plásmido	Baur <i>et al.</i> , 1996
<i>P. stutzeri</i>	Microcosmos de suelo	<i>his</i> cromosomal y plásmidos	Sikorski <i>et al.</i> , 1988

^a Tomado de Davison, 1999.

2.2 Transducción.

En el proceso de transducción, genes bacterianos son incorporados a partículas de bacteriofago y transferidos a otra bacteria. El intercambio genético por transducción puede ocurrir esencialmente a través de tres formas. Primera, transducción generalizada, cuando un fago defectivo, conteniendo sólo ADN bacteriano, infecta a células huésped y el ADN introducido es luego incorporado al cromosoma de la bacteria receptora o es mantenido como plásmido. Segunda, transducción especializada, cuando el cambio fenotípico en el huésped es debido a la lisogenización de un fago temperado; el gen codificando la nueva característica fenotípica esta adyacente a la inserción del genoma del fago y es transferido a través de una escisión incorrecta del profago en la bacteria donadora. Tercera, transducción abortiva, donde las secuencias cromosomales de la bacteria donadora, empaquetadas en el fago, son inyectadas en la célula recipiente y expresadas transiientemente antes que sean diluidas por la división celular debido a que el ADN transferido no es capaz de replicarse o recombinarse en la célula receptora. Los bacteriófagos tienen un rango de huésped restringido, en general, a una única especie bacteriana. Además, la bacteria puede mutar y convertirse en resistente a la infección. Por estas razones es posible que la transducción tenga un rol más limitado que la conjugación y transformación en la transferencia de genes en condiciones naturales. A pesar de ello, los fagos son muy comunes en el medio ambiente (Jiang y Paul, 1998) y sus ácidos nucleicos son relativamente estables debido a la protección de los mismos por la cubierta proteica. Además, la habilidad de los bacteriófagos de pasar a la forma lisogénica les confiere

una gran capacidad para sobrevivir ante distintas situaciones de estrés ambiental pudiendo ser luego liberados del huésped.

Aunque en número limitado, existen varios estudios sobre la transferencia de genes en el medio ambiente mediada por transducción. Por ejemplo, la transducción de *Pseudomonas aeruginosa* fue observada tanto en ensayos ambientales en reservorios de agua como sobre la superficie de hojas (Morrison *et al.*, 1978; Saye *et al.*, 1987, 1990; Kidambi *et al.*, 1994). Los resultados sugieren que fagos liberados espontáneamente de una cepa lisogénica pueden infectar una segunda cepa no lisogénica y retrotransducir nuevos genes a la cepa original. Simulaciones de las condiciones de campo en invernadero, mostraron que existe transducción aún si las bacterias donadoras y receptoras se encuentran en distintas plantas. Jiang y Paul (1998) mostraron en otro ejemplo que un fago marino facilitaba la transducción de un plásmido de amplio rango de huésped a miembros de una comunidad microbiana marina. A través de cálculos matemáticos los mismos autores estimaron la tasa de transducción en $1,3 \times 10^{14}$ eventos por año para el estuario marino analizado. A pesar de las suposiciones hechas en el cálculo, el mismo sugiere que en medios marinos (acuáticos en general) la transducción puede ser un mecanismo importante para la transferencia horizontal de genes.

2.3 Conjugación.

La mayoría de los reportes de genes bacterianos transferidos en el ambiente involucran a la conjugación, que puede producirse de varias maneras: (i) Transferencia de un plásmido conjugativo que posee en su secuencia la información completa para su movilización (plásmido autotransmisible o conjugativo) (ii) Transferencia de un plásmido no-autotransmisible, que contiene el origen de transferencia (*oriT*), y que sólo puede ser movilizado por acción de un plásmido conjugativo (plásmido movilizable). El plásmido conjugativo puede o no ser transferido conjuntamente (iii) Transferencia de plásmidos por cointegración, donde dos plásmidos diferentes se fusionan para formar un tercero autotransmisible. Así un plásmido no-autotransmisible no-movilizable puede ser transferido debido a la acción de su cointegración por recombinación con plásmidos autotransmisibles. La fusión de plásmidos está generalmente facilitada por la presencia de transposones o elementos de inserción. La resolución del cointegrado puede ocurrir o no una vez incorporado a la célula receptora (iv) Transferencia mediada por transposones conjugativos, que también pueden facilitar la movilización plasmídica y la formación de cointegrados (Clewell *et al.*, 1995).

Muchos plásmidos tienen muy amplio rango de huéspedes para su replicación. Por ejemplo, los plásmidos no conjugativos movilizables del grupo de incompatibilidad IncQ (por ejemplo RSF1010) tienen un espectro de hospedadores extremadamente amplio, incluyendo la mayoría, sino todas, las bacterias Gram negativas y varias Gram positivas como *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Synechococcus*, y *Mycobacterium*. Plásmidos conjugativos como el RP4 y transposones conjugativos como el Tn916, también tienen un amplio rango de huésped. Miembros de la familia de transposones Tn916 son capaces de propagarse en más de 50

especies pertenecientes a 24 géneros distintos (Clewell *et al.*, 1995; Salyer y Shoemaker, 1996).

La transferencia conjugativa ha sido demostrada en varios tipos de ecosistemas como se resume en la Tabla I.3.. Las evidencias muestran la transferencia en una amplia variedad de bacterias y en distintas situaciones medio ambientales.

Tabla I.3. Descripción de diferentes eventos de transferencia horizontal de marcadores genéticos por conjugación entre bacterias en diferentes ambientes naturales.

Donadora	Receptora	Situación medio ambiental	Marcador genético	Referencia(s)
Ecosistemas animales				
<i>E. coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>	Tracto urinario?	A ^R -P	Tauxe <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> *	<i>Salmonella enteritidis</i>	Intestino humano?	A ^R -P	Balis <i>et al.</i> , 1996
<i>L. lactis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>Bacteroides</i> sp. <i>Bifidobacterium</i> sp. <i>Peptostreptococcus</i> sp	Intestino gnotobiótico de ratón	A ^R -P	Gruzza <i>et al.</i> , 1994
Bacteria intestinal de humanos, ratas, y cerdos	<i>E. coli</i>	Intestino libre de gérmenes	A ^R -P	Nijsten <i>et al.</i> , 1995
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella</i> sp_	Intestino humano?	A ^R -P	Prodinge <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> ?	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i>	Intestino humano?	A ^R -P	Bratsoeva <i>et al.</i> , 1994
<i>Prevotella</i> sp. (Diversas bacterias Gram positivas y negativas)	<i>Bacteroides fragilis</i>	Intestino humano? Intestino humano?	A ^R -P, con-Tn A ^R -P, con-Tn	Nikolich <i>et al.</i> , 1994 Salyers <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Microcosmos simulado del rumen de oveja	A ^R -P	Scott <i>et al.</i> , 1995
	(Patógenos bacterianos de humanos, de animales de granja y de pescado)	Tabla de picar carne y pescado	A ^R -P	Kruse and Sorum, 1994
<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidopterous larvae	Bt-P	Jarrett <i>et al.</i> , 1990
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	Tracto digestivo de oruga	A ^R -P	Armstrong <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i>	Microflora indígena	Tracto digestivo microartrópodo del suelo	A ^R , luc-P	Hoffmann <i>et al.</i> , 1988
<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Larva del gusano de seda	A ^R -P	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
Rizósfera				
<i>Mesorhizohium loti</i>	<i>Mesorhizohium</i> sp. no simbióticas del suelo	Suelo o rizósfera	sym-I	Sullivan <i>et al.</i> , 1995, 1996, 1998
<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. leguminosarum</i>	suelo no rizoférico?	pSym	Louvier <i>et al.</i> , 1996
<i>Sinorhizohium fredii</i>	<i>R. leguminosarum</i>	suelo no estéril	pSym	Kinkle <i>et al.</i> , 1991
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>	Suelo de la rizósfera	mob-P	Smit <i>et al.</i> , 1993
<i>Ralstonia eutrophus</i>	Bacteria indígenas de la rizósfera	Rizósfera de trigo	mob-P	van Elsas <i>et al.</i> , 1988
Bacterias indígenas de la rizósfera	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>E. cloacae</i>	Rizósfera de trigo	mob-P	Smit <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacteria indígenas de la rizósfera	Rizósfera de remolacha	A ^R -P	Lilley <i>et al.</i> , 1994
Bacteria de la rizósfera	<i>P. fluorescens</i>	Rizósfera de remolacha	M ^R -P	Lilley <i>et al.</i> , 1997
<i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Rizósfera de trigo	genes cromosomales mantenimiento	Troxler <i>et al.</i> , 1997
Hojas de plantas				
<i>P. syringae</i> y <i>E. herbicola</i>	<i>E. amylovora</i>	Hojas de peras	A ^R -P	Lacy <i>et al.</i> , 1984
<i>P. syringae</i>	bacterias de planta epifitas	Hojas de leguminosas	A ^R -P	Björklöf <i>et al.</i> , 1995
<i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	Hojas de peras ornamentales	A ^R , M ^R -P A ^R -Tn	Sundin <i>et al.</i> , 1994
Bacterias superficiales de las hojas	<i>P. fluorescens</i>	Hojas y raíces de remolacha	M ^R -P	Lilley <i>et al.</i> , 1997
<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i> y bacterias superficiales de las hojas	Hojas de leguminosas	cat, <i>gfp</i> -P	Normander <i>et al.</i> 1998
Agua y suelo no contaminados				
<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	Río oligotrófico	A ^R , cat-P	Bale <i>et al.</i> , 1988
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. chloraphis</i> <i>P. aureofaciens</i>	Río oligotrófico	mob-P	Hill <i>et al.</i> , 1992, 1994

(sigue)

Donadora (continuación Tabla 3.2.)	Receptora	Situación medio ambiental	Marcador genético	Referencia(s)
	<i>P. aeruginosa</i>			
	<i>bordetella sp</i>			
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium sp</i>	Rizosfera	A ^R , M ^R -P; cat	Kinkle <i>et al.</i> , 1991b
<i>E. coli</i>	<i>R. eutrophus</i>	Suelo enriquecido	M ^R -P	Top <i>et al.</i> , 1990
<i>P. aeruginosa</i>	Bacterias indígenas del suelo	Suelo	A ^R -P	Glew <i>et al.</i> , 1993
<i>P. fluorescens</i>	Bacterias del suelo	Suelo y excremento de lombriz	M ^R , catP	Daane <i>et al.</i> , 1996
Bacterias indígenas del suelo	<i>P. putida</i>	Suelo conteniendo estiércol de cerdo	A ^R -P, mobP	Götz <i>et al.</i> , 1997
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Microcosmos de aguas residuales	A ^R -P; A ^R Tn	Marcinek <i>et al.</i> , 1998
<i>E. coli</i>	Bacterias indígenas del agua de mar	Caldo Luria enriquecido adicionado de agua de mar	A ^R -P	Sørensen, 1993
<i>Vibrio</i> y <i>E. coli</i> hambreadas	<i>Vibrio</i> y <i>E. coli</i>	Microcosmos oligotrófico marino	A ^R -P	Goodman <i>et al.</i> , 1993
<i>Aeromonas Salmonicida</i>	Bacterias marinas indígenas	Microcosmos de sedimentos marinos	A ^R -P	Sandaa and Enger, 1994
<i>P. putida</i>	Bacterias marinas indígenas	Agua de mar y sedimento marino	A ^R , M ^R , <i>gfp</i> P	Dahlberg <i>et al.</i> , 1998
Suelo, agua y barro contaminados				
Bacterias indígenas del suelo	<i>A. eutrophus</i>	Suelo contaminado	catP	Top <i>et al.</i> , 1995, 1996
Bacterias indígenas	Bacterias indígenas	Sitio contaminado con alquitrante hulla	cat-P	Herrick <i>et al.</i> , 1997
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas sp</i> indígenas	Sitio contaminado con fenol	catP	Peters <i>et al.</i> , 1997
<i>E. agglomerans</i>	<i>Pseudomonas</i> y <i>Camamonas sp</i>	Suelo contaminado	A ^R -P; cat-Tn	De Rore <i>et al.</i> , 1994
<i>Ralstonia eutrophus</i>	<i>P. glathei</i> , <i>B. cepacia</i>	Suelo contaminado	M ^R , catP	Digiovanni <i>et al.</i> , 1996
	<i>B. cariophylii</i>			
	<i>A. eutrophus</i>			
<i>Ralstonia eutrophus</i>	<i>V. paradoxus</i>	Microcosmos de suelo	M ^R , catP	Neilson <i>et al.</i> , 1994
<i>Ralstonia eutrophus</i>	Bacterias indígenas del suelo	Microcosmos de suelo	cat-P	Top <i>et al.</i> , 1998
Bacterias indígenas del suelo	<i>E. coli</i>	Microcosmos de suelo	mob-P	Top <i>et al.</i> , 1994
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Unidad de sedimentos activos	cat, mob-P	McClure <i>et al.</i> , 1989, 1990
<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	Microcosmos de sedimentos activos	catP	NuBlein <i>et al.</i> , 1992
<i>Alcaligenes sp.</i>	Bacteria indígena	Xenobiotic polluted freshwater microcosm	cat-Tn	Fulthorpe <i>et al.</i> , 1991, 1992; Nakatsu <i>et al.</i> , 1995
	(<i>Alcaligenes paradoxus</i> y <i>Pseudomonas pickettii</i>)	Suelo de agricultura?	cat-P	Ka <i>et al.</i> , 1994
<i>Burkholderia sp.</i>	Otras <i>Burkholderia sp.</i>	Suelo?	cromosomal cat	Matheson <i>et al.</i> , 1996
Bacteria indigenas de aguas residuales	<i>E. coli</i>	Planta de tratamiento de aguas residuales	mobP	Mancini <i>et al.</i> , 1987
<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	Cámara de flujo contaminada (biofilm)	cat, <i>gfp</i> -P	Christensen <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas sp.</i> B13	<i>Ralstonia eutrophus</i>	Acuífero	cat-Tn?	Zhou <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas sp.</i> B13	<i>P. putida</i> F1	Microcosmos de sedimentos activos	cat-Tn?	Ravatt <i>et al.</i> , 1998

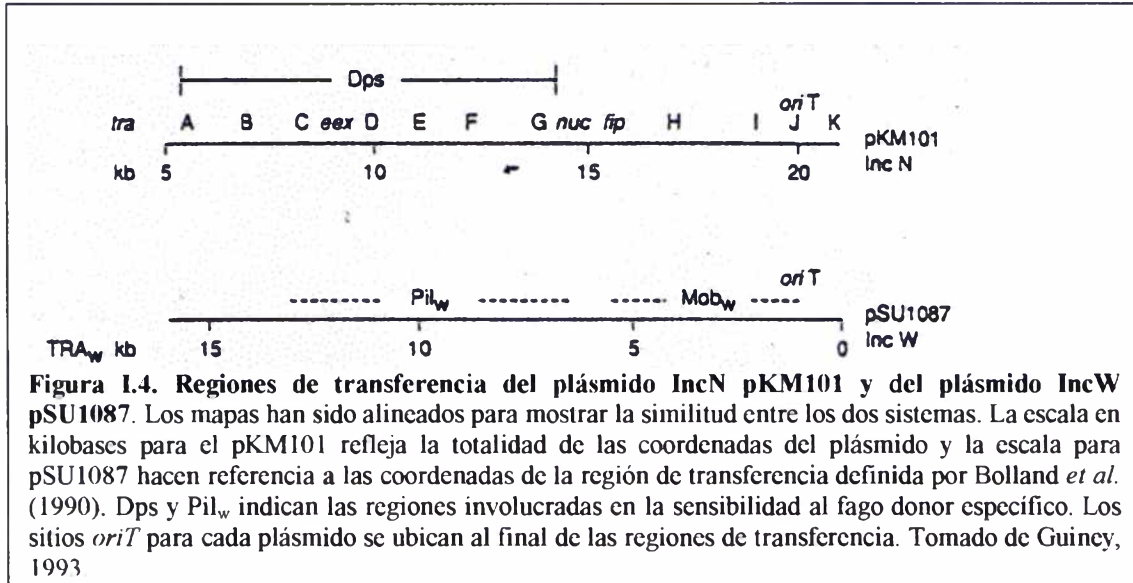
MRP, plásmido de resistencia a metales pesados; ARP, plásmido de resistencia a antibióticos; cat-P, plásmido catabólico; mob-P, plásmido móvil; AR-Tn transposón de resistencia a antibiótico; con-Tn, transposón conjugativo; cat-Tn, transposón catabólico; pSym, plásmido simbiótico; sym-I, isla simbiótica cromosomal; Bt-P, plásmido con la toxina del *B. thuringiensis*; *gfp*, gen de la proteína verde fluorescente; luc, gen de la luciferasa; ?, posible o desconocido. Tomado de Davison, 1999.

En muchos casos estudiados las bacterias donadoras o receptoras pueden ser desconocidas y sólo reconocidas por los marcadores que han adquirido. Para esos casos la ocurrencia de conjugación es sólo presuntiva.

Se ha encontrado que en medios naturales existen "zonas calientes" que favorecen los eventos de transferencia horizontal de genes. Se ha probado por ejemplo que la fitósfera, incluyendo el filoplano, la filósfera, el rizoplano, y en especial la rizósfera proveen condiciones muy favorables para el intercambio genético entre bacterias mediado por conjugación. Varios estudios (van Elsas *et al.*, 1988, 1989; Lilley *et al.*, 1994; Troxler *et al.*, 1997) muestran claramente que la rizósfera favorece la transferencia de genes por conjugación cuando se la compara con el suelo no rizosférico, y debe ser considerada en efecto como una verdadera "zona caliente" de conjugación en ambientes terrestres. En

transferencia, TRAI y TRAI, pueden ser consideradas como una única región de transferencia.

La región TRAIII contiene funciones que no son requeridas para la sensibilidad a fagos (Winans y Walker, 1985a). Esta región se cree que esta involucrada en el metabolismo conjugativo del ADN. Cuatro grupos de complementación TraH, -I, -J, y -K, se han identificado en esta región por inserciones de Tn5. Las regiones TRAI y TRAIII se encuentran separadas por aproximadamente 2,5 kb (Ver Figura 1.4.).



Funciones de transferencia en los plásmidos IncW.

Los plásmidos IncW han sido encontrados en una variedad de bacterias Gram negativas incluyendo *Aeromonas liquefaciens* y muchas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. El plásmido pSa, ha sido transferido a muchos géneros de bacterias Gram negativas, incluyendo *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Legionella*, *Methylophilus*, *Myxococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, y *Zymomonas* como también varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

La región de transferencia de los plásmidos IncW pSa y R388 ha sido localizada en el mapa de estos plásmidos. Ambas regiones ocupan aproximadamente 12 kb (Valentine y Kado, 1989). El sistema de conjugación del plásmido R388 ha sido caracterizado en mayor detalle usando análisis de delección, subclonado y mutagénesis insercional (Bolland *et al.*, 1990). Habiéndose determinado que el tamaño máximo de la región de transferencia es de aproximadamente 14,9 kb. Como en el caso de los plásmidos IncN el sistema de transferencia del plásmido R388 está dividido en dos grupos de genes asociados a las siguientes funciones: un grupo de genes que contiene funciones requeridas para la síntesis del pili (designado Pil_w), y un segundo grupo involucrado en el procesamiento del ADN (Mob_w). La región Mob_w puede ser movilizadada en *trans* por las funciones de la región Pil_w llevadas en otro plásmido.

Es interesante notar que Mob_w también puede ser transferida proveyendo en *trans* los genes de síntesis del pili de los plásmidos IncN, pero no fue movilizado por el sistema de conjugación del plásmido IncP (genes *trb*). La región Mob_w tiene un tamaño de al menos 4 kb, e incluye tres genes *trwA*, *-B*, y *-C*. Estos genes son transcritos en el mismo sentido y alejándose desde el sitio *oriT*. Pil_w está localizado cerca de la región Mob_w y comprende al menos 7 kb (Ver Figura I.4.). Todas las mutaciones en la región Pil_w que resultaron deficientes en transferencia, también fueron resistentes al fago donador específico, mientras que ninguna de las inserciones en Mob_w resultó resistente a los fagos.

Funciones de transferencia en los plásmidos Ti.

Los plásmidos Ti tienen la característica de codificar dos sistemas discretos de transferencia conjugativa. Uno de ellos (genes *vir*, virulencia) ha evolucionado para translocar un segmento del plásmido Ti (T-DNA) desde una bacteria a células de plantas dicotiledóneas (Johnson y Das, 1997). El segundo es utilizado para transferir el plásmido Ti de una bacteria a otra (funciones *tra*). La composición de cada uno de estos sistemas conjugativos es conocida a nivel de la secuencia de ADN. Los dos sistemas de transferencia son completamente independientes desde el punto de vista funcional. Así, la transferencia del T-DNA mediada por los genes *vir* no requiere de las funciones de transferencia codificadas por los genes *tra* (Rogowsky, *et al.*, 1990). Del mismo modo, la transferencia conjugativa de estos plásmidos a otros huéspedes bacterianos mediada por los genes *tra* es independiente de la presencia de los genes *vir* (Cook *et al.*, 1997). El estudio de las relaciones filogenéticas indica que estos dos sistemas derivan de diferentes ancestros, aunque es posible que haya existido una redistribución de ciertos determinantes genéticos entre los sistemas *tra* y *vir* (Farrand *et al.*, 1996).

La estructura genética de los sistemas de transferencia conjugativa de los plásmidos Ti de tipo nopalina/agropina y octopina/manitol opina han sido caracterizados a nivel de secuencia. Los genes de los sistemas de transferencia conjugativa de estos dos tipos de plásmidos Ti están muy cercanamente relacionados y claramente han derivado de un antecesor común. Las funciones Dtr y Mpf de ambos tipos de plásmidos son además funcionalmente intercambiables (Cook y Farrand, 1992; Cook *et al.*, 1997). Los análisis mutacionales sugieren que las funciones de transferencia conjugativa de ambos tipos de plásmidos Ti se localizan en dos grupos de genes (Holster *et al.*, 1980; Degreve *et al.*, 1981; von Bodman *et al.*, 1989). Un grupo de genes codifica las funciones del metabolismo del ADN (funciones Dtr) y el otro grupo codifica para las funciones de transporte del plásmido y de adherencia celular (funciones Mpf). Los genes que codifican las funciones Dtr están organizados en ambos tipos plásmidos (nopalina-octopina) como dos operones divergentes transcritos desde una región intergénica que contiene al *oriT*. En el plásmido pTiC58, un operón incluye los genes *traA*, *-F*, *-B*, y el otro los genes *traC*, *-D* y *-G* (Farrand, *et al.*, 1996)(ver Figura I.5.). El análisis de la secuencia de estos genes y su comparación con otros sistemas conjugativos sugiere que *traA*, *-F*, *-C*, *-D* y *-G* son posiblemente requeridos para la

plásmidos IncP, IncM o IncX (Willets y Crowther, 1981). Los plásmidos IncQ mejor estudiados son el RSF1010, R300B y R1162 que aunque fueron aislados de diferentes fuentes parecen muy similares en su organización.

La región de movilización del plásmido RSF1010 consiste del *oriT* y tres genes: *mobA(repB)*, *mobB*, y *mobC* (Derbyshire *et al.*, 1987, Derbyshire y Willets, 1987). El gen *mobA/repB* está situado adyacente al *oriT*. Este locus codifica dos proteínas relacionadas, *RepB (MobA)* y *RepB'*, una proteína más pequeña con actividad primasa generada de un segundo inicio de traducción en el mismo marco de lectura que la *RepB/MobA* (Haring y Scherzinger, 1989). El gen *mobB* está solapado con el gen *mobA* y es traducido en otro marco de lectura. El gen *mobC* está localizado del otro lado del *oriT* y es transcripto en dirección opuesta a *mobA*. Las tres proteínas son requeridas para la movilización: *MobA* corta y liga la hebra transferida (Bhattacharje *et al.*, 1992) a través de una actividad localizada en su extremo N terminal. En su extremo C terminal tiene actividad primasa (similar a la actividad *RepB'*) que está relacionada con el amplio rango de huéspedes de los plásmidos IncQ (Henderson y Meyer, 1999). La proteína *MobC* por su parte interviene en la localización y separación de las hebras en el *oriT* (Zhang y Meyer, 1997) y la proteína *MobB* estabiliza el complejo de las proteínas *Mob* en el *oriT* y tiene también funciones adicionales en la transferencia que han sido poco caracterizadas (Perwez y Meyer, 1999).

3.3 Transposones conjugativos.

Los transposones conjugativos son elementos genéticos móviles que codifican su propia transferencia desde el genoma de la célula donadora al genoma de la célula receptora. Estos elementos son marcadamente promiscuos y son capaces de ser transferidos a especies filogenéticamente distantes (Wang *et al.*, 2000). El transposón conjugativo más intensamente estudiado es el *Tn916*, un elemento de 18,3 kb que codifica para el gen de resistencia a Tetraciclina (Franke y Clewell, 1981). Este transposón fue originalmente aislado del cromosoma de *Enterococcus faecalis* DS16.

La primera etapa en la transposición del *Tn916* y los elementos cercanamente relacionados es la escisión del ADN de la célula donadora. El proceso continúa con la circularización del elemento y su subsecuente transferencia a un nuevo huésped, donde el transposon se inserta en un nuevo sitio de ADN. Los genes de integración (*int*) y de escisión (*xis*) codificados por el transposon son requeridos para la escisión, pero sólo el *int* para la integración (Poyart-Salmeron *et al.*, 1989; Marra y Scott, 1999).

La región que se requiere para la transferencia del *Tn916* ha sido secuenciada (Clewell *et al.*, 1995; Flannagan *et al.*, 1994). Un hallazgo interesante es que ninguno de los marcos abiertos de lectura en la región de transferencia tienen una similitud significativa con los genes del pili sexual de los plásmidos conjugativos.

4. Características generales y de transferencia de plásmidos de rizobios.

Los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, son capaces de desarrollar una simbiosis fijadora de nitrógeno con plantas leguminosas. Entre las características importantes de estas asociaciones se destacan los altos niveles de nitrógeno molecular fijado, la eficiencia del proceso y el interés económico y ecológico de las plantas involucradas. La fijación de nitrógeno tiene lugar en estructuras especializadas, los nódulos, originados en la leguminosa como consecuencia de una organogénesis inducida por el microsimbionte. En los nódulos, las bacterias se diferencian en bacteroides, los que utilizan los fotosintatos como fuente de energía y poder reductor para llevar a cabo la reducción del N₂ a amonio. Luego de este proceso, el amonio es incorporado al metabolismo de la planta. Todos estos procesos involucran una interacción muy compleja y ordenada entre la bacteria y la planta huésped (revisado por Hirsch, 1992).

Una característica general en especies del género *Rhizobium* y *Sinorhizobium* es la presencia de grandes cantidades de ADN extracromosomal en plásmidos que muchas veces son de gran tamaño. Estos plásmidos varían mucho en número (1 a 10) y tamaño y muchos de ellos tienen roles importantes en la asociación de los rizobios con la planta huésped. En algunas especies de rizobios la mayoría de los genes esenciales requeridos para el proceso simbiótico están localizados en plásmidos denominados plásmidos simbióticos (pSym). Además, la mayoría de los rizobios llevan plásmidos que no son esenciales para la nodulación y que son denominados en forma genérica plásmidos no simbióticos (Mercado-Blanco y Toro, 1996). Dado que no se han identificado funciones conocidas en muchos de ellos, a estos plásmidos también se los designa como plásmidos crípticos. El término "megaplásmido" fue acuñado para hacer referencia a los plásmidos más grandes ya sean simbióticos o no (Rosemberg *et al.* 1982). Hynes y Finan (1997), sugieren que el término megaplásmido sólo sea utilizado para plásmidos mayores de 1000 kb y no para hacer referencia a plásmidos de menor tamaño. En muchos rizobios el ADN plasmídico puede llegar a constituir un porcentaje muy significativo del ADN bacteriano como en *R. Etli*, por ejemplo, en que representa 45% del genoma (Martinez-Romero y Palacios, 1990; Martinez-Romero, 1994). Estudios genómicos indican que en una dada especie de rizobio un plásmido particular puede contener regiones que son conservadas en plásmidos presentes en otros aislamientos u otras especies de ese género, o aún en plásmidos de especies de otro género perteneciente a la misma familia. Así, algunos plásmidos simbióticos (pSym) comparten una importante relación de secuencias con algunos plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta observación sugiere la presencia de eventos de transferencia y recombinación muy activos entre cepas de una misma y diferentes especies y géneros. Además, que se compartan secuencias relacionadas sugiere que algunas de esas secuencias son de importancia ya sea para la mejor adaptabilidad de las bacterias a un nicho dado, o como simples mediadores de eventos de recombinación que conducen a la generación de nuevas estructuras plasmídicas. Varios reportes recientes indican que las regiones de replicación de muchos de los plásmidos de rizobios están relacionadas con

secuencias de plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium* (Turner y Young, 1995; Young *et al.*, 1996). De acuerdo a esta analogía varios plásmidos de distintas especies bacterianas pueden todos agruparse dentro de una familia de elementos extracromosomales que comparten la región de replicación. Además de las evidencias de recombinación entre plásmidos mencionadas anteriormente, debe considerarse la posible existencia de recombinación de ADN de origen plasmídico con secuencias de ADN de localización cromosomal. Apoyan esta posibilidad la muy significativa cantidad (copias) de secuencias de inserción relacionadas en plásmidos y cromosomas de distintos rizobios (Kosier *et al.*, 1993; Soto *et al.*, 1992a, 1992b, Soto *et al.*, 1993).

4.1 Aislamiento de los plásmidos.

Los plásmidos grandes debido a su tamaño y a su frecuente bajo número de copias son más difíciles de aislar que los plásmidos pequeños utilizados como vectores de clonado. Varias técnicas diferentes han sido utilizadas para visualizar y aislar plásmidos de los miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Muchas de estas técnicas están basadas en usar condiciones de lisis alcalinas para desnaturalizar y eliminar el ADN cromosomal (Ledebner *et al.*, 1976; Casee *et al.*, 1979; Kado y Liu, 1981, Hirsch *et al.*, 1980). Todas estas técnicas usadas a escala preparativa resultan en el aislamiento de buenas cantidades de varios tipos de plásmido. Sin embargo para plásmidos mayores de 300 kb dichas metodologías resultan impracticables. Una técnica desarrollada por Schwinghamer (1980) permite obtener una preparación de megaplásmidos intactos (Burkhardt *et al.*, 1987). La técnica más conveniente para examinar plásmidos extremadamente grande es la desarrollada por Eckhardt (1978). Esta se basa en la lisis de las células dentro de las fosas del gel de agarosa (lisis *in situ*) dado que existe muy poco daño físico por estrés mecánico (por ej.: fuerzas de cizalla) los plásmidos son liberados intactos en el lisado, previo a su migración en el gel. Actualmente, existen varias modificaciones a la técnica original (Rosemberg *et al.*, 1981; Banfalvi *et al.*, 1981; Rosemberg *et al.*, 1982, Wheatcroft *et al.*, 1990). La utilización de las técnicas de lisis *in situ* permitió la visualización de replicones desde unas pocas kb hasta 3000 kb (los cromosomas de *S. meliloti* y *A. tumefaciens*) (Hynes y Finan, 1997). El desarrollo de estas técnicas permitió la identificación de los plásmidos y así poder avanzar en el estudio de las propiedades de los plásmidos.

4. 2 Los plásmidos simbióticos.

Los plásmidos simbióticos (pSym) son aquellos que contienen genes esenciales para el establecimiento de un estado simbiótico completo. Entre otros genes estos plásmidos codifican para los genes necesarios para la nodulación, genes *nod*; para la nitrogenasa , genes *nif*; para la fijación de nitrógeno, genes *fix*; para la síntesis de polisacáridos, genes *exo/lps* (Johnson *et al.*, 1978; Nuti *et al.*, 1979; Hirsch *et al.*, 1980; Banfalvi *et al.*, 1981; Rosemberg *et al.*, 1981; Hooykaas *et al.*, 1982; Huguet *et al.*, 1983; Finan *et al.*, 1986; Hynes *et al.*, 1986).

Además de los genes simbióticos, varios genes no simbióticos también están presentes en los pSym. Esto incluye un gran número de genes catabólicos (Finan *et al.*, 1988, Watson *et al.*, 1988), utilización de fosfonato (Bardin *et al.*, 1996), genes de producción de bacteriocinas (Hirsch *et al.*, 1980; Wijffelman *et al.*, 1983) genes para la producción de melanina (Lamb *et al.*, 1982; Hynes *et al.*, 1988, Mercado-Blanco *et al.*, 1993), etc. Plásmidos pSym fueron encontrados en diferentes especies de rizobios como *R. leguminosarum* bv *trifolii* (Thurman *et al.*, 1985; Harrison *et al.*, 1988); *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (Lamb *et al.*, 1982; Martínez *et al.*, 1987); *R. leguminosarum* bv *viciae* (Hirsch *et al.*, 1980; Buchanan-Wollaston *et al.*, 1980; Hombrecher *et al.*, 1981); *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Pardo *et al.*, 1994); *R. etli* (Quinto *et al.*, 1982; Segovia *et al.*, 1993); *S. fredii* (Masterson *et al.*, 1982; Prakash y Atheley, 1984); y *S. meliloti* (Banfalvi *et al.*, 1985) como las especies más caracterizadas. En las especies de *M. loti* y *B. japonicum*, los genes simbióticos se encuentran en el ADN cromosomal.

Sinorhizobium meliloti contiene dos megaplásmidos de aproximadamente 1400 y 1600 kb (Banfalvi *et al.*, 1985; Banfalvi *et al.*, 1981; Burkardt *et al.*, 1984; Burkardt *et al.*, 1987; Finan *et al.*, 1990; Hynes *et al.*, 1990; Hynes *et al.*, 1986; Sobral *et al.*, 1991), que han sido designados pSyma y pSymb. Colectivamente representan alrededor del 40% del genoma de *S. meliloti* (Honeycutt *et al.*, 1993; Sobral *et al.*, 1991). Aunque ambos pSym representan una porción sustancial del genoma, relativamente pocas funciones han sido adscriptas a estos replicones. El mayor de los megaplásmidos, pSymb, ha sido demostrado que porta los genes para la síntesis de exopolisacáridos (*exo*) y lipopolisacáridos (*lps*), biosíntesis de tiamina (*thi*), el transporte de fosfato de alta afinidad, y el transporte de ácidos dicarboxílicos (*dct*) (Bardin *et al.*, 1996; Charles *et al.*, 1991; Finan *et al.*, 1990; Glazebrook *et al.*, 1989; Hynes *et al.*, 1986, Watson *et al.*, 1988; Yarosh *et al.*, 1989). La construcción de un mapa genético facilitó la caracterización genética del pSymb, permitiendo la identificación y localización de varios loci catabólicos (Charles y Finan., 1990; Charles *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991). Los fenotipos adscriptos al pSyma están restringidos a una región que comprende menos de un tercio del plásmido y están involucrados en la nodulación y en la fijación de nitrógeno (Banfalvi *et al.*, 1981; Barnett *et al.*, 1997; Batut *et al.*, 1985; Boivin *et al.*, 1990; David *et al.*, 1988; Ogawa *et al.*, 1995; Renalier *et al.*, 1987; Rosenberg *et al.*, 1981). Hasta el momento la mayoría del pSyma continúa siendo considerada críptica. Recientemente se ha concluido el secuenciamiento completo del genoma de *S. meliloti* 2011, con lo que se dispondrá de la organización génica correspondiente a los tres replicones del rizobios (pSyma, pSymb, cromosoma). Oresnik *et al.*, (2000) reportaron el curado del megaplásmido pSyma en la cepa *S. meliloti* 2011. El procedimiento empleado fue de sucesivas rondas de selección para eventos de delección *in vivo*, a través de una estrategia de selección positiva de los clones que perdían la inserción Tn5B12-S que contiene el gene *sacB*.

En *R. etli* CFN42, además del plásmido **d**, que contiene los genes *nod* y *nif*, el plásmido **b** es requerido para la formación de nódulos en *Phaseolus vulgaris*, en parte debido a la presencia de los genes involucrados en la síntesis de lipopolisacárido (LPS) (Cava *et al.*, 1989; Brom *et al.*, 1992). Similarmente, en la cepa VF39 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* los genes

del LPS están localizados en el plásmido pRleVF39c, mientras los genes *nod* y *nif* están en el plásmido pRleVF39d (Hynes y Mcgregor, 1990).

La secuencia completa del plásmido simbiótico (536 kb) de la cepa de amplio rango de huésped *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997) revela un número de características interesantes. Por ejemplo el 18% del plásmido está conformado por secuencias similares a secuencias de inserción (IS), posibles integrones, y otras secuencias que de acuerdo a lo cambiante de su contenido GC sugieren un proceso evolutivo que resulta en una estructura mosaico (Hynes y Finan, 1997).

4. 3 Plásmidos no simbióticos.

Características estructurales. Los plásmidos no simbióticos (no-pSym) son aquellos que no son necesarios para el establecimiento de un estado simbiótico completo (Mercado-Blanco y Toro, 1996).

El tamaño de los plásmidos (crípticos) es muy variable. En estos plásmidos se han reportado la presencia de reiteraciones de distintos genes que incluyen a los *nod* y *nif* (Barran y Bromfield, 1988). En *R. meliloti* 1076, el plásmido pSv1 por ejemplo, muestra reiteraciones de los genes *nodB* y *nodC*, *nifE* y *nifB* (Rastogui *et al.*, 1991). La existencia de reiteraciones: en los plásmidos crípticos puede ser consecuencia de un evento de captura de porciones de pSyms y posterior transferencia a otras cepas a través de eventos de recombinación (Brom *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1991). Ha sido postulado que estas regiones pueden estar involucradas en la aparición de rearrreglos genéticos (Kaluza *et al.*, 1985; Hahn y Hennecke, 1987), que conducen ya sea a la presencia de secuencias iteradas, a la generación de deleciones, o a la propia cointegración de plásmidos.

Secuencias de inserción (IS). Las Secuencias Inserción (IS-*elements*) son pequeñas entidades móviles (tamaño < 2,5kb) de ADN que no contienen genes seleccionables y que codifican solamente las funciones para su transposición. Estos elementos IS están ampliamente distribuidos en muchas genomas de bacterias Gram negativas y positivas (Kleckner, 1981; Galas y Chandler, 1989; Murphy, 1989). En los rizobios en particular están presentes tanto en el cromosoma como en plásmidos ya sean simbióticos o crípticos. Se ha podido determinar que las cepas de *Sinorhizobium meliloti* son portadoras de numerosos elementos IS y que en ciertos casos más de 15 copias de la misma IS puede estar presente en el genoma (Simon *et al.*, 1991). Debido a que las IS se encuentran en número y localización variables las mismas pueden ser usadas como marcadores en la tipificación de bacterias. Así, las cepas pueden ser agrupadas de acuerdo a la presencia/ausencia de determinadas IS (*handprint*) (Kosier *et al.*, 1993), o al patrón de hibridación de una dada con el ADN genómico de la bacteria digerido con una enzima de restricción (IS-*fingerprint*) (Wheatcroft y Watson, 1988).

La presencia de elementos IS en plásmidos movilizables/conjugativos de rizobios es una posible causa de su amplia distribución en estas bacterias (Wheatcroft y Laberge, 1991; Soto *et al.*, 1992a, 1992b, Soto *et al.*, 1993). Además de su participación en potenciales eventos de

recombinación homóloga, su capacidad de transposición desde plásmidos a cromosomas y viceversa da lugar al posible intercambio de información genética entre los distintos replicones.

Características funcionales. Los plásmidos crípticos pueden codificar para funciones que le otorgan ventajas fenotípicas a las células rizobianas que lo portan. Poco se sabe del papel que juega este tipo de ADN, aunque en ciertos casos es posible combinar determinadas características con la presencia de un determinado plásmido. Asignar a un plásmido una o varias funciones importantes para la simbiosis o para el crecimiento en vida libre, no es siempre sencillo. Algunas características llevadas por los plásmidos fueron determinadas mediante ensayos de competición involucrando a la cepa salvaje y un derivado curado de plásmidos o pares de derivados curados (Mercado-Blanco y Toro, 1996). Estos ensayos pueden revelar características que de otro modo son difíciles de detectar.

Existen varios ejemplos indicando una ligación entre la presencia de un plásmido no simbiótico y cierta característica simbiótica:

- En la simbiosis de rizobios con *P. vulgaris* la competencia puede estar modulada por información presente en plásmidos no simbióticos (Martinez-Romero y Rosenblueth, 1990)
- Plásmidos no simbióticos grandes autotransmisibles están ligados a la síntesis de bacteriocinas y también influyen probablemente la competencia (Hirsch, 1979; Johnson *et al.*, 1982).
- Plásmidos no-pSym de *R. tropici* CFN299 estimulan la nodulación de transconjugantes de *A. tumefaciens* que llevan el plásmido simbiótico. De hecho, los transconjugantes nodulan mejor y fijan más nitrógeno cuando llevan todos los plásmidos del la cepa CFN299 que cuando sólo llevan el plásmido simbiótico (Martinez *et al.*, 1987).
- Brom *et al.* (1992) demostraron que en la cepa de *R. etli* CFN42, el plásmido *e* es requerido para la habilidad competitiva exhibida por la cepa salvaje.
- En la cepa de *S. meliloti* GR4 han sido descritos genes de plásmidos crípticos involucrados directamente en la eficiencia de la nodulación (Toro y Olivares, 1986). Esos genes están localizados en el plásmidos pSmeGR4b, y fueron llamados *nfe* (*nodule formation efficiency*) (Sanjuan y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993). Tres genes se han encontrado en la región *nfe* de la cepa *S. meliloti* GR4, *nfeA*, *nfeB* y *nfeD*. Sólo se ha encontrado similitud del producto codificado por *nfeD* con la ornitina ciclodeaminasa (ODCs) de *A. tumefaciens* (Soto *et al.*, 1993). Aunque las funciones de los genes *nfe* se mantienen desconocidas, la similitud con genes catabólicos como el *ocd* sugiere que podrían estar involucrados en el catabolismo de compuestos específicos, los que le darían una ventaja selectiva durante estadios tempranos de la simbiosis o en la competencia con otras cepas (Mercado-Blanco y Toro, 1996)
- Existen casos en que la eficiencia simbiótica se ve afectada negativamente por la presencia de plásmidos crípticos. Un ejemplo de ese fenómeno es el plásmido pRL3J1 que reduce la efectividad de la bacteria huésped (Dejong *et al.*, 1981). Similarmente, cepas de *R. loti* que han sido curadas de plásmidos muestran una mayor competitividad y eficiencia que sus correspondientes cepas tipo silvestres (Pankhurst *et al.*, 1986)

Se han descrito genes de plásmidos crípticos que confieren la habilidad de utilizar compuestos orgánicos particulares. Un ejemplo es el plásmido pSme41a de *S. meliloti* y su relación con el metabolismo de calisteginas (Tepfer *et al.*, 1988, Boivin *et al.* 1990). Baldani *et al.* (1992) estudiaron las alteraciones en la utilización de varios compuestos como fuentes de carbono después de haber curado diferentes cepas de *R. leguminosarum* bv. trifolii de plásmidos crípticos.

La habilidad para utilizar compuestos que se encuentran en la materia orgánica del suelo o en exudados radicales gracias a información codificada en plásmidos sugiere, que éstos podrían tener un rol importante en el ciclo de vida libre de los rizobios y permite especular sobre la manipulación de cepas con capacidad diferencial para colonizar determinados ambientes rizosféricos.

4. 4 Replicación y estabilidad de plásmidos de rizobios. Rango de hospedadores.

Es una idea muy generalizada que la estabilidad de plásmidos está muchas veces asociada a su condición de portadores de funciones importantes para la fisiología y la adaptabilidad de la célula huésped en este sentido. Aunque hasta el momento la mayoría de la información presente en los plásmidos de rizobios es de función desconocida, sabemos que estos replicones muestran un alto grado de estabilidad. La mayoría de los plásmidos de rizobios, tanto simbióticos como no simbióticos, son mantenidos en forma estable a lo largo de muchas generaciones sin que se detecte pérdida de los mismos, sugiriendo la existencia de mecanismos de mantenimiento muy precisos.

El rango de huésped de los plásmidos de distintos rizobios parece incluir a *Agrobacterium*. De hecho cepas de *Agrobacterium tumefaciens* libres de plásmidos han sido muy útiles para el estudio y manipulación de plásmidos de rizobios (Hynes *et al.*, 1985). Existen también evidencias que sugieren que los plásmidos de *Agrobacterium* pueden replicarse en rizobios (O'Connell *et al.*, 1987). Es interesante que tanto el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* como el plásmido pSym de *Rhizobium leguminosarum* son ambos capaces de replicarse en *Phyllobacterium* (van Veen *et al.*, 1988). Consistente con estas observaciones, se han reportado casos de incompatibilidad entre plásmidos de rizobios y *Agrobacterium* (Hynes *et al.*, 1985; O'Connell *et al.*, 1987). Muchos de estos plásmidos muestran orígenes de replicación relacionados (Turner y Young, 1995, Turner *et al.*, 1996). En general, los estudios de incompatibilidad de plásmidos presentan la dificultad que muchas de las cepas receptoras tienen varios plásmidos hecho que puede derivar en un rearrreglo de replicones más que en la eliminación de alguno de ellos.

Originalmente los plásmidos de bacterias fueron clasificados basándose en su grupo de incompatibilidad, característica esta que está asociada al mecanismo por el cual los plásmidos controlan el inicio de la replicación y herencia estable. Los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo de incompatibilidad comparten estos mecanismos y como consecuencia no pueden ser coheredados en forma estable. Esto es causado por dos características del mantenimiento de los plásmidos bacterianos: la selección al azar de las moléculas de plásmido

que se van a replicar y la distribución al azar en la partición. Este tipo de clasificación es útil desde un punto de vista práctico ya que en una cepa sólo pueden mantenerse plásmidos compatibles (de distinto grupo de incompatibilidad).

Varios orígenes de replicación plasmídicos han sido clonados incluyendo el origen de uno de los megaplásmido de *S. meliloti* 1021 (Margolin y Long, 1993), el origen de un plásmido críptico de *S. meliloti* GR4 (Mercado Blanco y Olivares, 1994a, 1994b), el origen de un plásmido de *Rhizobium* "hedysarum" (Mozo *et al.*, 1990), varios orígenes de *R. leguminosarum* (Turner y Young, 1995, Turner *et al.*, 1996), y el origen de replicación del plásmido simbiótico p42d de *R. etli* (Ramírez-Romero *et al.*, 1997). También varios orígenes de replicación plasmídicos fueron aislados de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* (Gallie *et al.*, 1984; 1985a; Gallie y Kado, 1988; Vilaine y Casse-Delbart 1987; Tabata *et al.*, 1989; Gerard *et al.*, 1992, Turner y Young, 1995, Turner *et al.*, 1996). Turner *et al.* (1996) han mostrado que genes que han sido denominados *repC* están conservados entre muchos plásmidos de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*. Secuencias con alta homología en este locus parecen correlacionar con fenómenos de incompatibilidad, mientras que secuencias más divergentes se encontraron en plásmidos que resultan compatibles. Rigottier-Gois *et al.* (1998) estudiaron los patrones de PCR-RFLP de cuatro clases de genes de *repC* a partir de aislamientos de *Rhizobium leguminosarum*. Los resultados sugieren que las cuatro clases son compatibles: cuando dos o más secuencias de *repC* estaban presentes en una cepa, las mismas estaban generalmente asociadas a distintos plásmidos. Estudios clásicos de incompatibilidad con un plásmido conteniendo un Tn5 marcado con las secuencias de *repC* del grupo IV demostraron que al ser transferido por conjugación a aislamientos de campo, este presentaba incompatibilidad con plásmidos del mismo grupo *repC* y era compatible con los plásmidos de los otros grupos (Rigottier-Gois *et al.*, 1998). El plásmido simbiótico de la cepa de *R. etli* CE3 pertenece a la familia de replicones RepABC, al igual que el pTiC58, el pTiB6S3 y el pTiSAKURA de *A. tumefaciens* (Li y Farrand, 2000; Suzuki *et al.*, 1998; Tabata *et al.*, 1989), el pRiA4b de *A. rhizogenes* (Nishiguchi *et al.*, 1987), el plásmido críptico pRL8JI de *R. leguminosarum* (Turner y Young, 1995), el plásmido simbiótico pNGR234 de la cepa *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997). Esta familia está caracterizada por la presencia de tres genes conservados *repA*, *repB* y *repC* codificados en la misma hebra de ADN. Una larga secuencia intergénica entre los genes *repB* y *repC* también se encuentra conservada entre los miembros de esta familia de replicones. Trabajando con el plásmido simbiótico de la cepa de *R. etli* CE3, Ramírez-Romero *et al.*, (2000) demostraron que: (i) los genes *repABC* están organizados en un operon; (ii) el producto de *repC* es esencial para la replicación; (iii) *RepA* y *RepB* participan en la segregación del plásmido y en la regulación de su número de copias; (iv) existen dos regiones de incompatibilidad actuando en *cis*; y (v) *RepA* es un factor de incompatibilidad actuando en *trans* sobre plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad. El plásmido pSmeGR4a pertenece a la familia RepC, que está relacionada con la anterior ya que comparten un alto grado de identidad de secuencia con el gen *repC*, pero los genes *repA* y *repB* no se encuentran presentes.

4.5 Transmisibilidad de los plásmidos de rizobios y su estudio.

Elementos genéticos transmisibles por conjugación han sido reportados en virtualmente todos los miembros de la familia Rhizobiaceae. Durante las décadas de 1970 y 1980 apareció un número significativo de trabajos en la literatura describiendo transmisiones conjugativas de plásmidos desde rizobios donadores a otros miembros de la familia *Rhizobiaceae* empleadas como receptoras. Sin embargo, sólo con algunas excepciones, la naturaleza del sistema conjugativo de estos plásmidos no ha sido investigado. Generalmente los plásmidos transmisibles coexisten en los rizobios con otros plásmidos, especialmente en aislamientos de suelos. En muchos casos estos plásmidos pueden formar cointegrados. Así, la transferencia de un dado plásmido puede deberse a autotransferencia, pero también puede resultar de la cointegración con otro plásmido autotransmisible (conducción), o a través de una movilización en *trans* por otro plásmido conjugativo residente en la bacteria donadora. Para discernir entre estas posibilidades es necesario analizar las características de transferencia del plásmido de interés a partir de una cepa que sólo contenga dicho plásmido (se podrá evaluar así si requiere o no de la presencia de un segundo plásmido para su transferencia). La falla en la transferencia debe considerarse con cautela. Por un lado ausencia de marcadores de selección fuertes puede hacer que las bajas frecuencias de conjugaciones sean a veces difíciles de detectar. Además, la expresión de genes del sistema transferencia conjugativo puede estar regulado y requerir de inductores no siempre presentes en condiciones de laboratorio (Li *et al.*, 1998; Moré *et al.*, 1998).

Tanto entre de los plásmido simbióticos como entre los crípticos es sabido que existen plásmidos transmisibles (Mercado-Blanco y Toro, 1996). La falta muchas veces de marcadores seleccionables para el seguimiento de la transferencia de estos plásmidos ha podido ser salvada mediante el uso de transposones para la marcación de los mismos. La inserción de transposones en distintos plásmidos ha permitido analizar sus características de transmisibilidad. Los plásmidos transmisibles han podido detectarse a partir de conjugaciones en masa en las que una biblioteca de mutantes por transposición se utilizó como potencial donadora. El análisis de transconjugantes portadores de la marca del transposon es necesario en una segunda etapa para determinar cual ha sido el plásmido transferido. Usando estas estrategias, se han identificado varios **plásmidos simbióticos** transmisibles por conjugación. Esto incluye el pRL1JI (Johnston, *et al.*, 1978) y el pRL5JI (Brewin *et al.*, 1980), ambos de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, y el pSym5 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hooykaas *et al.*, 1981). El plásmido simbiótico pRP2JI de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* también fue reportado como autotransmisible (Lamb *et al.*, 1982), aunque su retransferencia (*out-matings*) no ha sido confirmada desde donadores que no contienen otros sistemas conjugativos.

Una estrategia diferente para identificar funciones simbióticas presentes en plásmidos transmisibles ha sido la de utilizar a la planta huésped para la selección de transconjugantes. En esta aproximación una cepa Sym+ es utilizada como donadora y una Sym- como receptora. La conjugación entre las cepas es plaqueada en medios selectivos para la cepa receptora previo a la inoculación. Las colonias que aparezcan en las placas de selección son

Objetivos de este trabajo de tesis.

El uso de cepas inoculantes -tanto salvajes como recombinantes- requiere controlar la capacidad simbiótica de los rizobios así como los riesgos derivados de su liberación en suelos de cultivo (estudios de la evaluación de riesgos, *risk assesment*). Dicho control resulta más importante si se considera el creciente desarrollo y la aparición en el mercado de nuevas cepas recombinantes. En particular, prevenir la diseminación de información genética desde rizobios introducidos al suelo en forma masiva es importante para preservar la estructura genética de las poblaciones salvajes. Eventos de transferencia génica de alta frecuencia desde las cepas introducidas puede conducir a la aparición de nuevos genotipos bacterianos cuya dinámica poblacional y propiedades simbióticas a mediano y largo plazo son difíciles de predecir. En general, es deseable que las cepas utilizadas como inoculantes por sus propiedades simbióticas, se autolimiten a corto y mediano plazo para ayudar a la conservación de la biodiversidad natural. Sobre la misma base de conservación de genotipos naturales es que deben tratar de minimizarse los eventos de transferencia génica desde las bacterias que, útiles desde el punto de vista agropecuario, sean introducidas a campos de cultivo en forma masiva. Será por tanto importante el desarrollo de estudios de base que permitan a mediano plazo el desarrollo de herramientas genético-moleculares que permitan a mediano plazo mejorar el control de riesgo asociado a la transferencia de germoplasma desde rizobios inoculados.

Objetivo General.

- Caracterización funcional y molecular de sistemas genéticos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación en la bacteria fijadora de nitrógeno y simbiote de alfalfa, *Sinorhizobium meliloti*.

Objetivos específicos.

- Búsqueda y aislamiento de plásmidos crípticos movilizables en cepas locales de *S. meliloti*.
- Evaluación de la proporción de cepas de *S. meliloti* que son portadoras de plásmidos movilizables y/o autotransmisibles.
- Estudios de complementación funcional cruzada de funciones *helper* entre diferentes plásmidos crípticos (Fenómenos de re-movilización y retrotransferencia).
- Identificación y caracterización molecular de genes de movilización en plásmidos indígenas

CAPÍTULO II:

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las características más relevantes de las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en esta Tesis se describen en las Tablas II.1 y II.2. Los 65 aislamientos LPU (Universidad de La Plata) de *Sinorhizobium meliloti* fueron recuperados ya sea de nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*) colectados a campo, u obtenidos en ensayos de laboratorio empleando alfalfa CUF101 como planta trampa. Los 65 aislamientos LPU provienen de 25 suelos con pHs cercanos a la neutralidad, localizados mayoritariamente en la Provincia de Buenos Aires.

Todos los aislamientos fueron conservados individualmente mediante técnicas de criopreservación. Con los datos concernientes a la localización de los suelos, el origen de la cepa, el pH de la tierra se realizó una base de datos Microsoft Excel. Los 65 aislamientos provienen de 25 muestras de suelos de campos localizados fundamentalmente en la Provincia de Buenos Aires.

Tabla II.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el presente trabajo de tesis.

Cepas y Plásmidos	Características relevantes	Referencia
<u>Cepas</u>		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Res. Lab.
S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu- Km::Tn7 integrado en el cromosoma	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
<i>S. meliloti</i> 2011	Cepa salvaje, Nod ⁺ , Fix ⁺ , Sm ^r	J. Denarié
<i>S. meliloti</i> 2011 Sp ^r	mutante espontaneo	Mutante obtenido en nuestro laboratorio
<i>S. meliloti</i> GR4	cepa salvaje española	Toro y Olivares, 1986
<i>S. meliloti</i> GRM6	GR4 curada del plásmido pRmeGR4b	Mercado Blanco y Olivares 1993
<i>S. meliloti</i> LPU (número)	Cepas aisladas de suelos locales con pH entre 6,5 y 7,5	Colección de nuestro laboratorio (ver Tabla 2).
<i>S. meliloti</i> MVII-I	Sm ^r	Hynes <i>et al.</i> ; 1986
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	cepa silvestre	E. Martínez-Romero

(sigue)

Cepas y Plásmidos	Características relevantes	Referencia
<i>(continuación Tabla II.1.)</i>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>A.tumefaciens</i> UBAPF2	libre de plásmidos Rif ^r	Hynes <i>et al.</i> ; 1985
<u>Plásmidos</u>		
pSUP102 pSUP1021	mob ⁺ Tc ^r derivado de pACYC184, movilizable, llevando Tn5 inserto en el gen de resistencia a Cm	Pühler, A Simon <i>et al.</i> ; 1989
pSUP102-Cm::Tn5B13	derivado Tc-mob del pSUP102	Simon <i>et al.</i> , 1989
pRK2013	ColE1 replicón, tra ⁺ de RK2, Km ^r	Figurski y Helinski, 1979
pSM10	vector de integración de <i>S.</i> meliloti conteniendo la región recA-alaS	Pühler, A
pK18mob pGemT easy pJB3KmD pCW504	mob Km ^r Vector multicopia, Ap ^R InPα, mob Amp ^R Km ^R mob ⁺ Gn ^r derivado del pBBR1MCS-2	Schäfer <i>et al.</i> , 1994 Promega Blatny <i>et al.</i> , 1997 Weiss, A.
pMP1	pSUP102 conteniendo el fragmento <i>EcoR</i> I que contiene al Tn5 del plásmido pSmeLPU88b	esta Tesis
pMP2	pSUP102 conteniendo el fragmento <i>EcoR</i> I que contiene al Tn5b13 del plásmido pSmeLPU88a	esta Tesis
pMP3	pCW504 conteniendo el producto de amplificación generado con los cebabores PTG clonado en el sitio <i>EcoR</i> I	esta Tesis
pMP4	pSUP102 conteniendo el producto de amplificación generado con los cebabores rpt* clonado en el sitio <i>EcoR</i> I	esta Tesis

Tabla II.2. Cepas bacterianas de la colección de LPU de *Sinorhizobium meliloti* utilizadas en el presente trabajo de tesis.

Cepa	Suelo			Origen de los nódulos procesados
	No.	Procedencia	pH	
LPU5	36	Arrecifes-BsAs	6,47	campo
LPU6	40	Arrecifes-BsAs	6,59	campo
LPU9	24	Castelar-BsAs	6,60	campo
LPU15	35	Arrecifes-BsAs	5,98	campo
LPU23	14	Rafaela-Sta Fe	6,69	laboratorio
LPU24	14			laboratorio
LPU25	14			laboratorio
LPU26	14			laboratorio
LPU27	16	Rafaela-Sta Fe	7,95	laboratorio
LPU33	87	Arrecifes-BsAs	6,51	campo
LPU34	87			campo
LPU36	98	Arrecifes-BsAs	6,62	campo
LPU40	95	Arrecifes-BsAs	6,63	campo
LPU57	32	Arrecifes-BsAs	6,72	laboratorio
LPU58	32			laboratorio
LPU59	32			laboratorio
LPU68	33	Castelar-BsAs	7,10	laboratorio
LPU69	33			laboratorio
LPU70	33			laboratorio
LPU71	33			laboratorio
LPU85	24	Castelar-BsAs	6,60	laboratorio
LPU86	24			laboratorio
LPU87	24			laboratorio
LPU88	24			laboratorio
LPU110	38	Arrecifes-BsAs	6,68	laboratorio
LPU111	38			laboratorio
LPU112	38			laboratorio
LPU114	38			laboratorio
LPU115	39	Arrecifes-BsAs	6,64	laboratorio
LPU116	39			laboratorio
LPU117	39			laboratorio
LPU118	39			laboratorio
LPU119	39			laboratorio
LPU121	39			laboratorio
LPU122	40	Arrecifes-BsAs	6,59	laboratorio
LPU123	40			laboratorio
LPU125	40			laboratorio
LPU146	137	Arrecifes-BsAs	6,51	campo
LPU147	137			campo

(sigue)

Cepa (continuación Tabla II.2.)	Suelo			Origen de los nódulos procesados
	No.	Procedencia	pH	
LPU172	95	Arrecifes-BsAs	6,63	laboratorio
LPU177	98	Arrecifes-BsAs	6,62	laboratorio
LPU178	98			laboratorio
LPU179	98	Arrecifes-BsAs	6,62	laboratorio
LPU180	98			laboratorio
LPU 187	109	Arrecifes-BsAs	6,65	laboratorio
LPU188	109			laboratorio
LPU189	109			laboratorio
LPU190	111	Arrecifes-BsAs	6,82	laboratorio
LPU191	111			laboratorio
LPU193	111			laboratorio
LPU196	110	Arrecifes-BsAs	6,56	laboratorio
LPU198	87	Arrecifes-BsAs	6,51	laboratorio
LPU200	87			laboratorio
LPU201	87			laboratorio
LPU221	121	Junín-Nuequén	7,30	laboratorio
LPU222	121			laboratorio
LPU228	86	Arrecifes-BsAs	6,61	laboratorio
LPU241	125	Arrecifes-BsAs	8,08	laboratorio
LPU243	131	Arrecifes-BsAs	6,52	laboratorio
LPU244	132	Arrecifes-BsAs	6,49	laboratorio
LPU245	133	Arrecifes-BsAs	6,48	laboratorio
LPU256	146	Solís-BsAs	6,82	laboratorio
LPU257	148	Solís-BsAs	7,01	laboratorio
LPU258	148			laboratorio
LPU259	148			laboratorio

2. Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.

Medios de cultivo.

Los cultivos de las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY (Beringer, 1974) cuya composición es la siguiente:

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,7 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua (desionizada)	1000 ml

Para la preparación de medios sólidos se añadió agar al 1,5 %.

La esterilización se realizó durante 20 minutos a 120°C en autoclave.

El medio mínimo GTS (Putnoky *et al.*, 1990) fue utilizado para la selección de transconjugantes de *Sinorhizobium meliloti* cuando los mismos no se podían seleccionar por su resistencia a antibióticos (las cepas de *E. coli* que utilizamos en las conjugaciones son auxótrofas por lo que no desarrollan en medios mínimos). La composición del medio GTS es la siguiente:

NH ₄ Cl	1 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
NaCl	1 g
glucosa	2 g
Tris	3 g
Acido Succínico	1,18 g
Agua (desionizada)	1000 ml

El pH fue ajustado a 7,5 con HCl y el medio esterilizado luego en autoclave 20 minutos a 120°C. Se le agregó luego 1 ml/l de la siguiente solución de micronutrientes: H₃BO₃ 48 mM, MnSO₄ 10 mM, ZnSO₄ 1 mM, CuSO₄ 0,5 mM, Na₂MoO₄ 1mM, CoCl₂ 0,5 mM.

Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio Luria-Bertani (**LB**) (Sambrook *et al.*, 1989) cuya composición es la siguiente:

Glucosa	1g
NaCl	5g
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Agua (desionizada)	1000ml

Para preparar medio sólido se utilizó en todos los casos 15 g/l de agar.

El medio se esterilizó igualmente a 120°C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para el crecimiento de las cepas de *E. coli* fue 37°C.

Medios de conservación.

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

3. Antibióticos.

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada salvo para los casos de tetraciclina y rifampicina en que se usó etanol y metanol, respectivamente. Las

cepa movilizadora (*helper*) todas en su fase exponencial tardía de crecimiento (400 μ l de c/u). Esta mezcla fue centrifugada a 2.500 rpm 8 minutos y el sedimento bacteriano fue resuspendido en 100 μ l de medio líquido TY. La mezcla fue colocada sobre un filtro de nitrocelulosa (Millipore) estéril de 0,45 μ m de tamaño de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa conteniendo medio sólido TY. Las cajas fueron incubadas a 28°C por 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue resuspendida en medio líquido TY y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s). Se realizaron controles en los que la cepa donadora, receptora y la portadora del plásmido de ayuda pRK2013 se procesaron en forma independiente.

4.3. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E.coli*.

Se siguió la técnica de Wai Ling Tung y King Chuen Chow (1995). Se inocularon 500 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue incubado a 37°C y agitado vigorosamente hasta que la DO_{600nm} llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4000 g por 15 min a 4°C y se lavaron 2 veces con 200 ml de glicerol 10% a 4°C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de GYT helado (10% glicerol, 0,125% extracto de levadura y 0,25% triptona.) y se fraccionaron en alícuotas de 100 μ l.

Las electrotransformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 μ F, 200 Ω , 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 10mM SO_4Mg 10 mM $MgCl_2$), y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C para permitir que la información contenida en el ADN introducido se expresara. Luego de la incubación las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo e incubadas una noche a 37°C.

5. Técnicas de biología molecular.

5.1. Geles de lisis *in situ*.

Los perfiles de plásmidos fueron obtenidos por el método de lisis *in situ* de Wheatcroft *et al* (1990) previamente descrito. Las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido. Alícuotas de 1 ml de cultivos crecidos hasta una DO_{620nm} de 0,4 fueron centrifugadas y las células lavadas con 1 ml de solución 0,3% (P/V) de sarcosilato de sodio. Las células de cada muestra fueron centrifugadas nuevamente, resuspendidas en 15 μ l de solución de ficoll 20% (P/V), y mantenidas en agua hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis/separación (0,75 % de agarosa con buffer TBE (Tris 0,09M; ácido bórico 0,09M; EDTA 0,002M)). Previo a la siembra de las muestras en cada fosa del gel se introdujeron 25 μ l de una solución de SDS 10% (P/V) con xylen cyanol, y la electroforesis se corrió a polaridad invertida hasta que el frente retrocedió un centímetro. Se detuvo la corrida y se procedió a la siembra. Para ello se

agregaron 15µl de solución de lisis (sacarosa 8% ficoll2% Tris 50 mM EDTA 25 mM, RNAsa 0,4 mg/ml lisozima 1mg/ml) a cada una de las muestras, se mezclaron en forma suave e inmediatamente se sembraron 15µl de la mezcla por calle.

Se corrió a 30 V 30 min y luego a 110 V 2 h, luego se lavó con agua 30 min. y se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

5.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico capilar Idaho 1605 (Idaho Technology). La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 µg/ml albúmina bovina (BSA); 3 mM MgCl₂; 200 µM dNTPS; 2 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 µM de cada uno de los cebadores (*primers*) para PCR específicas. Los cebadores (*primers*) empleados están listados en la Tabla II.3..

Los cebadores fueron sintetizados por DNAgency (Malvern, PA, USA).

Tabla II.3. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en reacciones de PCR en este trabajo.

Denominación	Secuencia	Referencia
IS50 - directo	5'-GCTCGATCTAGAACGTTTCATGATAACTTCTGC-3'	esta Tesis
IS50 - reverso	5'-TCTGCGGACTGGCTTTCTAC-3'	esta Tesis
IS50seq	5'-TGGAAGATCAGATCCTGGAA-3'	esta Tesis
MBOREP1	5'-CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG-3	Versaslovic <i>et al</i> (1994)
<i>nptII</i> directo	5'-TGG GCA CAA CAG ACA ATC-3'	Dra Hozbor
<i>nptII</i> reverso	5'-CCC CTG ATG CTC TTC GT-3'	Dra Hozbor
rpt* directo	5'-TAG CTT CCG ACG GTA TTT CTC ATA -3'	esta Tesis
rpt* reverso	5'-AAA GTC GGT TCG CAT AGG TG-3'	esta Tesis
PTG - directo	5'-ATC ATC GAC GGT AGC AGT CC-3'	esta Tesis
PTG - reverso	5'-ATA AGG TCG GAC ACT TCG C-3'	esta Tesis

Finalizada la reacción de PCR, 10 µl del producto fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5% (P/V) conteniendo 0,5-1,0 µg/ml de bromuro de etidio. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado usando un cámara Polaroid o una cámara digital Kodak modelo DC 120 bajo iluminación ultravioleta.

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

a) para amplificaciones específicas sobre ADN genómico: Las células provenientes de cultivos líquidos o sólidos (10^8 - 10^9 ufc) fueron lavadas con NaCl 1 M y resuspendidas en 100 μ l agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 14000 g por 4 minutos y 5 μ l de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde. El remanente fue conservado a -20°C .

Alternativamente se realizaron preparaciones de ADN total de acuerdo a la metodología que se describe a continuación en la sección 5.4.

b) para la generación de "huellas digitales" a partir de ADN genómico: Se procedió de igual manera que en el punto anterior pero empleando las células presentes en 1 ml de un cultivo de $\text{DO}_{620\text{nm}}$ 0,4.

c) para la amplificación de secuencias específicas de ADN contenidas en plásmidos: Se cortaron las zonas de los geles de agarosa de lisis *in situ* que correspondían a la posición de bandas plasmídicas específicas. Los tacos de agarosa se fundieron luego por calentamiento en 500 μ l de agua destilada estéril y 10 μ l de la mezcla fueron usados como ADN molde. Cuando los plásmidos fueron de tamaño pequeño se realizaron minipreparaciones de los mismos según se indica en la sección 5.3. siguiente.

5.2.1. Amplificación de secuencias específicas.

La concentración de nucleótidos para las reacciones de PCR específica fue de 10 μM . Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 15 segundos; y 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, *annealing* a 53°C 10 segundos, y elongación a 72°C 20 segundos para los cebadores *nptII* y *rpt**, y 30 segundos para la IS50. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 20 segundos.

5.2.2. Generación de "huellas digitales" de ADN total por PCR.

Los cebadores MBOREP1 que se utilizaron para obtener los perfiles de "huella digital" corresponden a elementos repetidos diseminados a lo largo del genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1994; Tabla II.3.). Las amplificaciones se realizaron utilizando el siguiente esquema de ciclado térmico: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos; 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, *annealing* a 65°C 70 segundos, y elongación a 72°C 2 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 4 minutos.

5.3. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala ("minipreps").

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados ya sea por la técnica de lisis alcalina descrita por Maniatis *et al* (1982) o usando columnas comercializadas por Quiagen siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

5.4. Extracción de ADN total.

A partir de cultivos en fase exponencial tardía se centrifugaron 1,5 ml de durante 3 min. en un microtubo de polipropileno. Las células se lavaron luego con 200 µl de N-lauril sarcosina 0,1% (P/V) en TE y se centrifugaron. A continuación el sedimento se resuspendió en 300 µl de TE, se añadieron 100 µl de lisozima 1 mg/ml en sacarosa 20% (P/V), se incubó 1 hora a 37°C, y luego se agregaron 100 µl de pronasa (2,5 mg/ml en TE, predigerida a 37°C durante un mínimo de 90 minutos) y 100 µl de SDS al 5% (P/V) en TE. La suspensión que fue mezclada por inversión se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo, los restos celulares se precipitaron con 125 µl de una solución de NaCl 5M en TE previamente esterilizada en autoclave. La mezcla se incubó en hielo 30 minutos y se centrifugó. Posteriormente, a la solución de ADN se le añadió un volumen igual de fenol y se agitó durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 14000 g pasando a continuación la fase superior acuosa a un nuevo tubo donde se repitió la extracción con fenol. Recogida la fase acuosa se procedió a dos nuevas extracciones, la primera con fenol/cloroformo y la segunda con cloroformo. El ADN se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 100% frío (-20°C), incubando la mezcla a -20°C un mínimo de 2 horas, y centrifugando la misma 15 minutos a 14000 g. El precipitado obtenido se lavó con 0,5 ml de etanol al 70%, se secó al vacío durante 20-30 minutos y el ADN seco se resuspendió en 25-50 µl de TE al que se añadió 1 µl de una solución de RNAsa 1mg/ml (P/V).

5.5. Preparación de lisados celulares.

Los lisados celulares se prepararon según se detalla en los puntos 5.2.a y 5.2.b para la preparación de los ADNs molde para las reacciones de PCR.

5.6. Determinación de la concentración de ADN y oligonucleótidos.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989). La absorbancia de las soluciones de ADN en agua o en TE fueron medidas a 260 y 280 nm. Las concentraciones fueron estimadas considerando que una $DO_{260nm} = 1$ corresponde a las siguientes concentraciones: 50 µg/ml de ADN de cadena doble, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 µg/ml de oligonucleótidos. La relación DO_{260nm}/DO_{280nm} se utilizó como estimadora de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN de baja pureza o baja concentración se empleó preferencialmente el método de comparación de fluorescencias en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook *et al.* (1989).

5.7. Tratamientos enzimáticos del ADN.

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por las casas comerciales (Boehringer y Promega), y las recomendaciones descritas en Sambrook *et al.* (1989). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 μg de ADN, 0,1 volumen del buffer correspondiente suministrado por la casa comercial (diez veces concentrado) y 0,5-1 unidad de la enzima a utilizar en un volumen final de 10-25 μl . Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas por un período de tiempo mayor que 2 horas.

5.8. Electroforesis de ADN.

5.8.1. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2% P/V) fue realizada empleando TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2) como tampón de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 μl solución de ADN en agua o TE / μl solución de carga.

5.8.2. Revelado de geles y fotografía.

El agregado de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta de $\lambda = 260$ nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara Polaroid o con una cámara digital Kodak modelo DC 120 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

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

El tamaño de los fragmentos de restricción fue determinado por interpolación gráfica en curvas en las que fue representado el logaritmo del peso molecular de fragmentos de ADN de tamaño conocido frente a la movilidad de cada uno de esos fragmentos. Como patrones de peso molecular fueron utilizados ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII*, o bien ADN del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*.

5.9. Ensayos de hibridación (*Southern blot*).

El ADN resultante de la digestión con endonucleasas de restricción, fue separado por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0.8 % a 1-2 Volt/cm. Una vez finalizada la corrida se visualizó el ADN por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV. A continuación el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon (Nylon N - Hybond). La transferencia alcalina de ADN se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: en primer lugar se incubó el gel de agarosa durante 1 hora en una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M y NaCl 3,0 M). Luego el gel se lavó durante 15 minutos con la solución de transferencia (8 mM de NaOH y 3,0 M de NaCl, pH 11,4) y se colocó entre papeles absorbentes y sobre la membrana Hybond formando un puente de papel por el que circuló la solución de transferencia por capilaridad durante una hora (transferencia rápida). Transcurrido ese lapso de tiempo, la membrana se neutralizó con tampón fosfato a pH 6,8 (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0,2M de cada uno) por 10 minutos para provocar la renaturalización del ADN. Se la secó a 80°C y finalmente se fijó el ADN a la membrana mediante exposición a luz UV de $\lambda = 260$ nm durante 10 min.

Los filtros fueron prehibridados e hibridados en la misma mezcla (solución de prehibridación) excepto por la presencia de la sonda en esta última. Se utilizaron condiciones que favorecieron la hibridación de la sonda con regiones de ADN de alta similitud de secuencia [58°C, 5X SSC (SSC 1X: 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio)]. Los lavados del filtro posteriores a la hibridación consistieron en: dos lavados con 2xSSC - 0.1% (P/V) SDS a temperatura ambiente; dos lavados con 0,1xSSC - 0,1% SDS a 60°C (Boehringer Mannheim).

5.10. Construcción de sondas marcadas con digoxigenina (DIG) por PCR.

Las sondas de hibridación marcadas con DIG fueron preparadas por PCR empleando las condiciones de amplificación descritas en el punto 5.2.1. según correspondiera, pero empleando desoxiribonucleótidos (dNTPs) y digoxigenina-11-dUTP en las concentraciones indicadas en el producto DIG Nucleic Acid Kit de Boehringer Mannheim. Para eliminar nucleótidos libres (fríos y marcados) los productos de PCR fueron precipitados por agregado de 3 volúmenes de etanol 96% y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M, y centrifugación a 14000 g 10 minutos. El precipitado fue lavado finalmente con 100 μl de etanol 70%, centrifugado 5 minutos a 14000 g 10 minutos y resuspendido en 50 μl de agua. Cuando fue necesario, la sonda se conservó congelada a -20°C ya sea en agua o en solución bloqueante de hibridación.

5.11. Clonado de regiones de ADN rizobiano flanqueante al transposón Tn5.

ADN total (1-5 μg) de los mutantes Tn5 y Tn5B13 fue incubado con la enzima de restricción *EcoRI* en un volumen final de reacción de 50 μl (se ensayaron 5 μl de la mezcla de digestión en gel de agarosa 0.8%, con el fin de confirmar si la digestión fue completa). De la

misma manera se procedió para la digestión de los plásmidos pSUP102 (para el clonado de inserciones Tn5) y pK18mob (para el clonado de inserciones Tn5B13). A las mezclas de digestión, para eliminar la enzima, se les realizó una extracción con fenol/cloroformo (100 μ l de agua bidestilada estéril +100 μ l de fenol-cloroformo) y precipitación etanólica según se ha descrito en el punto anterior. El producto de la digestión se resuspendió en 20 μ l de agua desionizada estéril (4 μ l fueron analizados en un gel de agarosa 0,8%). Alternativo a este procedimiento hemos también inactivado la enzima *EcoRI* por calentamiento a 65°C 10 minutos con resultados similares.

La reacción de ligación de los fragmentos genómicos *EcoRI* con los vectores digeridos con la misma enzima fue realizada en un volumen final de 40 μ l con el tampón de ligación y 4U de T4 DNA ligasa (Promega). La mezcla de reacción se incubó 12 h a 16° C, se precipitó con etanol siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.10, y se resuspendió en 20 μ l de agua desionizada estéril. La mitad de la mezcla de ligación se usó para la transformación de células de *E.coli* DH5 α electrocompetentes.

5.12. Subclonado de los fragmentos de ADN rizobiano flanqueante al transposón Tn5B13.

Previo a la secuenciación de la región interrumpida por la inserción del transposon Tn5B13 se debió subclonar las regiones adyacentes a la inserción (por separado cada una de las regiones de unión entre el transposón y el ADN del rizobio). Para ello se digirió la región clonada con *EcoRI* y *BamHI* y se agregó en ensayos de ligación separados, el vector pUC18 previamente digerido ya sea con ambas enzimas o solamente con *BamHI*. Para recuperar uno de los extremos se seleccionó por la resistencia a Tc, ya que al digerir con *BamHI* la resistencia queda en uno de los extremos. Los vectores que ligaron el otro extremo del transposón con ADN del rizobio fueron reconocidos mediante una PCR para amplificar secuencias de la IS50. Esa PCR fue realizada sólo sobre aquellos clones que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa en medio LB con X-Gal, y sensibilidad a Tc.

5.13. Clonado de la secuencia codificante del gen *rpt1* de la cepa LPU88.

Para poder obtener un clon que contenga la secuencia completa del gen *rpt1* de la cepa LPU88, se utilizó la siguiente estrategia experimental. En primera instancia se amplificó, utilizando la técnica de PCR previamente detallada, un fragmento del gen *rpt* empleando los cebadores PTG. Dicho fragmento fue luego ligado al vector comercial pGem-T (Promega Corporation) diseñado para facilitar el clonado de productos de PCR. En la etapa siguiente la mezcla de ligación se usó para la transformación de células de *E.coli* DH5 α electrocompetentes. Las colonias que contenían el inserto de interés fueron seleccionadas según su resistencia a antibióticos (Ap). La presencia de inserto se evaluó por PCR (amplificación del fragmento) en aquellos clones candidatos que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa en medio LB con X-Gal.

El fragmento de PCR que contiene al gen *rpt1* clonado en el pGemT easy, se digirió con la enzima *EcoRI* y se lo ligó al plásmido pCW504 digerido con la misma enzima de restricción. Este plásmido recombinante denominado pMP3 se introdujo por electroporación en la cepa *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron las colonias de *E. coli* DH5 α que resultaron Gm resistentes y que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa en medio LB con X-Gal. Se corroboró la construcción por digestión con *EcoRI* y visualización del fragmento en un gel de agarosa.

5.14. Clonado de un fragmento interno del gen *rpt1* de la cepa LPU88.

Para poder obtener un clon que contenga una secuencia interna del gen *rpt* de la cepa LPU88 se utilizó la siguiente estrategia experimental. En primera instancia se amplificó, utilizando la técnica de PCR previamente detallada, un fragmento del gen *rpt* empleando los cebadores *rpt**. Luego dicho fragmento se ligó al vector comercial pGem-T (Promega Corporation). Del mismo modo que hemos descrito en el punto anterior, la mezcla de ligación se usó para la transformación de células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Las colonias que contenían el inserto de interés fueron seleccionadas según su resistencia a antibióticos (Ap). La presencia de inserto se evaluó por PCR (amplificación del fragmento) en aquellos clones candidatos que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa en medio LB con X-Gal.

5.15. Mutagénesis en sitios específicos.

El procedimiento empleado consiste básicamente en reemplazar en el genoma de la cepa salvaje por recombinación homóloga al segmento de ADN salvaje por el respectivo fragmento homólogo. Este procedimiento se llevó a cabo introduciendo por vía conjugativa el fragmento *EcoRI* del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 (descrito previamente su clonado) y el fragmento generado por la amplificación con los primers *rpt** en el plásmido suicida pSPU102, generando el plásmido designado pMP4.

En el clonado del fragmento de PCR, se aplicó el siguiente procedimiento: se digirió con la enzima *EcoRI*, tanto el plásmido pSUP102 como el pGemT easy que contiene al fragmento de PCR. Previa desnaturalización de la enzima por calor, se insertó por ligación el fragmento. Se seleccionaron las colonias de *E. coli* Dh5 α que resultaron Tc resistentes y Cm sensibles ya que el sitio *EcoRI* interrumpe dicho gen. Se corroboró la construcción por digestión con *EcoRI*

Una vez clonado el fragmento en el plásmido movilizable se interrumpió el gen por simple recombinación homóloga en la cepa salvaje por conjugación triparental.

5.16. Secuenciación de ADN.

El ADN fue secuenciado usando Taq FS DNA polimerasa y terminadores dideoxi fluorescentes en un método de secuenciamiento por ciclado, los fragmentos de ADN resultantes se corrieron en electroforesis y se analizaron usando un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystems 377).

6. Evaluación de diversidad.

La hoja de cálculo Excel (Microsoft) se utilizó para producir los 500 ordenamientos, calcular el índice de Shannon-Weiner y el índice de diversidad de Simpson con el estimador de Pielou para poblaciones finitas.

El índice de Shannon-Weiner $H = - \sum p_i \ln p_i$, donde p_i es la fracción de los i tipos en la población (Shannon y Weaver, 1949).

El índice de diversidad de Simpson con el estimador para poblaciones finitas de Pielou $1-D = 1 - \sum [n_i (n_i - 1) / N (N - 1)]$, donde n_i es el número de los i tipos y N es el número de tipos de la población (Pielou, 1969).

El índice de Shannon-Weiner calcula la incerteza de predecir el tipo de otro aislamiento de ese suelo, y el índice de Simpson de diversidad se basa en la probabilidad de tomar dos individuos diferentes. Ambos índices miden heterogeneidad por incorporación tanto de la riqueza como la distribución de tipos.

7. Ensayos con plantas.

7.1 Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa), ecotipo CUF 101 como planta huésped. Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2,5% de $HgCl_2$ durante 9 min., 30 seg. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente (5-6 veces) con H_2O estéril y se dejaron húmedas en reposo durante 2 h. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas de Petri con ágar-agua, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C hasta su germinación (24-48 h). Opcionalmente se pudo comprobar el grado de esterilidad extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28°C.

7.2. Condiciones de cultivo.

Todos los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

7.3. Cultivo axénico de plantas de alfalfa.

Cuando las plántulas alcanzaron una longitud de 1-2 cm, se introdujeron en condiciones asépticas en bolsas plásticas que contenían 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro, (cinéticas de nodulación /experimentos de competición). Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, las bolsas se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas. Alternativamente las plantas fueron crecidas en macetas con vermiculita y solución nutritiva.

Solución nutritiva.

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos de alfalfa se utilizó la solución mineral libre de nitrógeno descrita por Jensen (Jensen., 1942).

CaHPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,1 g
H ₂ O (desionizada)	1000 ml

El medio fue esterilizado en autoclave 20 minutos a 120°C. Se le agregó luego 1 ml/l de la siguiente solución de micronutrientes:(g/l): 3,73 KCl, 1,55 H₃BO₃, 0,85 MnSO₄.H₂O, 0,13 CuSO₄.5H₂O, 0,58 ZnSO₄.7H₂O, 0,018 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.H₂O.

Inoculación de los cultivos.

La inoculación de las plantas de alfalfa con los cultivos bacterianos se hizo tras 5 días de permanencia en la cámara de cultivo.

En el caso de las bolsas plásticas se inoculó 100 µl de suspensión bacteriana por planta en medio Fåhraeus (Fåhraeus, 1957) (las cuales contenían entre 10⁶ a 10⁷ ufc/ml). Se hicieron recuentos en placa de los inóculos preparando diluciones seriadas de los mismos.

7.4. Medida de la competitividad para la nodulación.

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo mediante identificación de cepas marcadas con diferentes resistencias a antibióticos.

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos en fase logarítmica tardía a los que se les estimó el número de bacterias por medida de D.O_{600nm}. Se tomó de cada cultivo un volumen adecuado que se diluyó en el medio mineral estéril para conseguir la densidad celular deseada

(10^6 - 10^7 ufc/ml, según el experimento).

La inoculación de las plantas se realizó con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de dos cepas en proporción 1:1 y la mezcla se utilizó para inocular un mínimo de 20 plantas. Se partió para esto de cultivos bacterianos que tenían aproximadamente la misma DO a 600 nm. Quince días después de la inoculación se cortaron las raíces noduladas y se esterilizaron superficialmente los nódulos.

Los patrones diferenciales de resistencia a antibióticos permitieron determinar la ocupación de cada una de las dos cepas inoculadas.

7.5. Reaislamiento de rizobios de los nódulos.

Los nódulos aparecidos en los experimentos de competitividad fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con H_2O_2 al 20% durante 10 min. Seguidamente se lavaron vigorosamente con agua estéril 5-6 veces y se trituraron individualmente, en condiciones asépticas, con una varilla de madera. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY con el/los antibiótico/s requeridos para la selección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III:

**Caracterización genotípica
de aislamientos locales de *S. meliloti*:
Evaluación de la diversidad genómica y
plasmídica.**

1. Construcción de una colección de aislamientos de *S. meliloti* como material de base para la búsqueda de plásmidos conjugativos.

En la primera parte de este Capítulo hemos enfocado la construcción de una colección de aislamientos de rizobios noduladores de alfalfa presentes en un conjunto de suelos locales. El objetivo a mediano plazo a partir de la disponibilidad de dicha colección ha estado dirigido a la identificación y caracterización de nuevos sistemas de movilización de ADN mediado por plásmidos conjugativos en la bacteria fijadora de nitrógeno (Capítulos IV-VI). Si bien existe abundante información sobre varios sistemas conjugativos en plásmidos de *E. coli* y en mucho menor número en otras bacterias gram positivas y gram negativas, en la familia *Rhizobiaceae* la caracterización ha sido incipiente y se ha centrado esencialmente en plásmidos de los patógenos de plantas *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rizogenes* (ver revisión, Farrand, 1997). Como he mencionado en la Introducción de esta tesis, se ha descrito que algunos de los megaplásmidos simbióticos de rizobios son conjugativos (sección I.4.5). Aunque ese no es el caso de los megaplásmidos de *S. meliloti*, sí se ha descrito en esta bacteria la presencia de plásmidos crípticos conjugativos (Mercado-Blanco y Olivares, 1993). Sin embargo, es muy escasa en general la información sobre abundancia, distribución, y compatibilidad de los plásmidos con carácter transferible en *S. meliloti* (y en rizobios en general), existiendo además sólo en unos pocos casos información genético-molecular de los sistemas de transferencia (Herrera-Cervera *et al.*, 1998, Mercado-Blanco y Toro, 1996). Paradójicamente, es muy abundante la evidencia que muestra la existencia de transferencia génica horizontal en rizobios. Recientemente se ha sugerido, por ejemplo, que la estructura de los genes de nodulación de *R. galegae* es el resultado de eventos pasados de transferencia génica desde bacterias donadoras hacia precursoras ancestrales de carácter patogénico vinculadas a *Agrobacterium* (Terefework Z *et al.*, 1998). La caracterización de sistemas de movilización en rizobios esperamos permita dimensionar con más precisión la significación de los eventos de transferencia génica horizontal en la generación de variabilidad y la adaptabilidad en estas bacterias simbióticas.

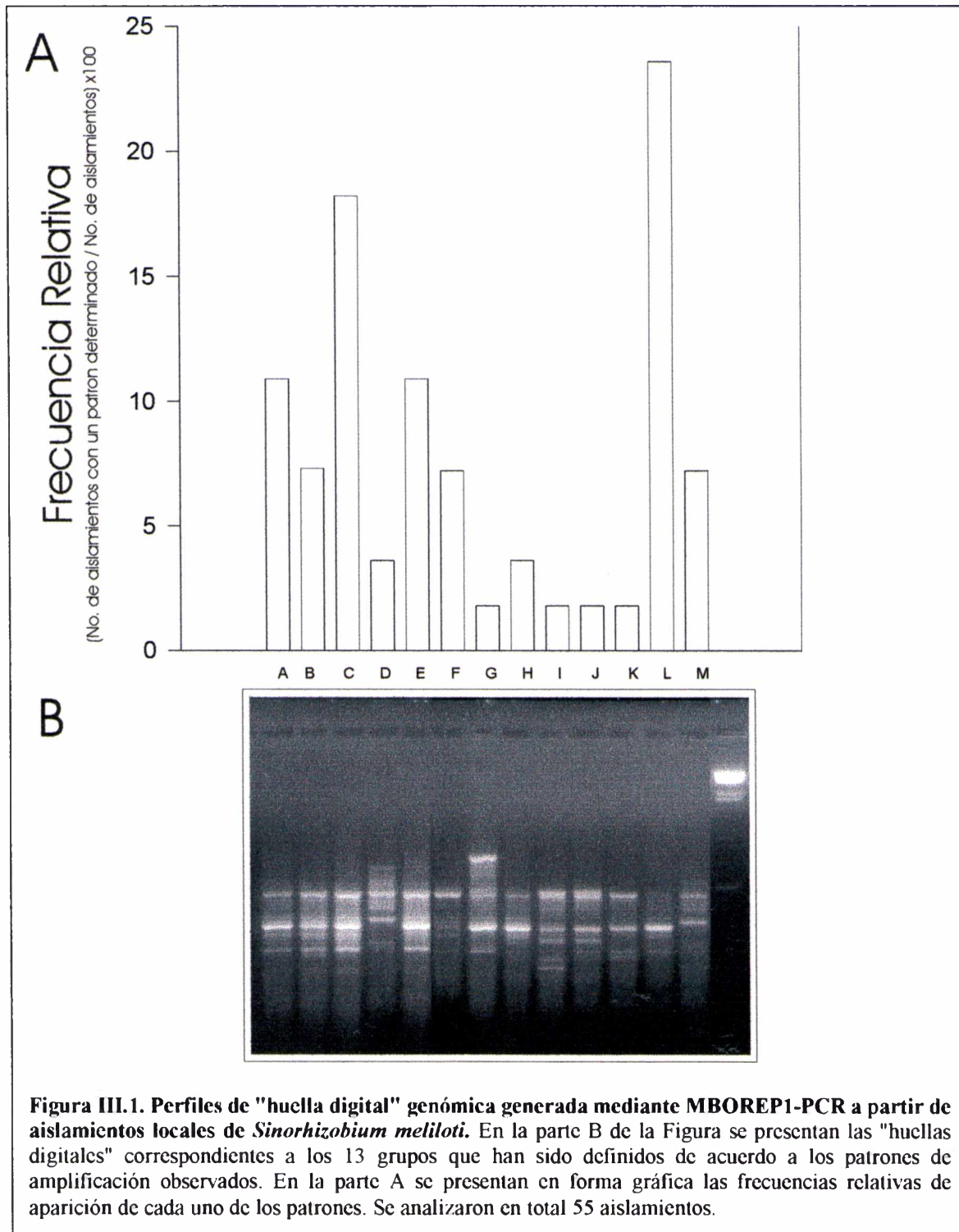
Por las razones expuestas en el párrafo precedente, y con el propósito de iniciar la búsqueda sistemática y caracterización de plásmidos transmisibles en *S. meliloti* simbiote de alfalfa, en este Capítulo se presenta el análisis genómico y de contenido plasmídico de una colección de 65 aislamientos recuperados de suelos locales. Empleando técnicas moleculares hemos: a) estimado la diversidad del germoplasma disponible, b) clasificado los aislamientos en base al contenido y tamaño de sus plásmidos, y c) analizado el grado de correlación entre las características genómicas y el tipo de plásmidos presentes. En nuestro caso, los aislamientos analizados fueron recuperados de varios suelos todos con pHs cercanos a la neutralidad (rango de pHs aprox. 6-8). El tipo de muestreos para recuperar rizobios que existen en la literatura son muy diferentes dependiendo esencialmente de la finalidad del estudio (análisis de diversidad local (Kosier *et al.*, 1993) o en varios sitios (Paffetti *et al.*, 1996), por ejemplo). Se encuentra en general mucha variación respecto de la cantidad y distancia relativa de los lugares muestreados, así como en el número de aislamientos

recuperados de cada sitio y totales. El objetivo de esta parte del trabajo fue la construcción de una colección de aislamientos que, siendo manejable y práctica desde el punto de vista experimental, tenga una buena representatividad de la diversidad presente en los suelos muestreados. La colección cuyas características de diversidad describo a continuación es la que hemos utilizado para el aislamiento y caracterización de plásmidos transmisibles por conjugación.

En caso que las cepas locales de *S. meliloti* posean plásmidos transmisibles es esperable que la probabilidad de encontrarlos aumente con el número de aislamientos que se analicen. Además, dado que de acuerdo a los datos de la literatura la diversidad de rizobios dentro de un mismo suelo puede ser muy variable (Kosier *et al.*, 1993; Louvrier *et al.*, 1996), nuestra elección fue la de construir la colección a partir de aislamientos que provengan de diferentes suelos para aumentar la probabilidad de coleccionar germoplasma (y plásmidos) diferente(s). En nuestro caso, los aislamientos de *S. meliloti* fueron recuperados de 25 suelos diferentes, pertenecientes en su mayoría a campos de las cercanías de la ciudad de Arrecifes, partido de Bartolomé Mitre. Los rizobios se aislaron a partir de nódulos radiculares de alfalfa colectados ya sea a campo, o en ensayos de nodulación en el laboratorio a partir de muestras de suelo. En el Capítulo II (Tabla II.2.) se presenta la denominación asignada a cada uno de los aislamientos obtenidos, el modo en que fueron aislados (a campo o en ensayos de laboratorio), y la localización geográfica del suelo de origen y el pH del mismo. Se obtuvieron en total 65 aislamientos (1-6 aislamientos / suelo) la mayoría de los cuales fueron recuperados en los ensayos de nodulación en el laboratorio (85%). Todos los aislamientos presentados en la Tabla II.2. fueron re-confirmados en su capacidad para nodular alfalfa. Además, dado que en suelos de la región central de Argentina existen cepas de rizobios noduladores de alfalfa distintos de *S. meliloti* y genéticamente relacionadas a la cepa *Rhizobium* spp. Or191 (Del Papa *et al.*, 1999; Eardly *et al.*, 1992) evaluamos si alguno de los aislamientos correspondía a este último tipo de rizobios. Los 65 aislamientos fueron capaces de crecer en medio LB a 37 °C, condición en la que solamente desarrollan los aislamientos de *S. meliloti*, y no los de tipo Or191. En la sección siguiente presentaré la evaluación de diversidad genotípica presente en esta colección.

2. Caracterización genómica de los aislamientos de *S. meliloti*.

La diversidad genómica de los aislamientos fue analizada mediante técnicas de "huella digital" (*fingerprint*) de ADN empleando la metodología de MBOREP1 (Capítulo II, sección 5.2.2). Dicha metodología consiste en la amplificación por PCR de secuencias de ADN genómicas empleando cebadores correspondientes a secuencias conservadas en los genomas de bacterias (de Bruijn, 1992, Versalovic *et al.*, 1994). La Figura III.1.B. muestra los distintos patrones de amplificación de ADN representativos de los diferentes aislamientos de la colección. Los mismos fueron clasificados de acuerdo a sus patrones de amplificación en 13 grupos distintos, donde el patrón más frecuente (línea L) está representado por 13 aislamientos (23%). La Figura III.1.A. muestra las frecuencias correspondientes a cada uno de

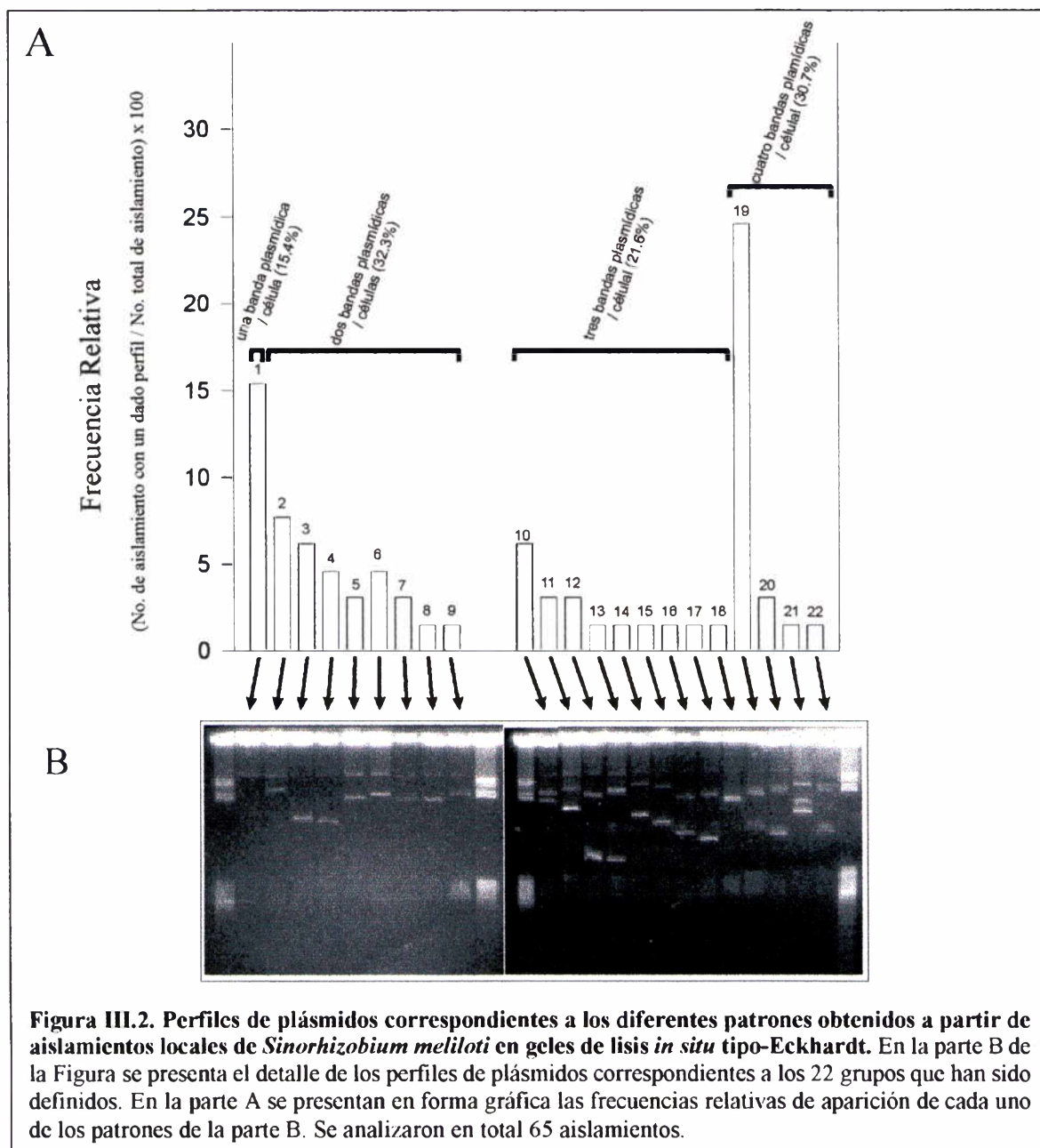


los 13 grupos establecidos. La asignación de los aislamientos a cada uno de los grupos se realizó por comparación visual de todos los patrones obtenidos considerando sólo los productos de amplificación (amplicones) de mayor intensidad y los de intensidad intermedia. No hemos realizado análisis de relaciones filogenéticas entre los aislamientos dado que sólo se intentó estimar la diversidad a través del número de patrones de amplificación diferentes cuyo análisis a través de índices numéricos se presenta en la sección III.4. siguiente. La caracterización genómica que se resume en la Figura III.1. nos ha permitido establecer la presencia de 13 patrones diferentes con una metodología ya utilizada para la caracterización

genómica de otras bacterias (Versalovic *et al.*, 1994). Hemos considerado cepas diferentes a todos aquellos aislamientos en los que puede ponerse en evidencia al menos una característica geno- / fenotípica diferencial.

3. Análisis del contenido de plásmidos en la colección de aislamientos locales de *S. meliloti*.

Para avanzar en la caracterización genotípica de las cepas, cada aislamiento fue examinado en su perfil plasmídico por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa (Capítulo II, sección 5.1). Dicha metodología que minimiza la ruptura mecánica de los plásmidos permite la visualización de replicones de gran tamaño y bajo número de copias. Los diferentes tipos de perfiles plasmídicos que hemos obtenido para nuestros aislamientos se presentan en la Figura III.2.B. Según se muestra, los aislamientos fueron clasificados en 22 grupos



diferentes de acuerdo al número y tamaño de las bandas plasmídicas observadas (tipo de perfil). Empleando cepas previamente caracterizadas (Hynes *et al.*, 1986) hemos podido determinar que el rango de tamaño de los replicones plasmídicos de nuestra colección varía aproximadamente entre 22 - 1600 kb. Puede observarse por otra parte que la mayoría de los aislamientos (85%) presenta más de una banda plasmídicas, teniendo 4 bandas el patrón más frecuente (25 % de los aislamientos, *patrón 19*). La Figura III.2.A. muestra las frecuencias correspondientes a cada uno de los 22 patrones de bandas observados. Cabe destacar que en las condiciones experimentales utilizadas los megaplásmidos simbióticos, pSyma y pSymb no fueron resueltos por lo que se observaron como una única banda. En el caso de los plásmidos crípticos no puede descartarse que una única banda pueda corresponder a la presencia de más de más plásmido con la misma movilidad electroforética. Asimismo, aunque en el caso de plásmidos de gran tamaño no es común ver distintas formas superenrolladas de un mismo plásmido (topoisómeros), tal posibilidad no debe ser descartada (ver resultados del Capítulo V sección 4, referidos a pérdida de plásmidos por incompatibilidad). Por tanto, el número de bandas que hemos observado en cada una de las cepas debe ser considerado con reserva si se desea determinar en forma fehaciente el número real de replicones plasmídicos presentes.

4. Estimación de la diversidad genética de los aislamientos a través de parámetros numéricos. (Co-)Relación entre los genotipos de "huella digital" y los perfiles de plásmidos.

En las secciones precedentes hemos puesto de manifiesto una marcada diversidad genómica entre los aislamientos estudiados mediante las técnicas de MBOREP1-PCR y análisis de perfiles plasmídicos. En esta sección, mostraré el modo en que hemos analizado esta diversidad genética mediante parámetros cuantitativos, y en la sección siguiente cómo hemos explorado si el conjunto de cepas con el que trabajamos es representativo de la diversidad global presente en los suelos de los que se han extraído los rizobios.

La estimación numérica de la diversidad genética presente en una población puede realizarse empleando diferentes modelos y estimadores matemáticos que ya han sido usados por otros autores (Coutinho *et al.*, 1999, Palmer y Young, 2000). En todos los casos la información de base corresponde al número y/o distribución de genotipos existentes dentro de la población que se analiza. Los distintos genotipos presentes en la población que se analizan deben clasificarse en categorías que representan en sí las unidades taxonómicas de trabajo (OTUs, *operative taxonomic units*) (Coutinho *et al.*, 1999). En nuestro caso, las unidades taxonómicas corresponden ya sea a los grupos de "huella digital" genómica o a los de perfiles plasmídicos que hemos establecido en las secciones anteriores (Figuras III.2. y III.3.). A partir del agrupamiento de aislamientos en las distintas OTUs pueden calcularse diferentes índices numéricos a modo de estimadores de la diversidad genética de la población bajo análisis. Uno de esos indicadores corresponde al índice de Shannon-Weaver (1949) (Materiales y Métodos, sección II.7.) que estima la incerteza de predecir la OTU particular (perfil de plásmidos,

fingerprint, etc) a la que correspondería un nuevo aislamiento que sea extraído de la población:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad \text{donde } p_i = \text{proporción de la OTU}_i \text{ en la población analizada.}$$

Otro indicador corresponde al índice de diversidad de Simpson con el estimador de Pielou (Pielou, 1969) para poblaciones finitas que corresponde a la probabilidad de tomar dos aislamientos nuevos diferentes a partir de la población en estudio:

$$(1 - D) = 1 - \sum [n_i(n_i-1) / N \times (N-1)] \quad \text{donde } n_i = N_0 \text{ de aislamientos de la OTU}_i \\ N = N_0 \text{ de aislamientos de la población}$$

Ambos índices miden de diferente modo la heterogeneidad poblacional por incorporación de la riqueza y la distribución de tipos (OTUs). De ambos índices, sin embargo, el de Simpson refleja mejor las diferencias entre las OTUs dominantes. Considerando la distribución de nuestros aislamientos en los diferentes grupos de "huella digital" y perfiles plasmídicos (OTUs) hemos calculado los índices de Shannon y Simpson que presentamos en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Índices de diversidad de Shannon y Simpson calculados en base a la distribución de aislamientos de *S. meliloti* entre los diferentes tipos de "huella digital" genómica y perfiles plasmídicos definidos en este estudio.

Criterio usado para la generación de las OTUs ^a	Nº. de OTUs (tipos)	Índice de diversidad	
		Shannon (H')	Simpson (1-D) ^b
Perfiles de plásmidos	18	2,39	0,89
"huella digital" genómica	13	2,24	0,88
Perfiles de plásmidos + "huella digital" genómica (ambos caracteres) ^c	33	3,28	0,97

^a Unidad taxonómica de trabajo, ver texto.

^b Los valores en azul tienen diferencias significativas con el valor en rojo en una prueba *t* con nivel de significación del 5%. El cálculo de la desviación estandar de cada uno de los índice se dedujo de la siguiente ecuación $\sigma = (4/N (\sum_i p_i^3 - c^2))^{1/2}$.

^c Se considera que dos aislamientos pertenecen a una OTU diferente cuando difieren ya sea en uno u otro carácter genotípico, o en ambos.

Palmer y Young (2000) han usado previamente el índice de Shannon para la caracterización de poblaciones de *R. leguminosarum* de distintos orígenes empleando marcadores genéticos cromosomales y plasmídicos. Mientras a nivel cromosomal analizaron secuencias de ADN espaciadoras del transcritto que se genera entre los genes ribosomales 16S y 23S (ITS), a nivel plasmídico analizaron secuencias de los genes *repC* pertenecientes a las replicasas (cada una de las secuencias corresponde a plásmidos de un grupo de

incompatibilidad diferente, ver Introducción, sección I.4.4.). Los valores obtenidos de la aplicación del índice de Shannon a las OTUs definidas a través de las diferentes ITS y genes *repC* variaron entre 3,46-0,28 y 2,29-0,14, respectivamente, dependiendo de la población analizada. Los índices de Shannon que presentamos en la Tabla III.1. tienen valores intermedios a los calculados para las poblaciones de Palmer y Young (2000) para las que las OTUs fueron generadas con parámetros genotípicos diferentes a los empleados en este trabajo.

De acuerdo a lo que hemos presentado en la sección 2 precedente y en acuerdo con resultados publicados por otros autores con distintas bacterias, es común poner en evidencia una abundante diversidad genotípica en aislamientos de una misma especie cuando se emplean como herramientas de comparación genómica técnicas de "huella digital" por PCR (Aguilar *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001). Como puede verse en la Tabla III.1., en *S. meliloti* hemos obtenido índices de diversidad del mismo orden cuando la generación de las unidades taxonómicas (OTUs) fueron realizadas ya sea a partir de "huellas digitales" por PCR, o mediante el empleo de perfiles plasmídicos. Esta consideración parece no estar restringida además a la población de rizobios que hemos analizado aquí: resultados publicados por Kosier *et al.* (1993) en los que se reportan las frecuencias de distintos perfiles de plásmidos para aislamientos de *S. meliloti* de suelos alemanes permiten inferir un índice de Shannon de 2,52 que es cercano a los que aquí hemos calculado. Otra observación interesante que se desprende de la Tabla III.1. es que el índice de Shannon calculado a partir de cada uno de los tipos de OTU es menor que el que resulta cuando para generar las OTUs se tienen en cuenta ambos criterios **simultáneamente** "huella digital" y perfil plasmídico. Esto es cuando se considera que dos aislamientos pertenecen a una OTU diferente cuando difieren ya sea en uno u otro carácter genotípico, o en ambos (Tabla III.1., línea 3). Como se indica al pie de la Tabla III.1. las diferencias entre los índices de Simpson de las líneas 1 y 2 (azul) con el de la línea 3 resultan estadísticamente significativas al nivel de 5% (prueba *t*). Este aumento significativo en el índice de Shannon indica **independencia** entre los caracteres utilizados para la generación de las OTUs: perfiles de plásmidos y "huella digital". Esto se observa claramente también en la Tabla III.2. donde no existen relaciones unívocas entre los patrones de "huella digital" genómica y los perfiles de plásmidos. Teniendo en cuenta que la parte más significativa de los amplicones generados en la huella digital se originan posiblemente en secuencias cromosomales y megapasmídicas que cuantitativamente representan la mayoría del genoma (no movilizables espontáneamente con frecuencias detectables en *S. meliloti*), la falta de ligación plásmido - "huella digital" observada puede bien estar ligada al carácter movilizable de los replicones crípticos. Como hemos mencionado en la Introducción de esta tesis es bien conocida la presencia de plásmidos movilizables y autotransmisibles en *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Kinkle *et al.*, 1991; Rao *et al.* 1994; Mercado-Blanco y Toro 1996). En cualquier caso, la falta de correlación entre el contenido plasmídico y el genotipo de "huella digital" de la bacteria es consecuencia seguramente de varios tipos de eventos incluyendo la movilización conjugativa de replicones, la captación y recombinación de DNA

Tabla III.2. Número de aislamientos correspondientes a las diferentes combinaciones de patrón de MBOREPI-perfil plasmídico.

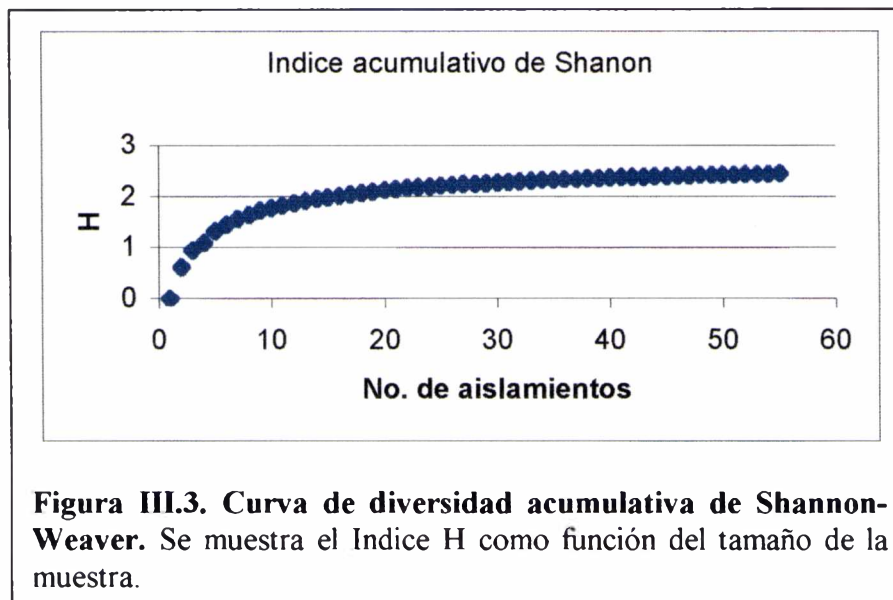
		Grupos de "huella digital" genómica												
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Grupos de plásmidos	1	2								1	1	1	2	
	2				2	1								2
	3					1		1	1				1	
	4												3	
	5												1	
	6					1	2							
	7													1
	8						1							
	9												3	
	10												1	1
	11	1					1							
	12								1					
	13	1												
	14					1								
	15					1								
	16	2	4	8									2	
	17			2										
	18					1								

vía transducción/transformación, y la generación de nuevas estructuras plasmídicas y cromosomales mediada por la presencia de elementos transponibles, entre otros.

Sobre la base de estas evidencias, en el Capítulo siguiente presentaré en detalle la estrategia que he empleado para la búsqueda e identificación de nuevos plásmidos transmisibles en nuestra colección de aislamientos.

5. La colección de aislamientos como parte del germoplasma presente de los suelos muestreados.

Para evaluar si el valor del índice de Shannon que hemos obtenido está subestimado o es representativo del índice poblacional de los suelos muestreados realizamos un análisis similar al presentado por Coutinho *et al* (1999) (Figura III.3.). Dicho análisis consistió en evaluar el valor promedio del índice de Shannon (H'_{medio} , coordenada y) calculado a partir de conjuntos de un número definido de aislamientos (n) tomados al azar de entre los 55 miembros de la colección (coordenada x). Cada H'_{medio} de la Figura III.3. fue calculado a partir de 500 muestreos de n aislamientos tomados al azar de entre los 55 aislamientos totales. La aleatorización para la toma de aislamientos y el posterior cálculo de los valores de H'_{medio} fueron realizados empleando una planilla Microsoft Excel diseñada a tal efecto. Hemos



observado que los valores de H'_{medio} calculados para $n > 49$ se estabilizan y no tienen diferencias estadísticamente significativa al nivel de 5% (prueba t). Esa estabilización sugirió que el tamaño de la muestra analizada es adecuado para estimar la diversidad existente a través del índice de Shannon. Dicho de otro modo, el conjunto de aislamientos representa aceptablemente la diversidad de *S. meliloti* en los suelos que fueron muestreados. Presentaré entonces en el Capítulo siguiente la búsqueda y análisis de plásmidos crípticos transmisibles en la colección que aquí hemos caracterizado.

CAPÍTULO IV:

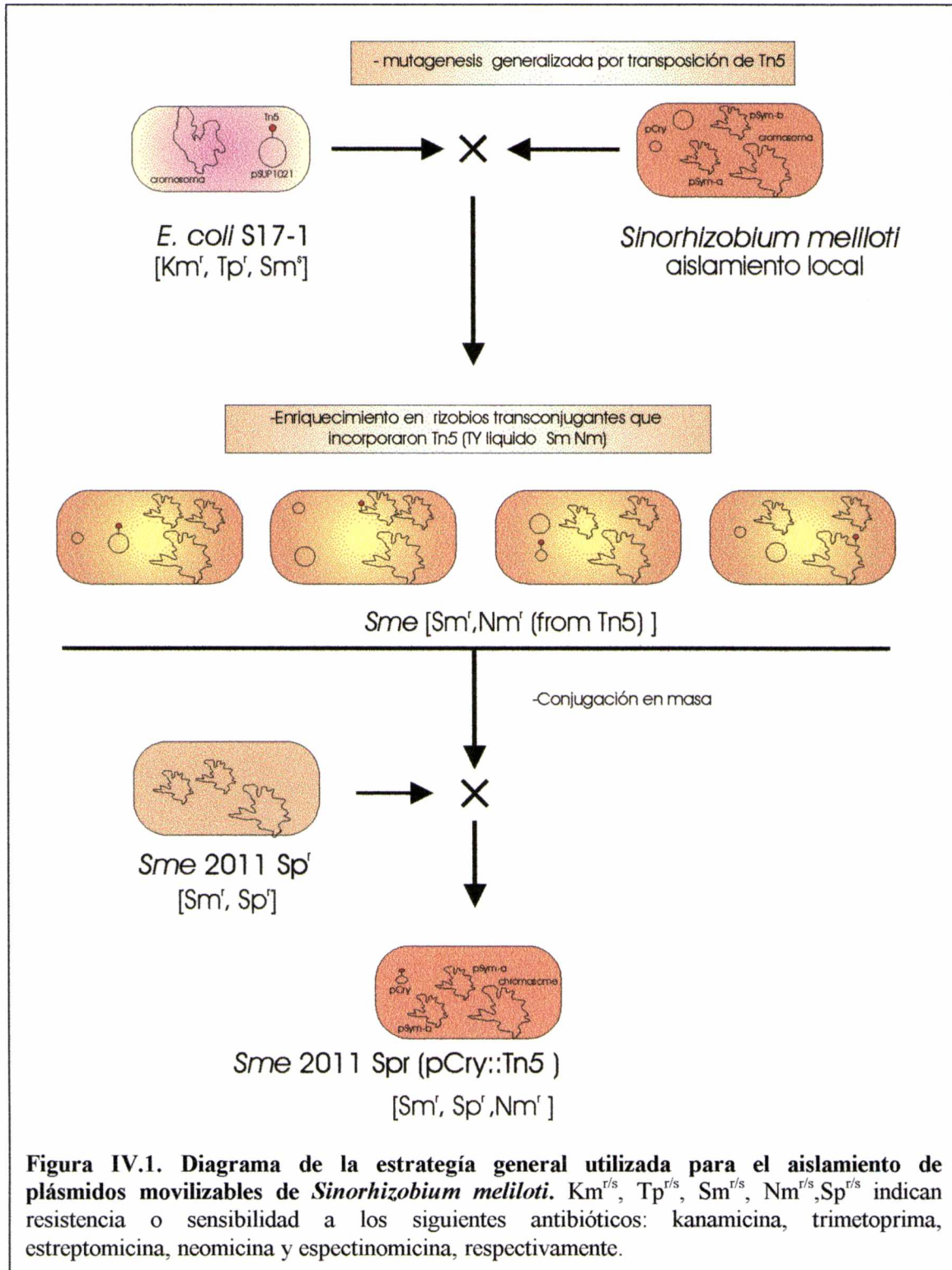
Identificación, aislamiento y caracterización funcional de un plásmido transmisible por conjugación a partir de uno de los aislamientos locales de *Sinorhizobium meliloti*.

1. Transferencia conjugativa de material genético entre rizobios. Plásmidos crípticos de *S. meliloti* como mediadores de transferencia génica horizontal.

La transferencia horizontal de material genético entre bacterias es considerada como una de las principales fuerzas directoras que, asociada a procesos de recombinación y transposición, gobiernan la evolución de las estructuras genómicas procariontas (Davison, 1999; Arber, 2000). Impulsado por este tipo de consideraciones, se ha prestado especial atención a la transferencia de material genético entre bacterias por movilización de plásmidos conjugativos (Kinkle *et al.*, 1993). Como hemos mencionado ya en la Introducción de esta tesis (sección I.2.), la conjugación es considerada como uno de los mecanismos más eficientes de intercambio de ADN entre bacterias. En general, la transmisibilidad de los plásmidos tiene en distintos sistemas un rol importante en la dispersión de características muy diversas entre cepas de una misma especie, y aun entre bacterias de especies diferentes (de la Cruz y Davies, 2000). La presencia de plásmidos con distintas características, algunos de ellos movilizables, es un hecho muy frecuente en diferentes especies de rizobios (Hooykaas *et al.* 1982; Kondorisi *et al.*, 1982; Truchet *et al.*, 1984; Hooykaas *et al.*, 1985). En *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii, por ejemplo, ha sido comprobado en condiciones de laboratorio el carácter autotransmisible del megaplásmido simbiótico (Rao *et al.*, 1994). En relación a ello, sin embargo, Wernegreen *et al.* (1997) han cuestionado la posibilidad de que exista transferencia de megaplásmidos simbióticos en condiciones naturales. En el caso de *Sinorhizobium* que posee dos plásmidos simbióticos, pSyma y pSymb, ninguno de ellos ha sido movilizado espontáneamente en condiciones de laboratorio (Pretorius-Güth *et al.*, 1990). La introducción de genes *mob* (movilización) del plásmido RP4 en el pSyma permitió sin embargo su transferencia conjugativa a cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (Hynes *et al.*, 1984). En *S. meliloti* como ocurre en otros rizobios, además de los megaplásmidos simbióticos ha sido observada la presencia de plásmidos crípticos cuyo peso molecular varía entre 20-1000 kb. Lamentablemente, sólo unas pocas funciones han sido asociadas hasta el momento a la presencia de dichos plásmidos crípticos que han sido poco caracterizados (Mercado-Blanco y Toro, 1996). Los plásmidos de la cepa *S. meliloti* GR4 han sido probablemente los más caracterizados hasta el momento (Mercado-Blanco y Toro, 1996). En dicha cepa se ha descrito la presencia de genes asociados a la competitividad para la nodulación (*nodule formation efficiency, nfe*) en el plásmido críptico pRmeGR4b (Sanjuan y Olivares 1989; Soto *et al.*, 1993). Dicho plásmido es movilizable por conjugación siempre que esté presente el plásmido acompañante pRmeGR4a, autotransmisible. Evidencia como las que mencionado en los párrafos precedentes respecto de la movilidad de plásmidos simbióticos y crípticos dan sustento a la posibilidad de que en condiciones naturales exista una activa transferencia de genes a través de la movilización de elementos extracromosomales. Esta observación es compatible además con la generación de una marcada diversidad plasmídica no ligada necesariamente al genotipo global de la bacteria como hemos observado en el capítulo precedente. En este marco y teniendo en cuenta la diversidad de plásmidos dentro de nuestra colección de aislamientos de *S. meliloti*, en este Capítulo presentaré resultados referidos a identificación y caracterización funcional de un plásmido transmisible recuperado de uno de nuestros aislamientos de *S. meliloti*.

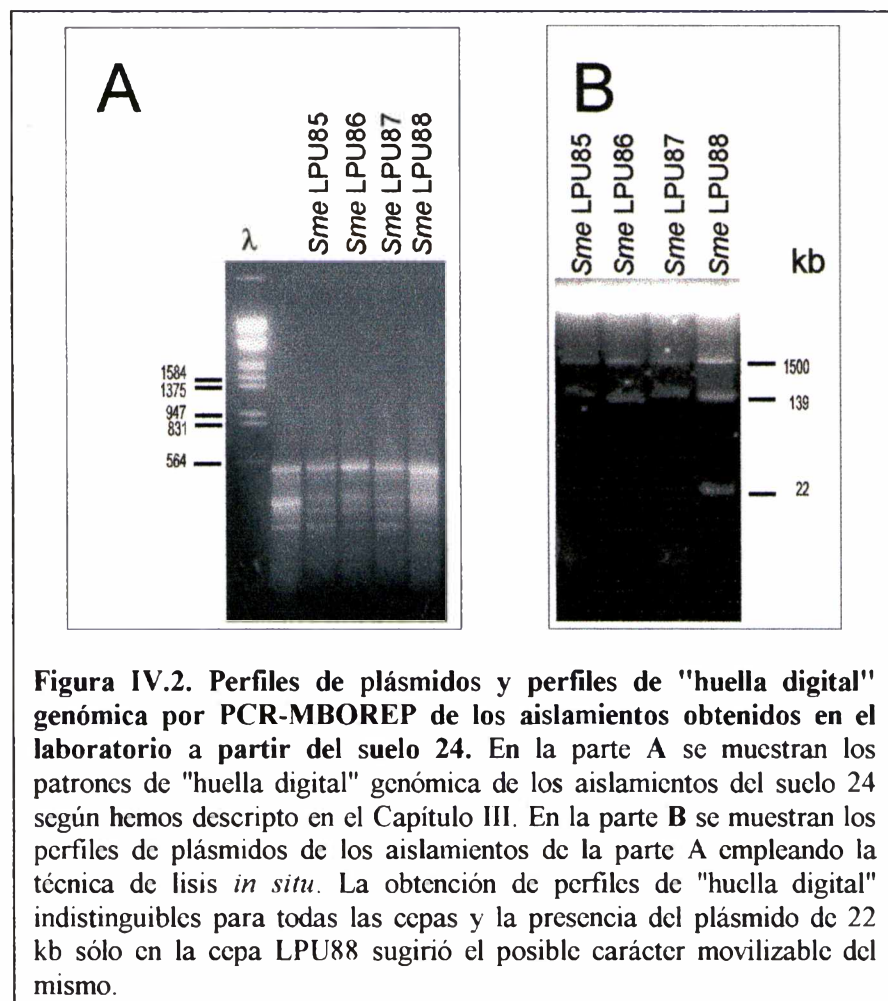
2. Búsqueda de plásmidos crípticos de *S. meliloti* movilizables por conjugación: Estrategia empleada sobre el aislamiento LPU88.

Para la búsqueda de plásmidos movilizables por conjugación utilizamos la estrategia previamente descrita por Mercado-Blanco y Olivares (1993) para evaluar la transmisibilidad de plásmidos crípticos presentes en la cepa *S. meliloti* GR4. Dicha estrategia también fue utilizada por Rao *et al* (1994) para evaluar la transmisibilidad de los plásmidos simbióticos (pSym) de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii. En la Figura IV.1. se presenta un esquema



del procedimiento utilizado. La cepa *E. coli* S17-1 fue usada para la transferencia del transposon Tn5 salvaje vía el plásmido suicida pSUP1021 (Simon *et al.*, 1989) al aislamiento de *S. meliloti* donde se quiere evaluar la presencia de plásmidos transmisibles por conjugación. Las bacterias mutantes en las que el Tn5 transpuso a su genoma fueron seleccionadas en medio TY líquido con estreptomina (Sm) (400 µg/ml) y neomicina (Nm) (120 µg/ml). Las resistencias a dichos antibióticos son codificadas por los genes estreptomina-fosfotransferasa (que es críptico en *E. coli*) y neomicina-fosfotransferasa (*nptII*) del Tn5. Dado que el gen de resistencia a estreptomina no se expresa en *E. coli* en las condiciones de cultivo antes mencionadas, sólo desarrollan aquellas bacterias transconjugantes en las que tuvo lugar algún evento de transposición. Las células de *S. meliloti* Sm^r Nm^r resultantes, fueron utilizadas luego "en masa" como donadoras de la resistencia a Nm^r hacia una segunda cepa receptora, *S. meliloti* 2011 resistente a espectinomicina (Sp^r) (100 µg/ml). Bacterias con la triple resistencia Sm^r Sp^r Nm^r fueron entonces consideradas como posibles portadoras de plásmidos transmisibles por conjugación desde la cepa de *S. meliloti* donadora original.

De la observación cuidadosa de los perfiles de los plásmidos y "huella digital" de los aislamientos de cada uno de los suelos surgió que dos de los rizobios del suelo 24 (ver Tabla II.2.) tenían patrones de "huella digital" indistinguibles y presentaban diferencias (de tamaño) en uno solo de sus plásmidos (Figura IV.2.). Consideramos por tanto posible que el aislamiento portador del plásmido adicional, designado *S. meliloti* LPU88, podía ser un buen candidato para investigar la presencia de plásmidos transmisibles. La aplicación de la estrategia que he descrito al comienzo de esta sección sobre *S. meliloti* LPU88 permitió obtener



transconjugantes de la cepa *S. meliloti* 2011 (receptora final) que por su patrón de resistencias a antibióticos ($Sm^r Sp^r Nm^r$) eran posibles portadores de al menos un plásmido adquirido.

3. Caracterización de los transconjugantes *S. meliloti* 2011 $Sm^r Sp^r Nm^r$.

Treinta transconjugantes *S. meliloti* $Sp^r Nm^r$ elegidos al azar y potencialmente portadores de al menos un plásmido movilizado desde el aislamiento *S. meliloti* LPU88 fueron analizados en su contenido plasmídico por el método de lisis *in situ* en geles de agarosa. En la Figura IV.3. se muestran los resultados obtenidos con algunos de los transconjugantes que son

representativos del conjunto. Todos los clones analizados presentaron la banda característica de los megaplásmidos simbióticos de *S. meliloti* que en las condiciones de corrida utilizadas migran formando una única banda. Se observó además una banda plasmídica adicional correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 28 kb. El tamaño de dicho plásmido fue estimado utilizando como patrones los plásmidos de la cepa *S. meliloti* MVII-I previamente

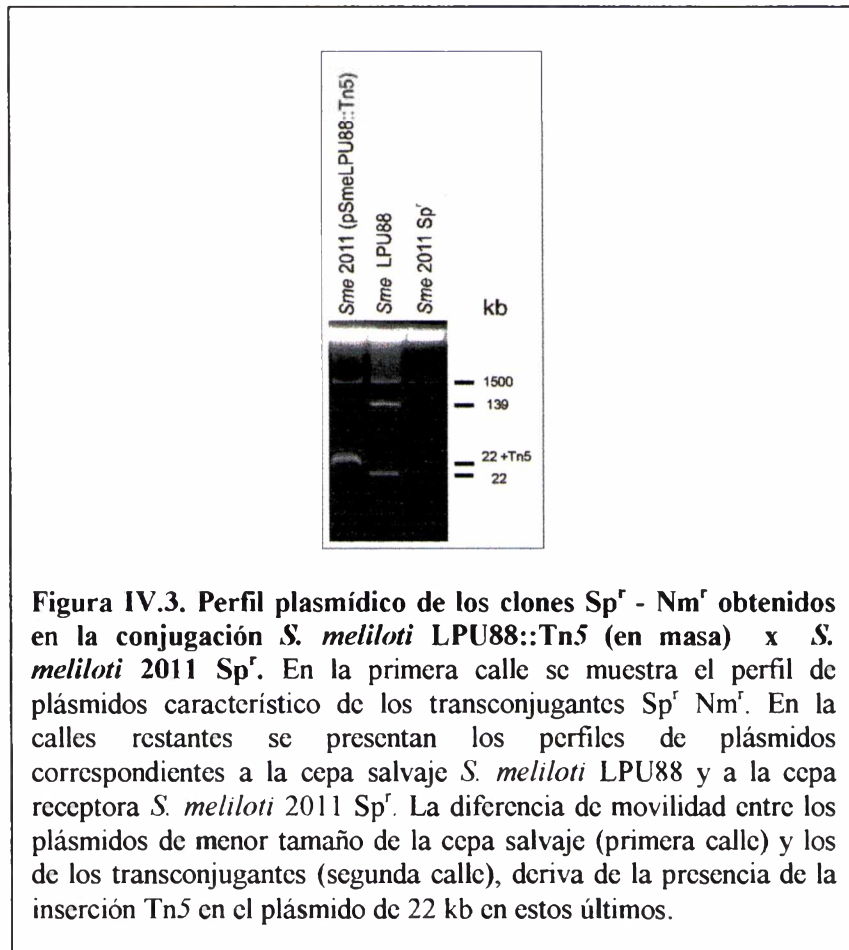
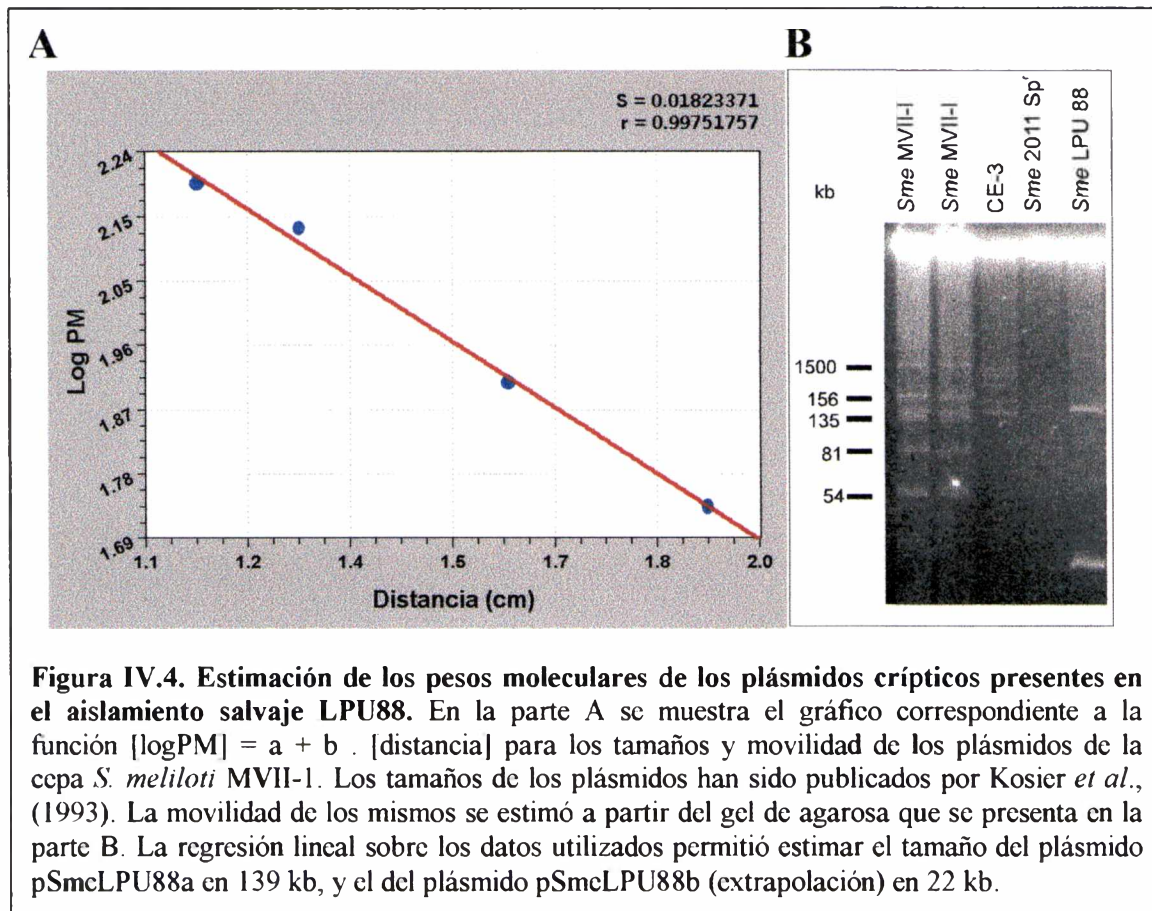


Figura IV.3. Perfil plasmídico de los clones $Sp^r - Nm^r$ obtenidos en la conjugación *S. meliloti* LPU88::Tn5 (en masa) x *S. meliloti* 2011 Sp^r . En la primera calle se muestra el perfil de plásmidos característico de los transconjugantes $Sp^r Nm^r$. En las calles restantes se presentan los perfiles de plásmidos correspondientes a la cepa salvaje *S. meliloti* LPU88 y a la cepa receptora *S. meliloti* 2011 Sp^r . La diferencia de movilidad entre los plásmidos de menor tamaño de la cepa salvaje (primera calle) y los de los transconjugantes (segunda calle), deriva de la presencia de la inserción Tn5 en el plásmido de 22 kb en estos últimos.

caracterizada por Hynes

et al. (1986) (Figura IV.4). No se observaron transconjugantes portadores del plásmido de mayor tamaño, lo que sugiere que el mismo no es movilizable o que lo hace a una frecuencia muy baja (menor que 10^{-10} /célula donadora). El plásmido transconjugante presentó una movilidad electroforética menor que el plásmido de menor tamaño presente en la cepa *S. meliloti* LPU88. De acuerdo a la estrategia de movilización esta observación es compatible con la presencia de una inserción Tn5 en el plásmido salvaje pSmeLPU88b y su movilización posterior a la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^r . La amplificación por PCR de ADN extraído de los transconjugantes empleando cebadores específicos para la detección del gen *nptIII* y de la

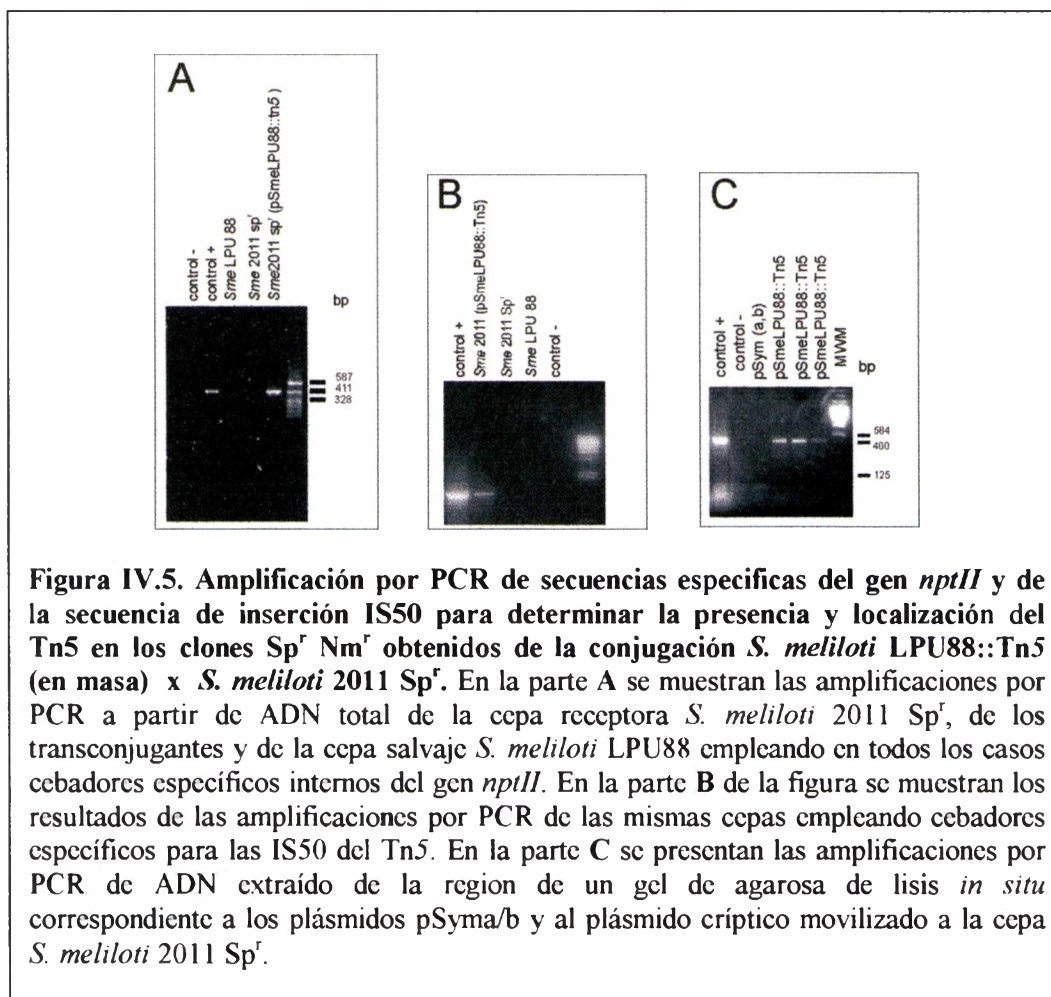


secuencia IS50 del Tn5 dio resultado positivo en ambos casos (Figura IV.5.). Posteriormente, la amplificación de ADN extraído de la región del gel de lisis *in situ* a la que migra el plásmido transferido confirmó la presencia de secuencias homólogas al Tn5 en dicho plásmido (Figura IV.5.).

4. Estudio de las propiedades de movilización del plásmido pSmeLPU88::Tn5.

Con el propósito de determinar si el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 es automovilizable (conjugativo) ó requiere funciones de ayuda (*helper*) presentes en *trans* (movilizable), se realizaron ensayos de conjugación usando a la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^r Nm^r portadora del plásmido críptico y la cepa *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2 como donadora y receptora, respectivamente. En dichos ensayos que fueron repetidos varias veces empleando una relación [donadora:receptora] de aproximadamente $[10^8:10^8]$ no se obtuvieron bacterias Rif^r Nm^r, hecho que sugiere que el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 no es movilizable desde el *background* genómico de la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^r o lo es a una frecuencia menor que la detectable en las condiciones del ensayo (cabe destacar que la mezcla de células donadoras y receptoras fueron incubadas por períodos no inferiores a las 12 h en los ensayos de conjugación).

Consideramos muy poco probable que el plásmido pSmeLPU88b no hubiera sido replicativo en la cepa de *A. tumefaciens* que utilizamos como receptora. Los resultados obtenidos sugerían entonces alguna de las siguientes posibilidades:



- que en el aislamiento *S. meliloti* LPU88 portador del plásmido transferido posea en otro de sus replicones los genes de ayuda requeridos para la movilización conjugativa. En relación a esta posibilidad ya ha sido reportada la movilización de plásmidos crípticos de *S. meliloti* a partir de funciones de ayuda (*helper*) en *trans* presentes en otros plásmidos acompañantes (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). O bien,
- que la inserción del transposón presente en el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 haya alterado funciones de movilización (presentes en *cis*), habiendo sido aún posible transferir el plásmido durante unas pocas generaciones post-transposición. Si así hubiese sido, otros plásmidos salvajes de células vecinas de la mezcla en masa podrían además haber sido transferidos a la cepa donadora mutante, complementado la función de movilización alterada.

Veremos a continuación que la situación real se corresponde con la primera de las posibilidades anteriores. Llegamos a esa conclusión luego de investigar en detalle cuáles eran

las características de movilización del plásmido de 22 kb pSmeLPU88b. Para ello en primera instancia se intentó sin éxito introducir el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en la cepa salvaje *S. meliloti* LPU88 por electroporación (en *S. meliloti* se ha comunicado el aumento de la eficiencia de transformación por electroporación en cepas portadoras de ciertas mutaciones no bien caracterizadas desde el punto molecular) (Gage *et al.* 1996). Para obtener la cepa buscada *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) se procedió entonces a:

- 1) clonar en el plásmido suicida pSUP102 (Tc^r) el fragmento *Eco*RI del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 que contiene al Tn5, y
- 2) homogenotizar dicho fragmento en la cepa *S. meliloti* LPU88 previa transferencia del plásmido recombinante por conjugación desde la cepa *E. coli* S17-1. La cepa resultante *S. meliloti* LPU88

(pSmeLPU88b::Tn5) permitió movilizar el plásmido con la inserción Tn5 a *A. tumefaciens* UBAPF2

confirmando que el plásmido era en efecto replicativo en esa bacteria, y a *S. meliloti* 2011 Sp^r. En la Figura IV.6. se muestran los geles de lisis *in situ* obtenidos a partir de los distintos transconjugantes.

El resultado obtenido indica que la cepa LPU88 posee funciones *helper* de movilización localizadas fuera del plásmido pSmeLPU88b, y que las mismas están además ausentes en la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^r incapaz de movilizar el plásmido. A través de estos ensayos hemos determinado que la frecuencia de movilización del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 desde la cepa LPU88 a la cepa 2011 es de aproximadamente 10⁻² / célula donadora.

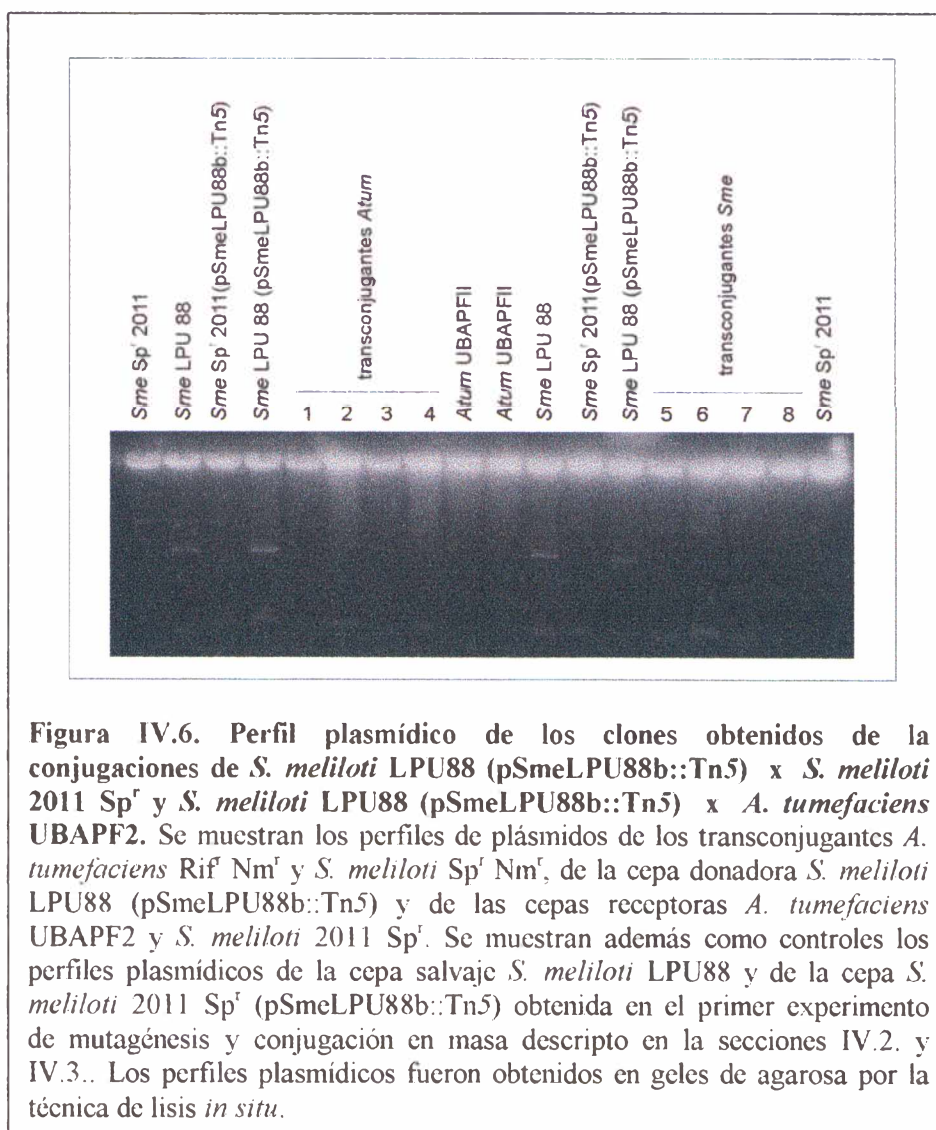


Figura IV.6. Perfil plasmídico de los clones obtenidos de la conjugaciones de *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) x *S. meliloti* 2011 Sp^r y *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) x *A. tumefaciens* UBAPF2. Se muestran los perfiles de plásmidos de los transconjugantes *A. tumefaciens* Rif^r Nm^r y *S. meliloti* Sp^r Nm^r, de la cepa donadora *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) y de las cepas receptoras *A. tumefaciens* UBAPF2 y *S. meliloti* 2011 Sp^r. Se muestran además como controles los perfiles plasmídicos de la cepa salvaje *S. meliloti* LPU88 y de la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^r (pSmeLPU88b::Tn5) obtenida en el primer experimento de mutagénesis y conjugación en masa descrito en la secciones IV.2. y IV.3.. Los perfiles plasmídicos fueron obtenidos en geles de agarosa por la técnica de lisis *in situ*.

5. Localización de las funciones de movilización presentes en la cepa LPU88 y requeridas para la transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5.

Recientemente se ha reportado la presencia de secuencias similares a varios de los genes *tra* y *trb* tanto en el cromosoma como en plásmidos cripticos de una cepa *Mesorhizobium loti* (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). Los mismos han sido identificados como consecuencia del secuenciamiento completo de ese rizobio. No se conoce hasta el momento si dichos genes son funcionales. Por otra parte, y como hemos mencionado en la sección precedente, Herrera-Cervera *et al.* (1996) han mostrado la existencia de funciones de ayuda en un plásmido criptico que son activas en *trans* para la movilización de otro plásmido criptico en la cepa *S. meliloti* GR4. Basados en esta última evidencia analizamos entonces en primer término si las funciones de ayuda de la cepa *S. meliloti* LPU88 requeridas para la movilización del plásmido pSmeLPU88b estaban presentes en el plásmido acompañante de mayor tamaño pSmeLPU88a. Para ello, se construyó la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^f (pSmeLPU88a::Tn5-B13, pSmeLPU88b::Tn5) a la que se le analizó la capacidad donadora de la resistencia a Nm presente en el plásmido pequeño pSmeLPU88b::Tn5. Dado que la cepa *S. meliloti* 2011 no posee funciones de ayuda (ver sección anterior), la misma posee un genotipo de base adecuado para evaluar si el plásmido de mayor tamaño pSmeLPU88a posee dichas funciones. Una dificultad importante que encontramos para la construcción de la cepa *S. meliloti* 2011 portadora de ambos plásmidos es que el plásmido pSmeLPU88a no es naturalmente movilizable desde la cepa salvaje LPU88 (ver sección precedente). Por ello, en una primera etapa se rescató el plásmido pSmeLPU88a a la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^f empleando una estrategia similar a la descrita para el rescate del plásmido pSmeLPU88b pero empleando el Tn5-B13 (Tc^r-*mob*) en reemplazo del Tn5 salvaje. La movilización del plásmido pSmeLPU88a::Tn5-B13 desde *S. meliloti* LPU88 a *S. meliloti* 2011 Sp^f se realizó por conjugación triparental en masa usando como plásmido de ayuda pRK2013 (suicida en Rhizobiaceae, derivado RP4 en el que se ha reemplazado su origen de replicación por el *oriV* de un plásmido colE1 de estrecho rango de huéspedes. En relación al plásmido RP4 hemos verificado que sus funciones de ayuda no son capaces de movilizar el plásmido pSmeLPU88b). Bacterias con resistencia a Sp y Tc fueron consideradas como posibles portadoras de plásmidos movilizados portadores del Tn5-B13, desde la cepa *S. meliloti* LPU88 donadora a la cepa receptora *S. meliloti* 2011 Sp^f. Dieciocho transconjugantes Sp^f Tc^r elegidos al azar y potencialmente portadores de al menos un plásmido movilizado fueron analizados en su contenido plasmídico por el método de lisis *in situ* en geles de agarosa. Se obtuvieron clones que recibieron el plásmido grande, clones que recibieron el plásmido pequeño, y un clon que recibió ambos plásmidos (sólo el grande con el Tn5B13) (ver más adelante, capítulo VI sección 2). A este último clon le fue transferido por conjugación desde la cepa *S. meliloti* LPU88 Sm^f Nm^f el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 para obtener la cepa *S. meliloti* 2011 Sp^f (pSmeLPU88a::Tn5-B13, pSmeLPU88b::Tn5). Una vez conseguida la cepa *S. meliloti* 2011 con los dos plásmidos marcados se procedió a realizar un ensayo de

conjugación usando dicha cepa como donadora y la cepa *A. tumefaciens* UBAPF2 como receptora. En dicho ensayo se obtuvieron transconjugantes de *A. tumefaciens* UBAPF2 Rif^r Nm^r, todos ellos portadores del plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Este resultado puso de manifiesto que el plásmido pSmeLPU88a es el replicón que posee las funciones de ayuda para movilizar el plásmido críptico más pequeño pSmeLPU88b.

6. Caracterización simbiótica de cepas a las que se ha incorporado alguno de los plásmidos pSmeLPU88a / pSmeLPU88b. Ensayos de competitividad.

Como hemos hecho referencia en la introducción de esta tesis, plásmidos crípticos de *Rhizobium* pueden ser portadores de funciones que modulan el comportamiento simbiótico de la bacteria (Soto *et al.*, 1993). Con el propósito de evaluar si la presencia de alguno de los plásmidos pSmeLPU88a ó pSmeLPU88b está asociada a cambios en la simbiosis, cepas de *S. meliloti* 2011 Sp^r portadoras de cada uno de los plásmidos anteriores fueron analizadas en su competitividad frente a la misma cepa libre de plásmidos crípticos en medio hidropónico. Para la evaluación del porcentaje de nódulos ocupados por las bacterias con y sin plásmidos, los ensayos de competición se realizaron utilizando el marcador GFP (proteína de fluorescencia verde) (Chalfie *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1997) que hemos introducido en la cepa 2011 libre de los plásmidos crípticos. Hemos construido dicha cepa por inserción de un casete *gfp*-Tc en su región cromosomal *alaS-recA* (en el Apéndice de esta tesis describo en detalle el sistema de marcación cromosomal *gfp*-Tc que hemos diseñado y construido, que por su estabilidad y no-transmisibilidad puede ser utilizado para el seguimiento de genotipos específicos aún en poblaciones bacterianas complejas como pueden ser muestras de suelo).

Para analizar el comportamiento simbiótico de la cepas *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13) y *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88b::Tn5) se realizaron experimentos de inoculación simple como control, y experimentos de coinoculación con la cepa 2011 Tc-*gfp* para evaluar competitividad para la nodulación. Cuando las raíces de las plántulas crecidas a partir de semillas esterilizadas en superficie alcanzaron una longitud de aproximadamente 0,5 cm las mismas fueron colocadas en las bolsas de polietileno con 10 ml de medio Jensen (Jensen, 1942) libre de nitrógeno (las plantas fueron cultivadas en una cámara de plantas fotoperíodo 16 horas, temperatura 22 °C durante el día y 18 °C durante la noche). Al quinto día post-germinación las raíces fueron inoculadas con 100 µl/planta de una suspensión bacteriana en medio Fåhræus (Fåhræus, 1957). Los inóculos utilizados fueron *S. meliloti* 2011 Tc-*gfp*, 1,5x10⁶ ufc/planta, *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::B13) 2,1x10⁶ ufc/planta, *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88b::Tn5) 1,5x10⁶ ufc/planta, y para *S. meliloti* LPU88 7x10⁵ ufc/planta. Al cabo de 28 días los nódulos fueron removidos de las raíces, esterilizados en su superficie, y luego evaluada la ocupación de los mismos por plaqueo de su contenido en medio TY sólido con diferentes antibióticos según los marcadores de resistencia de las cepas utilizadas (Tabla IV.1.).

Tabla IV.1. Porcentaje de ocupación de nódulos en experimentos de coinoculación de alfalfa con la cepa 2011 Tc-*gfp* y sus derivados portadores de los plásmidos pSmeLPU88a y pSmeLPU88b marcados.

Cepas inoculadas ^a	Cepa aislada de nódulo	% de ocupación ^b
2011 Tc- <i>gfp</i> + 2011	2011Tc- <i>gfp</i>	51
	2011	49
2011 Tc- <i>gfp</i> + 2011(pSmeLPU88a::Tn5B13)	2011 <i>gfp</i>	42
	2011(pSmeLPU88aTn5)	58
2011 Tc- <i>gfp</i> + 2011(pSmeLPU88b::Tn5)	2011 <i>gfp</i>	55
	2011(pSmeLPU88bTn5)	45
2011 Tc- <i>gfp</i> + LPU88	2011 <i>gfp</i>	9
	LPU88	91

a: Se incluyó también en el experimento el aislamiento de *S. meliloti* LPU88 portador natural de los plásmidos.

b: Los porcentajes de ocupación de cada una de las cepas presentes en los nódulos fueron determinados analizando la fluorescencia de las bacterias y su capacidad de crecer en medio TY con Tc o Nm según correspondió.

No hemos observado diferencias marcadas en la capacidad competitiva de las cepas portadoras de los plásmidos respecto de la cepa 2011 Tc-*gfp*. Recientemente (Roumiantseva *et al.*, 2001) el análisis genotípico detallado de aislamientos de *S. meliloti* recuperados de suelos (en vida libre) y de nódulos en la región de Asia central, reveló que los últimos tenían con más frecuencia plásmidos de alto peso molecular. Esa observación sugiere que la presencia de ciertos plásmidos podría conferir alguna/s ventaja/s competitivas para la ocupación del nicho simbiótico respecto del de vida libre. En nuestro caso sólo hemos obtenido una pequeña diferencia de ocupación en favor de la cepa que posee el plásmido pSmeLPU88a de mayor tamaño. Debe tenerse en cuenta es que es muy posible que las diferencias observadas en el trabajo de Roumiantseva *et al.* (2001) sean consecuencia de fenómenos de adaptación a factores naturales a lo largo de varias generaciones, los que no necesariamente operan en las condiciones de laboratorio como los que nosotros hemos utilizado. De todos modos existen antecedentes en los que la introducción de un replicón de una cepa nativa ha generado cambios claros en la competitividad en condiciones de laboratorio (Toro y Olivares, 1986; genes *nfe*). No parece ser ese el caso de los plásmidos pSmeLPU88a y pSmeLPU88b que hemos analizado.

En este Capítulo hemos estudiado uno de los aislamientos de nuestra colección con el objeto de iniciar la búsqueda de plásmidos transmisibles por conjugación. La estrategia que hemos utilizado para detectar el movimiento de plásmidos entre cepas no discrimina entre plásmidos movilizables (aquellos que requieren funciones de ayuda presentes en otro

replicón) y plásmidos conjugativos (automovilizables). En la cepa que hemos analizado hemos detectado un sistema binario de transferencia conjugativa en el que uno de los plásmidos, que hemos designado pSmeLPU88b, es movilizable por las funciones de ayuda del plásmido acompañante que designamos pSmeLPU88a.

En ensayos en medio hidropónico en condiciones de laboratorio no hemos podido detectar cambios simbióticos de la cepa *S. meliloti* 2011 asociados a la presencia del plásmido pSmeLPU88a ó pSmeLPU88b, a excepción de un leve aumento en la competitividad ante la presencia del plásmido de mayor tamaño (sólo hemos evaluado competitividad para la nodulación). La posibilidad de que la presencia de alguno de los plásmidos confiera en condiciones naturales alguna ventaja simbiótica o adaptativa deberá ser investigada en experimentos con muestras de suelo no estéril, en presencia de la planta huésped, y en un período más extendido de tiempo (en esos sistemas contenidos para bacterias recombinantes podrá emplearse el mismo sistema de marcación cromosomal con Tc-*gfp* que hemos desarrollado y utilizado en nuestros ensayos de laboratorio).

Desde el punto de vista de las características conjugativas el sistema binario que hemos presentado se distingue del previamente descrito por Toro y Olivares (1986) por el aparente carácter no transmisible de uno de sus plásmidos: hasta el momento no hemos podido detectar la movilización de pSmeLPU88a en ensayos de laboratorio. La frecuencia de movilización del plásmido pSmeLPU88b fue de 10^{-2} / célula donadora, dos ordenes de magnitud menor que la del plásmido RP4. Cabe también mencionar que las funciones de ayuda de este plásmido no han sido capaces de movilizar el plásmido pSmeLPU88b que aquí hemos presentado.

Como ya hemos mencionado, la elección de la cepa LPU88 para la búsqueda de plásmidos movilizables se originó en la observación de que la misma poseía un plásmido adicional al presente en otra cepa del mismo suelo con el mismo perfil de huella digital genómica (*S. meliloti* LPU86). Según hemos visto el plásmido diferencial pSmeLPU88b resultó ser movilizable. Además de la posibilidad de que este plásmido haya llegado al aislamiento LPU88 desde otra cepa, debe considerarse también la posibilidad de que el mismo se haya originado a partir de la resolución de un plásmido de mayor tamaño con dos orígenes de replicación, en dos replicones independientes: uno de ellos portador de las funciones de ayuda (pSmeLPU88a) y el otro del origen de transferencia (pSmeLPU88b). En favor de esta posibilidad hemos detectado una cepa del mismo suelo (*S. meliloti* LPU87), que carente del plásmido pSmeLPU88b, posee un plásmido de tamaño levemente mayor que pSmeLPU88a y que a diferencia de éste ha podido ser movilizado por conjugación (ver Capítulo V, sección 5). No hemos realizado hasta el momento ningún mapeo comparativo de los plásmidos para evaluar las posibilidades anteriores (téngase en cuenta que se trata de plásmidos de alto peso molecular y muy bajo número de copias, hecho que dificulta la purificación de los mismos para la realización de hibridaciones con sondas plasmídicas completas).

En el Capítulo siguiente extenderemos el análisis a la caracterización de las propiedades de movilización del plásmido pSmeLPU88b desde otros genotipos de *S. meliloti* distintos de LPU88 y de diferente origen. Asimismo, nos centraremos en la identificación de nuevos plásmidos transmisibles en otras cepas de la colección.

CAPÍTULO V:

Evaluación de la presencia de funciones conjugativas de ayuda (*helper*) y de plásmidos movilizables en aislamientos locales de *S. meliloti*.

1. Introducción.

En los Capítulos anteriores hemos presentado el análisis de la diversidad genotípica presente en una colección de aislamientos locales de *S. meliloti* (Capítulo III), y el aislamiento y caracterización de un plásmido críptico movilizable por conjugación a partir de una de las cepas de esa colección (Capítulo IV). Para investigar entonces cuál puede ser la incidencia de eventos de movilización de plásmidos como el que hemos aislado entre cepas de *S. meliloti*, será importante determinar con qué frecuencia pueden encontrarse plásmidos transmisibles y también el grado de complementación cruzada entre sus funciones de ayuda. En la literatura es lamentablemente muy escasa la información que existe respecto de la ocurrencia y propiedades de movilización de plásmidos transmisibles en *S. meliloti* y en rizobios en general (Mercado-Blanco y Toro, 1996). En este Capítulo, mostraremos un análisis que hemos realizado sobre nuestros aislamientos para avanzar en este sentido. Como hemos discutido en la introducción de esta tesis, la caracterización de la incidencia real de la transferencia génica horizontal entre bacterias es un punto muchas veces determinante en la dinámica de adaptabilidad bacteriana y relación con su entorno. Recientemente se ha comunicado que cepas de *S. meliloti* aisladas de nódulos tienen con más frecuencia plásmidos de alto peso molecular que las que fueron aisladas de suelo en vida libre. Lamentablemente no se ha analizado la transmisibilidad de los plásmidos en dichas cepas. En el caso de rizobios en general, debe prestarse además particular atención a la presencia de plásmidos transmisibles si se considera la muy frecuente liberación masiva de nuevas cepas a suelos en las prácticas de inoculación agrícola de rutina.

2. Análisis de complementación de las funciones de ayuda entre dos sistemas binarios de movilización plasmídica de *S. meliloti*: pSmeLPU88a / pSmeLPU88b vs pRmeGR4a / pRmeGR4b.

Teniendo en cuenta que ha sido reportada la existencia de plásmidos crípticos de *S. meliloti* cuya transferencia depende de funciones presentes en *trans* (Herrera-Cervera *et al.*, 1996), investigamos si existe capacidad de complementación entre las funciones de transferencia de dichos plásmidos y el plásmido pSmeLPU88b. Para ello se evaluó la capacidad del plásmido pRmeGR4a de la cepa *S. meliloti* GR4 (Granada, España Toro y Olivares, 1986) para movilizar el plásmido pSmeLPU88b. Para realizar dicho ensayo debió verificarse previamente que los plásmidos pRmeGR4a y pSmeLPU88b no pertenezcan a un mismo grupo de incompatibilidad respecto de la replicación. El plásmido pSmeLPU88b::Tn5 fue transferido por conjugación desde la cepa *S. meliloti* LPU88 a la cepa *S. meliloti* GR4 (Gm^r, mutante espontáneo que hemos obtenido). Los transconjugantes GR4 (pSmeLPU88b::Tn5) Gm^r Nm^r fueron estudiados en su contenido plasmídico por medio de geles de lisis *in situ* con el propósito de verificar la compatibilidad de los plásmidos. Como se observa en la Figura V.1. la introducción del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en la cepa *S. meliloti* GR4 no produjo la pérdida de ninguno de los plásmidos residentes. Una vez obtenida la cepa *S. meliloti* GR4 (pSmeLPU88b::Tn5) se estudió su capacidad de movilizar el plásmido introducido pSmeLPU88b::Tn5 empleando la cepa *A. tumefaciens* UBAPF2 como receptora.

Debido a que la presencia del plásmido pRmeGR4b puede interferir en la transferencia de otros plásmidos que se le han introducido a la cepa *S. meliloti* GR4 (San Juan, comunicación personal), decidimos realizar en paralelo una experiencia similar pero utilizando la cepa *S. meliloti* GRM6 derivada de la cepa *S. meliloti* GR4 y curada del plásmido pRmeGR4b. En ambos ensayos se obtuvieron transconjugantes Rif^r Nm^r, portadores de un plásmido de aproximadamente 28 kb con lo concluimos que las funciones de ayuda del plásmido pRmeGR4a son capaces de movilizar al plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Cabe mencionar que cuando utilizamos la cepa *S. meliloti* GRM6 (pSmeLPU88b::Tn5) como donadora obtuvimos una patina bacteriana de transconjugantes, mientras que con la cepa *S. meliloti* GR4 solo se obtuvieron 140 u.f.c./placa a partir de cultivos donador y receptor con densidades ópticas equivalentes (OD600nm 0,4). La explicación más sencilla para este tipo de observación es a través de la posible existencia de fenómenos de competición entre ambos plásmidos

movilizables pRmeGR4b y pSmeLPU88b::Tn5, portadores de orígenes de transferencia (*oriT*) compatibles. Por otra parte, la movilización del plásmido pSmeLPU88b por el sistema conjugativo presente en la cepa europea GR4 sugiere la existencia de pares "genes de transferencia-*oriT*" cuya compatibilidad cruzada en *S. meliloti* puede ser un hecho frecuente dentro de la especie.

3. Reconocimiento de funciones de ayuda (*helper*) capaces de movilizar el plásmido modelo pSmeLPU88b, en cepas de los distintos grupos de diversidad establecidos en el Capítulo I.

Ya hemos demostrado en la sección precedente que la cepa europea *S. meliloti* GR4 es portadora de funciones de ayuda (*helper*) que son activas en la movilización del plásmido

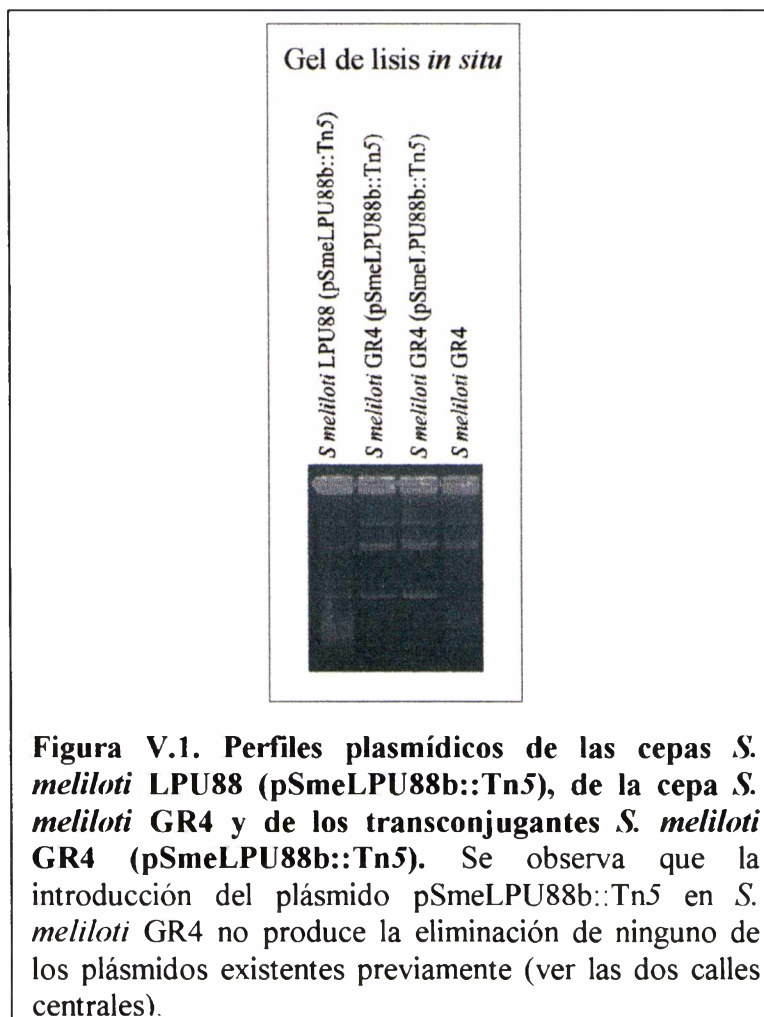


Figura V.1. Perfiles plasmídicos de las cepas *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5), de la cepa *S. meliloti* GR4 y de los transconjugantes *S. meliloti* GR4 (pSmeLPU88b::Tn5). Se observa que la introducción del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en *S. meliloti* GR4 no produce la eliminación de ninguno de los plásmidos existentes previamente (ver las dos calles centrales).

pSmeLPU88b aislado de la cepa *S. meliloti* LPU88 local. La búsqueda de funciones de ayuda similares en nuestra colección de aislamientos fue realizada analizando la capacidad de movilización del plásmido pSmeLPU88b por parte de diferentes aislamientos escogidos de cada uno de los grupos de perfiles plasmídicos que hemos establecido en el Capítulo III (uno por grupo). Una de las dificultades experimentales estuvo ligada a la ausencia de marcadores apropiados de resistencia a antibióticos en los aislamientos salvajes de *S. meliloti*. La estrategia experimental que hemos utilizado y los resultados obtenidos fueron como sigue:

i.- Marcación de los rizobios. Aislamientos representativas de cada uno de los 22 grupos de perfiles de plásmidos fueron marcadas con resistencia a Gm (gen *aacII*) por recombinación en su cromosoma del plásmido suicida pSM10 (Pühler). Dicho plásmido es portador de un fragmento cromosomal de *S. meliloti* de aproximadamente 1 kb y muy conservado en secuencia, correspondiente a parte de los genes *recA-alaS*. A través de dicha región se produjo la integración sitio-específica del plásmido pSM10 mediante un simple evento de recombinación según se muestra en la Figura V.2.

ii.- Transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 a los rizobios marcados. A cada uno de los recombinantes resistentes a Gm se les transfirió por conjugación el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 desde la cepa *S. meliloti* (pSmeLPU88a, pSmeLPU88b). Los transconjugantes fueron seleccionados por su doble resistencia a Gm Nm.

iii- Evaluación de la capacidad de movilización del plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Cada una de las cepas quiméricas obtenidas se utilizó como potencial donadora del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 a la cepa *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2 (libre de plásmidos, Rif^r). La obtención de transconjugantes Rif^r Nm^r fue indicativo de la transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 y a la vez de la presencia de funciones de ayuda (*helper*) en el aislamiento nativo de *S. meliloti* ensayado. En todos los casos la presencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 tanto en la cepa donadora como en la receptora fue confirmada mediante geles de lisis *in situ*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.1.

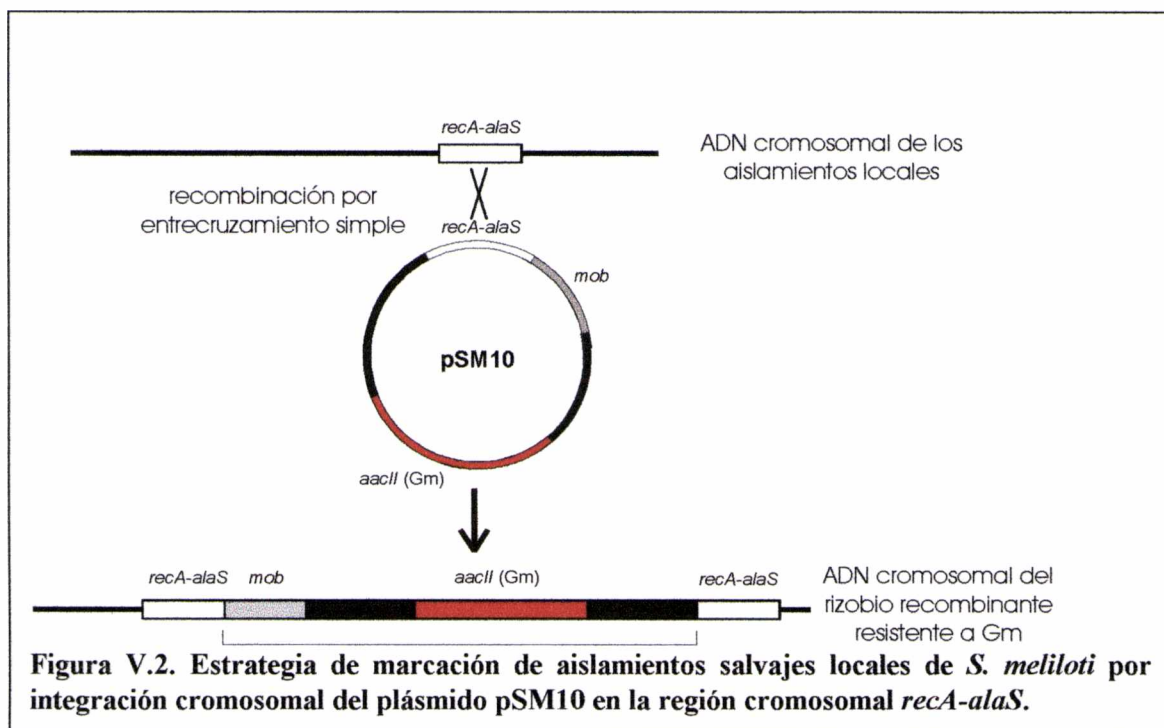


Tabla V.1. Capacidad de cepas representativas de cada uno de los grupos de diversidad plasmídica para movilizar el plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Fenómenos de incompatibilidad de replicación del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 con plásmidos presentes en cada uno de las cepas estudiadas.

Grupo perfil de plásmidos ^(a)	Aislamiento representativo Gm ^r (pSmeLPU88b)	Funciones de ayuda con capacidad de movilizar el plásmido pSmeLPU88b ^(b)	Compatibilidad de plásmidos nativos con el plásmido pSmeLPU88b ^(c)
1	<i>S. meliloti</i> LPU25 (sólo megaplásmidos)	No detectable	SI
2	<i>S. meliloti</i> LPU190	SI	SI
3	<i>S. meliloti</i> LPU9	No detectable	SI
4	<i>S. meliloti</i> LPU198	No detectable	SI
5	<i>S. meliloti</i> LPU5	No detectable	SI
6	<i>S. meliloti</i> LPU85	SI	SI
	<i>S. meliloti</i> LPU87	SI	SI
7	<i>S. meliloti</i> LPU191	No se ha podido introducir el plásmido pSmeLPU88b	
8	<i>S. meliloti</i> LPU86	SI	SI
9	<i>S. meliloti</i> LPU196	SI	SI
10	<i>S. meliloti</i> LPU258	No detectable	SI
11	<i>S. meliloti</i> LPU26	No se ha podido introducir el plásmido pSmeLPU88b	
12	<i>S. meliloti</i> LPU88	-----	-----
13	<i>S. meliloti</i> LPU57	No detectable	NO
14	<i>S. meliloti</i> LPU178	No detectable	NO
15	<i>S. meliloti</i> LPU118	No se ha podido introducir el plásmido pSmeLPU88b	
16	<i>S. meliloti</i> LPU116	No detectable	SI
17	<i>S. meliloti</i> LPU243	No detectable	SI
18	<i>S. meliloti</i> LPU15	No detectable	SI
19	<i>S. meliloti</i> LPU110	No detectable	SI
20	<i>S. meliloti</i> LPU121	SI	NO
21	<i>S. meliloti</i> LPU122	SI	NO
22	<i>S. meliloti</i> LPU244	No detectable	SI

(a): Los números indicados corresponden a los grupos de perfiles plasmídicos definidas en el Capítulo III.

(b): **No detectable** indica ya sea ausencia de funciones de ayuda activas en la cepa indicada, o frecuencias de movilización que son menores que 10^{-9} transconjugantes / célula receptora. **SI** indica la detección de transconjugantes *A. tumefaciens* UBAPF2 (pSmeLPU88b::Tn5).

(c): **SI** indica compatibilidad de todos los plásmidos del aislamiento analizado con el plásmido pSmeLPU88b::Tn5; **NO** indica que uno o más de los plásmidos presentes es incompatible con la presencia del plásmido introducido.

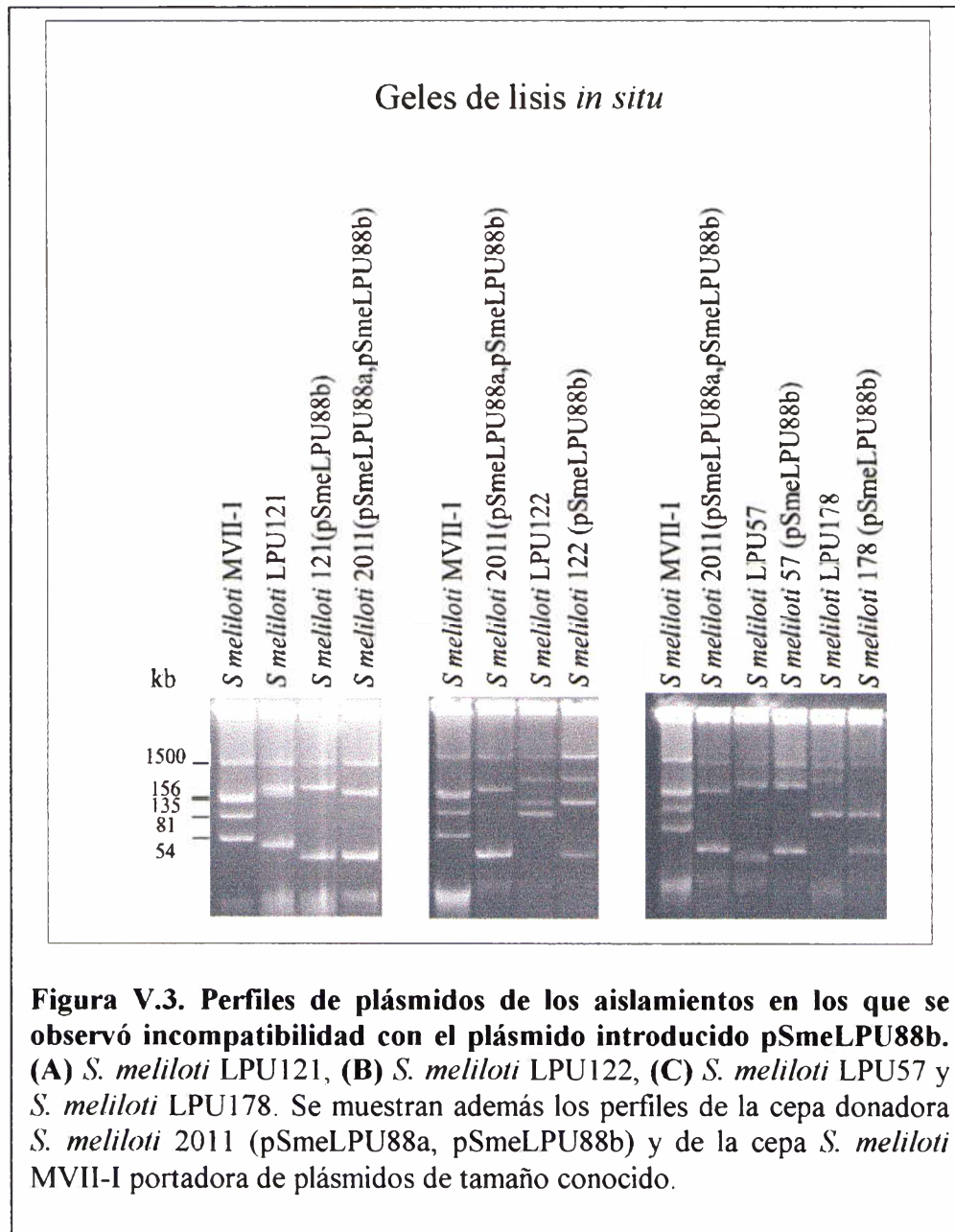
Se observa que existe una proporción muy significativa de los aislamientos con capacidad de removilización del plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Los resultados indican que 33% de los aislamientos (7/21) tienen la capacidad de removilizar el plásmido recibido. Tres de esos aislamientos fueron recuperados del mismo suelo (suelo 24) del que fue aislado el rizobio *S. meliloti* LPU88 originalmente portador del plásmido (*S. meliloti* LPU85 y *S. meliloti* LPU87 pertenecientes al grupo 6 definido en el Capítulo III, y *S. meliloti* LPU86 del grupo 8). Los 4 aislamientos restantes fueron todos recuperados de suelos diferentes (ver Tabla II.2. referida al origen de las cepas, Materiales y Métodos sección 1). Aún sin tener en cuenta los aislamientos del suelo 24 al que pertenece el rizobio LPU88, el porcentaje de removilización es de aproximadamente 21% (4/19, Tabla V.1.). De acuerdo a ello al menos 1 de cada 5 eventos de transferencia deberían conducir a la retransmisión del plásmido). No existen hasta el momento estudios en la literatura que permitan cotejar nuestros resultados con los de otros plásmidos de Rhizobiaceae.

Otra de las observaciones que hemos podido realizar en esta serie de experimentos es que en 3 de los aislamientos que hemos ensayado no ha sido posible introducir el plásmido pSmeLPU88b (*S. meliloti* LPU191 del grupo 7, *S. meliloti* LPU26 del grupo 11, y *S. meliloti* LPU118 del grupo 15). Todas las conjugaciones con dichas cepas fueron realizadas al menos dos veces, empleando en paralelo la cepa *S. meliloti* LPU25 (sólo megaplásmidos, Tabla V.1., línea 1) como receptora para evaluar el funcionamiento de la cepa donadora *S. meliloti* (pSmeLPU88a, pSmeLPU88b). La imposibilidad de incorporar nuevos replicones puede deberse ya sea a incompatibilidades en los sistemas de modificación-restricción de las cepas, o bien a fenómenos de exclusión (inmunidad) derivado de la presencia de alguno de los plásmidos residentes en los rizobios receptores como ha sido descrito en otros sistemas (Winans y Walker, 1985b). Si bien aún no hemos evaluado cuál de estos mecanismos es el que opera, la movilización de los plásmidos presentes en los rizobios refractarios hacia una cepa permisiva como *S. meliloti* 2011 debería permitir poner en evidencia fenómenos de exclusión, que en caso de existir deberán aparecer en los nuevos transconjugantes.

4. Incompatibilidad de replicación del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 con plásmidos presentes en cada uno de las cepas estudiadas.

Como hemos mencionado en la sección precedente, el genotipo plasmídico de todas las cepas que hemos construido fue confirmado en geles de agarosa de lisis *in situ*. Ese análisis nos ha permitido evaluar además si el perfil plasmídico de los rizobios nativos se modifica o no por el ingreso del nuevo replicón pSmeLPU88b, como consecuencia de fenómenos de incompatibilidad con los plásmidos residentes. Los resultados que se presentan en la columna 4 de la Tabla V.1. muestran que hemos detectado 4 aislamientos, designados como *S. meliloti* LPU57, *S. meliloti* LPU178, *S. meliloti* LPU121 y *S. meliloti* LPU122, que presentan plásmidos incompatibles con el que ha sido introducido por conjugación. Debe tenerse en cuenta que en esos casos la presión de selección con Nm ha forzado la selección en favor de la permanencia del plásmido portador del Tn5 que ha sido incorporado. En la Figura V.3. se

muestran los perfiles de plásmidos de dichos aislamientos antes y después de recibir el plásmido pSmeLPU88b::Tn5. El tamaño de los plásmidos que son desplazados fue variable, entre aproximadamente entre 20-160 kb. Mientras en el caso de *S. meliloti* LPU57 (Fig. V.3., parte C), *S. meliloti* LPU122 (Fig. V.3., parte B) y *S. meliloti* LPU178 (Fig. V.3., parte C) se



observó la pérdida de una sola banda plasmídica; en *S. meliloti* LPU121 (Fig. V.3., parte A) se perdieron dos de las bandas originales. Esto último puede deberse a que dichas bandas correspondan a 2 formas de superenrollamiento de un mismo plásmido. Todos estos resultados muestran que 20% de las cepas de la colección tienen al menos uno de sus plásmidos incompatible con el plásmido pSmeLPU88b. En particular, los aislamientos LPU121 y LPU122 que tienen plásmidos incompatibles tienen además funciones de ayuda

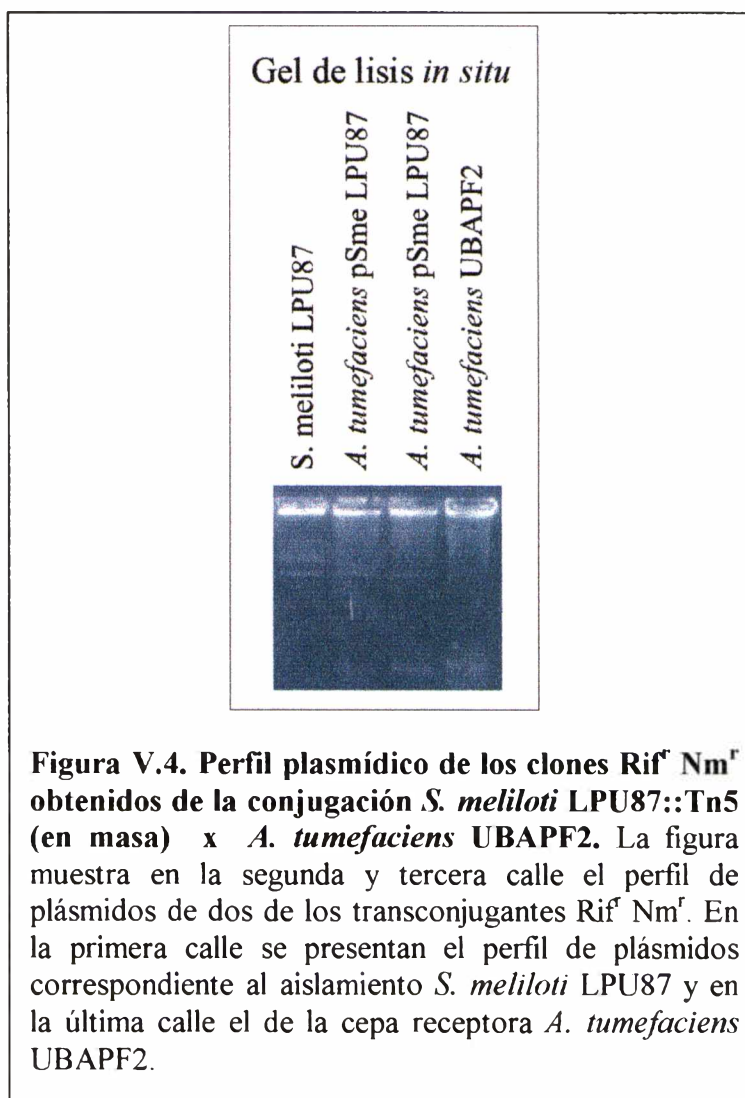
(líneas sombreadas en la Tabla V.1.). El hecho de que el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 haya podido ser movilizado desde los transconjugantes de esos rizobios indica que las mencionadas funciones de ayuda residen en plásmidos diferentes de aquellos que en esas mismas bacterias resultaron incompatibles y se perdieron (Figura V.3.).

5. Búsqueda de nuevos plásmidos crípticos movilizables por conjugación en cada uno de los aislamientos presentados en la Tabla V.1.

Para la búsqueda de nuevos plásmidos movilizables por conjugación en distintos aislamientos de la colección utilizamos la misma estrategia que ya hemos descrito en el

Capítulo IV para el aislamiento del plásmido pSmeLPU88b (Figura IV.1.). En estos ensayos las células de *S. meliloti* Sm^r Nm^r de cada una de las cepas de la Tabla V.1. a las que le fue introducido el Tn5 fueron utilizadas como donadoras (en masa) de la resistencia a Nm^r a las cepas receptoras *S. meliloti* 2011 Sp^r y también a la cepa *A. tumefaciens* UBAPF2 Rif^r. Bacterias con resistencia a Sp Nm (*S. meliloti* 2011 Sp) y Rif Nm (*A. tumefaciens* UBAPF2) fueron consideradas como posibles portadores de nuevos plásmidos movilizables desde el aislamiento de *S. meliloti* donador original. La aplicación de esta estrategia sobre las cepas *S. meliloti* LPU87, *S. meliloti* LPU57 y *S. meliloti* LPU172 permitió detectar transconjugantes que por su patrón de resistencias a antibióticos debían ser

portadores de al menos un plásmido movilizado. El análisis de esas bacterias confirmó la movilización de plásmidos desde desde *S. meliloti* LPU172 a la cepa *S. meliloti* 2011, y desde los aislamientos *S. meliloti* LPU57 y *S. meliloti* LPU87 a *A. tumefaciens* UBAPF2. En la Figura V.4. se muestran perfiles plasmídicos representativos de estos últimos



transconjugantes así como del rizobio donador LPU87 y de la cepa receptora. Algunos de los plásmidos transferidos que no mostramos en la Figura V.4. presentaron una movilidad electroforética menor que la correspondiente a los plásmidos de los aislamientos donadores salvajes (el plásmido movilizado desde la cepa *S. meliloti* LPU57, por ejemplo). Como se indicó en el Capítulo IV, esta observación es compatible con la presencia de una inserción Tn5 en el plásmido salvaje. La presencia de Tn5 en los transconjugantes portadores de nuevos plásmidos fue confirmada por PCR usando cebadores específicos de las secuencias de inserción IS50 y del gen *nptIII* de la neomicina fosfotransferasa que codifica para la resistencia a Nm/Km. En la Figura V.5. se muestran los resultados de la PCR para los transconjugantes derivados de los aislamientos LPU87 y LPU57.

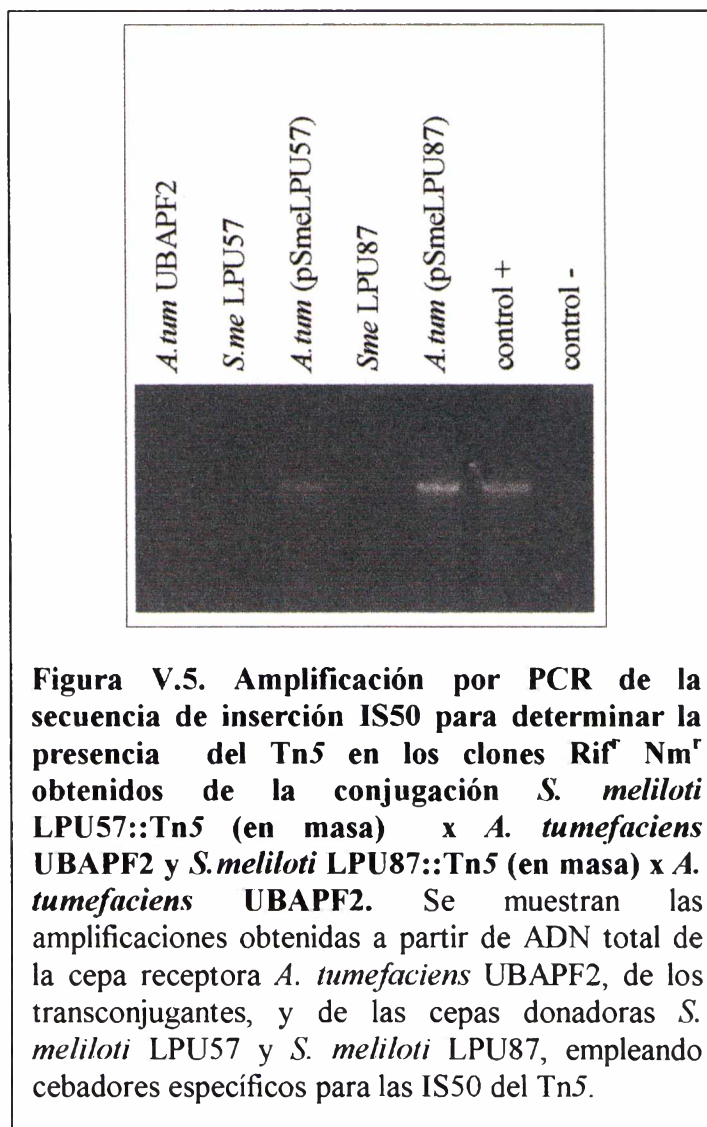


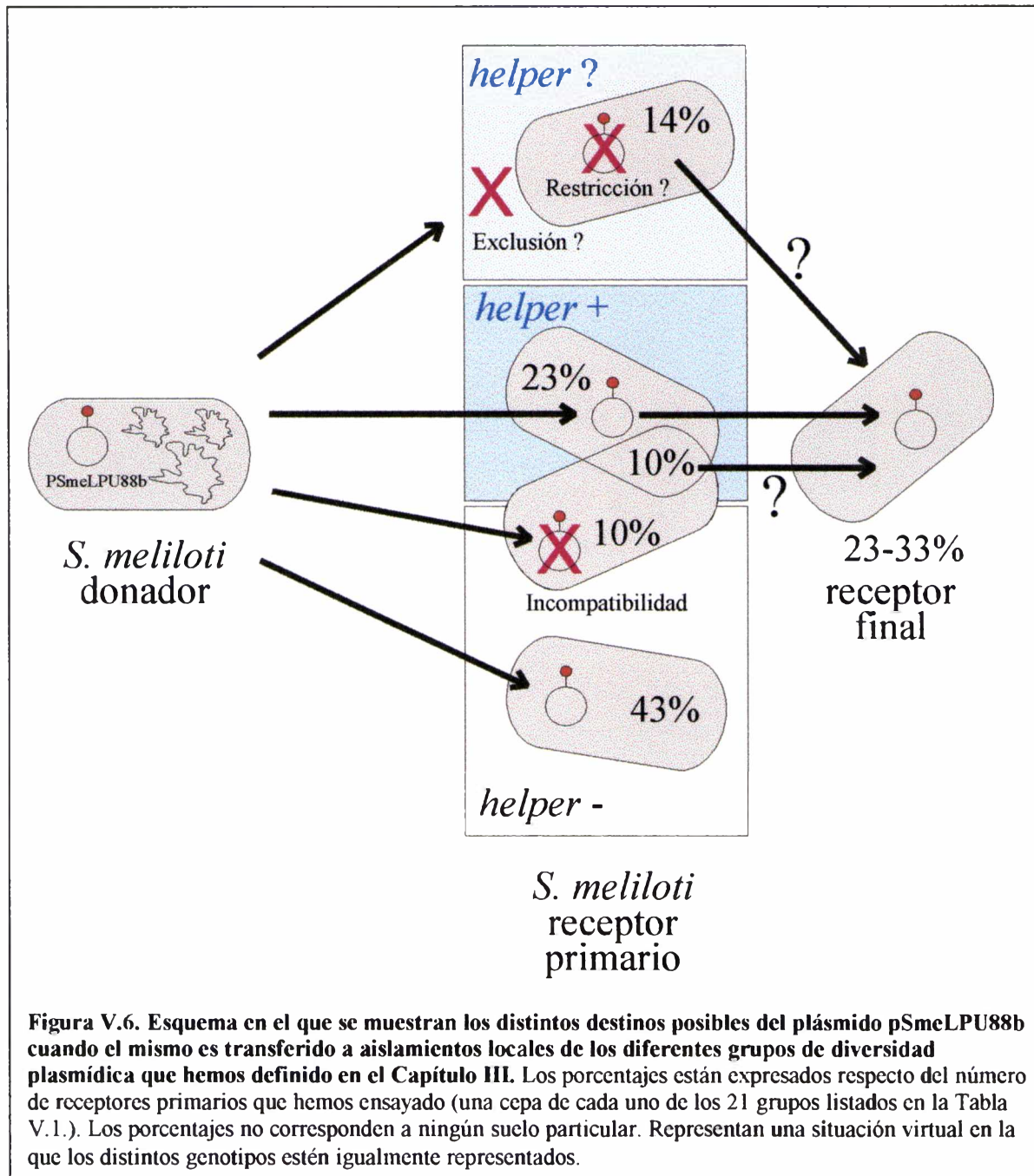
Figura V.5. Amplificación por PCR de la secuencia de inserción IS50 para determinar la presencia del Tn5 en los clones Rif^r Nm^r obtenidos de la conjugación *S. meliloti* LPU57::Tn5 (en masa) x *A. tumefaciens* UBAPF2 y *S. meliloti* LPU87::Tn5 (en masa) x *A. tumefaciens* UBAPF2. Se muestran las amplificaciones obtenidas a partir de ADN total de la cepa receptora *A. tumefaciens* UBAPF2, de los transconjugantes, y de las cepas donadoras *S. meliloti* LPU57 y *S. meliloti* LPU87, empleando cebadores específicos para las IS50 del Tn5.

En este capítulo hemos analizado la movilización de plásmidos por conjugación en el grupo de aislamientos de *S. meliloti* que presentamos en el Capítulo III. Un aspecto de interés en relación con la evaluación de la magnitud de la transferencia génica horizontal en *S. meliloti* es, en particular, el de poder estimar la proporción de rizobios que son capaces de retransferir los plásmidos movilizables que reciben. Con ese objeto, analizamos la capacidad de removilizar el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 por parte de diferentes aislamientos (Tabla V.1., uno por cada tipo de perfil de plásmido que habíamos observado). Para el conjunto de rizobios que estudiamos observamos más de 30% de aislamientos con esas características. Es muy posible que la proporción aumente si sólo se incluyen en el análisis rizobios recuperados del mismo suelo del que proviene el plásmido cuya transferencia se analiza (como LPU85, LPU86 y LPU87 recuperados del mismo suelo que LPU88, por ejemplo). Los resultados que hemos obtenido ponen en evidencia, de todos modos, una muy elevada proporción de

aislamientos que son portadores de funciones conjugativas activas. No debe descartarse incluso que aislamientos que han dado resultado negativo posean funciones de ayuda que operen sobre plásmidos diferentes del que aquí hemos empleado. Debe contemplarse también la posibilidad de que ciertos eventos de transferencia requieran de mecanismos de señalización por *quórum sensing* (como en el caso del plásmido Ti, Oger *et al.*, 1998; Piper y Farrand, 2000), y que no ha sido satisfecho en nuestras condiciones experimentales. Dado que nuestros resultados han sido obtenidos empleando el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 como sonda de movilización, una cuestión que debe ser aún más caracterizada es cuán representativas son las características funcionales del *oriT* de este plásmido respecto del correspondiente a otros plásmidos movilizables de *S. meliloti* (y aún de otros rizobios y bacterias). Al respecto, es muy posible que el plásmido que hemos empleado como herramienta de análisis no constituya un caso único excepcional con características restringidas a los ecosistemas locales dado que la cepa *S. meliloti* GR4 de origen geográfico muy distante y también portadora de plásmidos transmisibles y de funciones de ayuda, ha sido capaz de movilizarlo. Tal resultado sugiere que, posiblemente, pSmeLPU88b está relacionado en sus características conjugativas a otros plásmidos y sistemas de ayuda presentes con frecuencia en otras cepas de *S. meliloti* de distinto origen.

Un segundo aspecto que hemos podido poner en evidencia es que un 18% de los aislamientos que hemos estudiado poseen ellos mismos plásmidos transmisibles por conjugación. Sólo uno de esos aislamientos, *S. meliloti* LPU57, no ha sido capaz de movilizar nuestro plásmido pSmeLPU88b::Tn5. En relación a ello caben al menos dos posibilidades: a) dado que en la misma cepa LPU57 hemos observado un plásmido incompatible con pSmeLPU88b::Tn5 (columna 3, Tabla V.1.), es posible que las funciones de ayuda se hayan perdido con dicho plásmido al forzar la presencia del nuevo plásmido introducido (Nm), ó b) que la cepa LPU57 sea portadora de un sistema conjugativo que no es activo sobre el plásmido pSmeLPU88b. No hemos explorado aún cuál de ambas posibilidades es la que responde a la situación real. En cualquier caso, el resto de las cepas en las que hemos detectado plásmidos conjugativos han podido retransferir el plásmido pSmeLPU88b incluida la cepa GR4, hecho este que refuerza la existencia de una elevada compatibilidad en lo que hace a las funciones de ayuda (*helper*). Finalmente, y como un factor limitante de la transferencia conjugativa, hemos detectado tres casos en los que posiblemente existan fenómenos de exclusión plasmídica o incompatibilidad de sistemas de modificación/restricción (aislamientos LPU191, LPU26, y LPU118). Estas posibilidades podrán ser evaluadas forzando la movilización (con un Tn5-mob por ejemplo) de los plásmidos de dicha cepa a la cepa *S. meliloti* 2011, para determinar luego si se reproducen los fenómenos de exclusión/restricción observados en la cepa original (la cepa 2011 es permisiva respecto de la entrada del plásmido pSmeLPU88b). En caso que así sea para alguno de los plásmidos, podrá procederse luego a la búsqueda de las genes asociados al fenotipo en cuestión mediante mutagénesis y selección positiva de aquellos clones que se conviertan en receptores del plásmido pSmeLPU88b.

A modo de resumen de los resultados obtenidos en este capítulo, en la Figura V.6. se presenta un esquema que describe la proporción de los distintos fenotipos que hemos observado al transferir el plásmido modelo pSmeLPU88bb a nuestra colección de aislamientos. Cabe destacar que las proporciones a las que se hace referencia corresponden al



grupo de rizobios analizados y pueden sólo ser asimilados a los de un suelo virtual en el que todos los genotipos que hemos evaluado estén igualmente representados.

En el capítulo siguiente iniciaremos la búsqueda y el análisis molecular de funciones de ayuda del sistema pSmeLPU88a / pSmeLPU88b.

CAPÍTULO VI:

Caracterización molecular de mutaciones del plásmido pSmeLPU88a que conducen a la pérdida de la función de ayuda (*helper*).

1. Introducción.

Como se describió en la introducción general de esta tesis el mecanismo de conjugación bacteriano involucra tres etapas: (i) la formación del par de conjugación entre las cepas donadora y receptora mediado por el sistema del pili, (ii) la formación del relaxosoma acompañado por la introducción de un corte en el origen de transferencia y el inicio de la replicación conjugativa, y (iii) la transferencia de una copia de simple cadena del plásmido desde la bacteria donadora a la bacteria receptora (Firth *et al.*, 1996; Pansegrau y Lanka, 1996; Zechner *et al.*, 2000). Mientras los plásmidos conjugativos poseen los genes necesarios para estas tres etapas y promueven su autotransferencia, los plásmidos denominados movilizables poseen su propio origen de transferencia pero necesitan la ayuda (funciones *helper*) de un plásmido conjugativo para su transferencia. A partir de estudios realizados sobre los distintos sistemas de transferencia conjugativa (sistema *tra*) de diversos plásmidos, se ha observado que los mismos presentan similitudes funcionales y de secuencias a nivel de ADN y de proteínas (Wilkins y Lanka, 1993; Lanka y Wilkins, 1995). Es así que de acuerdo a las características moleculares y de organización génica se han podido definir familias de sistemas de transferencia de ADN como es el caso del regulón de virulencia (*vir*) presente en plásmidos Ti (inductor de tumores) de *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la transferencia de ADN desde la bacteria a plantas superiores (Winans, 1992). Para miembros simbióticos de la familia Rhizobiaceae también han sido reportados varios plásmidos transmisibles (ver Introducción de esta tesis, sección 5.1.). Sin embargo, las características moleculares de los sistemas conjugativos de esos plásmidos han sido poco investigadas.

En los Capítulos precedentes de esta tesis he detallado el aislamiento y caracterización funcional de un sistema plasmídico binario de *S. meliloti* en el que sólo uno de los plásmidos es movilizable. En ese marco, hemos puesto especial atención en analizar la transmisibilidad de dicho plásmido desde diferentes genotipos cuya diversidad genética describimos en la primera parte de esta tesis. A través de dicho análisis hemos conseguido información indicativa de los posibles destinos de un plásmido movilizable cuando es transferido entre cepas diferentes de *S. meliloti*. En este Capítulo mostraremos el análisis que hemos realizado para detectar y caracterizar genes de movilización en nuestro sistema plasmídico. La escasa información disponible a nivel molecular respecto de plásmidos conjugativos en *S. meliloti*, ha sido enfocada al aislamiento y caracterización de orígenes de transferencia conjugativa en la cepa GR4 (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Por tanto, y dado que nuestro plásmido pSmeLPU88b es movilizable desde dicha cepa (*oriT* funcionalmente compatibles), el análisis que describimos en las secciones siguientes ha sido complementario y orientado a la búsqueda y caracterización de las funciones de ayuda presentes en el plásmido pSmeLPU88a activas y en *trans* sobre el plásmido pSmeLPU88b.

2. Obtención de variantes mutantes del plásmido pSmelpu88a que hayan perdido la capacidad de movilizar el plásmido pSmeLPU88b.

La estrategia que hemos utilizado para la detección y caracterización de genes asociados a funciones de ayuda consistió en la obtención de mutantes por transposición del plásmido pSmeLPU88a que conduzcan a la pérdida de la capacidad de movilizar el plásmido pSmeLPU88b. Dado que en la mutagénesis generalizada con Tn5 existe una muy alta proporción de inserciones cromosomales, para detectar transposiciones plasmídicas realizamos una mutagénesis con la variante Tn5B13 (portador de funciones *mob* compatibles con el sistema de movilización de RP4) sobre la cepa LPU88, y utilizamos la biblioteca de mutantes insercionales como donadora en masa en una conjugación triparental hacia la cepa *S. meliloti* 2011 receptora (ver Capítulo IV, sección 5). En dicho ensayo y luego del análisis de 18 transconjugantes en geles de lisis *in situ* identificamos **tres clones** que sólo recibieron el plásmido de mayor tamaño y que designamos *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-2), *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5), y *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-14); **catorce clones** que recibieron sólo el plásmido de menor tamaño; y **un** clon que recibió ambos plásmidos y que designamos *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-14, pSmeLPU88b). Como ya hemos mostrado en el Capítulo IV (sección 5), esta última cepa fue capaz de movilizar el plásmido pequeño cuando el mismo fue reemplazado por su homólogo pSmeLPU88b::Tn5 marcado con Nm.

Con el propósito de establecer si alguno de los plásmidos de mayor tamaño portadores del transposón Tn5B13 había sido interrumpido en alguna de las funciones de ayuda necesarias para movilizar el plásmido pequeño, a los clones 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-2), 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5), y 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-14) les fue transferido el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 que porta resistencia a Nm. Empleando las cepas resultantes como donadoras observamos que los clones 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-2, pSmeLPU88b::Tn5) y 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5, pSmeLPU88b::Tn5) no eran capaces de transferir su resistencia a Nm a la cepa receptora *A. tumefaciens* UBAPF2. El resultado obtenido sugirió que las inserciones en los plásmidos pSmeLPU88a::Tn5B13-2 y pSmeLPU88a::Tn5B13-5 habían interrumpido genes esenciales para la expresión fenotípica de las funciones de ayuda (*helper*) en la cepa 2011.

3. Análisis de uno de los plásmidos mutantes que ha perdido las funciones de ayuda: Mutagénesis reversa de la cepa *S. meliloti* LPU88 para introducirle la alteración presente en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5.

Con el propósito de analizar las características de los marcadores genéticos asociados a las funciones de ayuda iniciamos en una primer etapa el análisis del plásmido mutante pSmeLPU88a::Tn5B13-5. Evaluamos primero el número de inserciones del transposón en el plásmido, y ensayamos luego una mutagénesis reversa de la cepa LPU88 para intentar

reconstruir el fenotipo mutante y determinar si el mismo deriva de la inserción Tn5B13 y no de otra mutación espontánea que no hubiera sido identificada.

Mediante un ensayo de hibridación pudimos confirmar que en la cepa 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5) existe una única copia del transposón. En dicho ensayo el ADN total del rizobio fue digerido con la enzima *EcoRI* e hibridado con una sonda de 1.187 pb generada por PCR empleando cebadores correspondientes a las secuencias IS50 del Tn5 (se usaron los cebadores IS50f y IS50r, y como molde ADN del plásmido pSUP1021 que contiene al Tn5, ver Materiales y Métodos, sección 5.2.). Confirmada la presencia de una única señal iniciamos la estrategia experimental de mutagénesis reversa. Para ello fue necesario clonar la inserción Tn5B13-5 con una región de ADN adyacente del rizobio en un plásmido suicida, de modo que pudiéramos realizar luego por homogenización el reemplazo de la región salvaje por la mutada en la cepa LPU88 (doble *crossing over*). El clonado de la inserción presente en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5 fue realizado por digestión *EcoRI* de ADN genómico de la cepa *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5) y ligación del mismo con el plásmido pK18mob digerido con la misma enzima. La mezcla de ligación fue introducida por electrotroporación en la cepa *E. coli* S17-1. Los clones de *E. coli* que resultaron portadores de las resistencias a Tc (marcador presente en el transposón) y Km, (marcador *nptII* presente en el vector pK18mob) fueron analizados para determinar las características de los plásmidos e insertos presentes. En dichos clones pudo confirmarse por análisis de restricción con *EcoRI* la presencia de una banda correspondiente al vector pK18mob (3,7 kb), y la presencia de una banda adicional correspondiente a un inserto de aproximadamente 18 kb. La presencia de secuencias del transposón en el plásmido recombinante fue confirmada por PCR empleando cebadores específicos para amplificar el fragmento de 1187 pb de las secuencias de inserción IS50 mencionado precedentemente. El plásmido recombinante, designado pMP2, fue conjugado desde la cepa S17-1 a la cepa LPU88 (Sm^r) seleccionando para aquellos recombinantes que hayan realizado un doble entrecruzamiento como consecuencia de reemplazar un fragmento salvaje por su homólogo mutado portador del transposón (rizobios Sm^r Tc^r, Nm^s). Sorpresivamente, ninguno de los rizobios resultantes perdieron sus funciones de ayuda, esto es, la capacidad de movilizar el plásmido pequeño pSmeLPU88b cuando éste les fue introducido. ¿Existía entonces en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5 una mutación críptica responsable de la pérdida de función y diferente a la generada por el transposón? ¿O estábamos en presencia de una mutación cuyo fenotipo es dependiente del hospedador y se expresa en *S. meliloti* 2011 (que resulta *helper*-) pero no en *S. meliloti* LPU88 (que resulta *helper* +)? La evaluación de este último punto requería de un ensayo de complementación en el que pudiera introducirse en la cepa 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5) una copia salvaje del/los genes alterados, y evaluar si se recuperan las funciones de ayuda. Dado que no contábamos con una biblioteca genómica de la cepa LPU88, para el experimento de complementación decidimos investigar la secuencia y estructura génica de la región alterada obteniendo finalmente por PCR el fragmento salvaje para el ensayo de complementación. En la sección siguiente presentaré los resultados que he obtenido a partir de los datos de secuencia.

4. Secuenciamiento y análisis de la organización genética de la región interrumpida por el transposón en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5.

Para determinar la secuencia nucleotídica adyacente al transposón en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5, el ADN del rizobio sito a cada uno de los lados fue subclonado a partir del plásmido pMP2 (las secuencias repetidas inversas de las IS50 presentes en ambos extremos del Tn5B13 impiden el secuenciamiento desde el transposón hacia el ADN del rizobio sobre el clon pMP2 completo). Se digirió entonces el plásmido pMP2 con las enzimas *EcoRI* (con la que se libera el inserto de 18 kb) y *BamHI* (enzima que reconoce un único sitio en el transposon Tn5B13). Los productos de esta digestión fueron ligados por un lado al vector pUC18 digerido con ambas enzimas, y por otro con el vector digerido solamente con *BamHI*. Para recuperar uno de los fragmentos adyacentes al Tn5B13 se seleccionaron transformantes resistentes a Tc, ya que al digerir con *BamHI* la secuencia que codifica para la resistencia a Tc queda en uno de los extremos del transposon. Los clones que poseían al fragmento adyacente al otro extremo del transposón fueron seleccionados por ausencia de actividad β -galactosidasa en medio LB con X-Gal y por su sensibilidad a la Tc. De estos clones seleccionados, se aislaron sólo los que por PCR dieron señal positiva para la presencia de secuencias IS50. El secuenciamiento de las regiones de ADN adyacentes a cada uno de los lados del Tn5B13 se realizó empleando los dos clones precedentes leyendo en cada uno de ellos desde el extremo de la secuencia de inserción IS50 hacia afuera del transposón. Determinamos de ese modo el sitio exacto de inserción verificando además la repetición de 9 pb característica de la transposición Tn5. El secuenciamiento fue extendido aproximadamente 2,4 kb hacia cada lado de la inserción empleando cebadores diseñados cada 400-500 pb (*primer walking*). La secuencia de 4959 pb que hemos obtenido se presenta en la Figura VI.1.A.. La misma fue analizada para determinar el tipo y número de marcos de lectura abiertos (ORFs) potencialmente presentes mediante el uso del programa ORF *finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.htm>), así como posibles sitios de inicio de la traducción y de unión a ribosomas (existen sólo unas pocas secuencias consenso para promotores de rizobios). En la Figura VI.1.B. se muestra la posible estructura de ORFs del fragmento que hemos secuenciado. La comparación de la secuencia de ADN y de sus productos de traducción contra la base de datos de GenBank no arrojó similitudes significativas, excepto para el ORF *ccp* que mostró 35 % de identidad a nivel de su producto de traducción con la citocromo c peroxidasa de *Pseudomonas aeruginosa* (AAB50671) (Ridout *et al*, 1995). En nuestro fragmento dicho gen se encuentra incompleto con el sitio *EcoRI* terminal que une el inserto al vector muy próximo al su extremo 5' del gen. Respecto de la inserción Tn5B13, la misma se encuentra interrumpiendo el marco de lectura *rpt1* que hemos propuesto (173 aa, 19kD) dando lugar a un producto de traducción truncado de 51 aminoácidos. Como ya hemos mostrado el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5 que posee mutado dicho gen no expresa funciones de ayuda en la cepa *S. meliloti* 2011. Contrapuesto a ello, la misma mutación en *rpt1* en la cepa LPU88 resulta en un fenotipo de ayuda salvaje.

A

ACTAAGCATATAATCGGCGTACAGCGAGCCGGGGCGGCTGCGCTCGAAGTGATAAAGGCATAGCAATCTCGACAACCGTG/
 CCCACGGTGCAGAAAAAATTTGGCAATCCGACGATTTTCGGGCGTGGCATTCAGTGATGAAAAATTACCAACGCCTGA/
 GAGCGAGCCGCTCTCGGTGATCTTTGCCCAAACGACGTTGTTCTCTTCGACGTCAGTAGAATGTCCGATGGAAATCTG/
 CCACCATCGTGCCCTTCAAAGCCCTGACCGCTCCCGCTCGGCTCATCGTAAAAGCTTGAATCAGACAGGGTCTGGTCC/
 AAGGACACAAAACCTCGTCGATAGTTTCTATCCTCTTCGCCCCGAAAGGCCCGGCCGCGTTCGAGGATGAAATCCGTT/
 TTTCTTCGCTTCTCACCGCGCCGCGCCCGCTCGTCCCAACGATCAAGCCAATTATGATACACTGTGGTTGCTTCC/
 ACTCGCTTGTTCGCCATCGCCCAAACCTTGGATCAAAGAGGCCGTATGTCGCGAGCAGCACTCCAACGCCGAGGAGGAT/
 AAAAGCCCTCAAAGGCGTCGATCAACAAGTAGCTGGCAAAGAGCAATCTACGACTGCAGACATCTCTTAGAGGCAC/
 GAAACCGCTTTCCGACACCCAAGCGGATGGAACCGTACAGAAAACGATACAGGTCGAAATGGCGACTAGGAGGCTGCT/
 AATGCGTTGGCATTCTATAGCTGAAGCTATTGCCGCGCTCGTGGCGTTCATACAGGGCCGAGACATATCGTGGACTAT/
 AGGTCACGATATCTCTTCGTTTCGAGCTCAGGTAAGAGCTTTGGACCTTCATGCATATGGCGACCAGAACCCAGGAC/
 TACACCGGAAAAATCCCGCATCACCTAAGGCCGATTTACCAGCCCTCGCGCCGATGTTGCACCGCCGATCGTTGA/
 CCTCTTCAATCTCCAGAGATCATGGACGATCGTATGAAGCAGAATGAGGCCCGGAAAAAAGAAAAAGCAGAGGGA/
 TGTAGAGATATGCGAGCGCCGTGAAAACAATCGAAAGCGGCACTGATATAACTTCAGGGCGCACAATGGCTAACTTGC/
 AATCTATCGCATAGTTGCCACCGCCGTTGATCAACGGGATCAAGCACACGCCGATCCATTGAAAAAGACCGGGGAACAT/
 CGCAGATCAAGAAAACCGCCAGTATGTGCACGAATAAGCTTGAACGTTGCGCGTCCAGGCGTCTGCTGCTTTCCAACCG/
 CACCTGCGCTACGAGCTTGAAGCGCGCTCTGTTTCCAGAAGACCAGCAGCTCTATCACGAACCGAAGAACAGCGG/
 AGAGCACCATGAAGAGGAACGTCCAGTTTCGGAGCCATAGAAAACCGACCTGCTTAACGAGACCATCCGGCCGGCTATA/
 TGGCGCTGTGGATCCCACGATATAAGACAAAACCAAGAGCTGTGGCACCCGCAACACCGACGCGCGTAAATTCAC/
 GAGATCCACGACTAAAAAGCGCCTCCGATCTCTCGCCAAAGCTGAAATGCCGACTTGGCCGGTTGAAGGCAAGTATCGCG/
 CCAGGCTCTCGGGACGTTGTCTCATCATCGACGGTAGCAGTCCGCGCCGATCAGAACCCTCTAGCACACCGCTGCT/
 CCGGTTTCTTCAATCTCGCCTCTTGGCCGTAACCGAGATGCGCCGCACTAAGTTCCATCTGCCATTCCCGGTTGC/
 CCGGATCATCGCAGCCAAAAATCCTTGCAGCCAACGAATGTTGGCGGTGCTAATTCCTTTTCGTTCTCTTGAAACCA/
 GCTGCACTGTTTCGAGATCAACCCCGATCCGGTTGGAATCAATCTTTGAAATCGCCTCTGCAAGAAGCTCGGGCCTCA/
 GACCTGCGGGGAACCCATCGCTGCCAGGGGCGACCCGCTCCGGCCGAGTTAATGTTTTAACAGCTCTTTGAAGTC/
 TCCCATCTTTCCGGGGGTAAGAAATAATTTCCATCTTGATCAAGGGCTTACGGGCTCTGTTTCGTTTGGTTTCG/
 GTTTCGATCCTGTGCTGTGCCCTCAAATCACGTTCTTATCAACGGGGCGCAACTTTTTAGCCGTTTCAAGTTGAAG/
 CGCAACTGTTGGAAGGAGGGGTCTTTTGGCGTGGTGAAGCACTCAAT**ATGCGCATTTTGTTCATCTCAGCGTTTCA**/
GTCCAGAGACTCACAGCTCATCAAGTTTCGCTTCGGTCTATAACAGCGGGTTCATGCTCCGAGAATGCGCGCGGCTTT/
GCACGTTAGCTTCCGACGGTATTTCTCATATGGAAGTCGGGGACCTGAGGTGGGGAAGGGACACGAGGAAAAATGAGAC/
AAATTGTGGTTCCCTTGGTGAAGTTGATAGATCGCCATATCGTTCGCAACTGGCGACTATGGACGCCGTTCTGACGTC/
ATGAACGAAGGGCAACCGCGAAGTTACGAACGTCACCTATGCGAACCGACTTTTGGGCGTCCGCGGGATGAAGAAGC/
GCTGGATGGCGATCGTCGATTGCAGACCCCGAGCGATCGGGAATCGAGGCTGAAGCTGACGTATATGGCGGCTTACCT/
TGGCAACACGGGGCACCTGACTGCCGATGAGCTGAGATCCGCTTGGAAAGCCCTCGTGATCGGCCGAACGCATCCAT/
CCTGAATCTCTTCTTATGGCGACTGCACAATGATGGCTGAGGCGACAAGCTCTGCCACTGGATACCGCAGCGGACCC/
CGGAAATTTCCGCGGGGGCGCGTGTATTTCCGCTACCCGGTTCATTTGCAGCGGGTCCCTTTACCGAGAGTGTCTG/
GGCTGCCCGCAGATCCGCGAGTGAGCGCTTCCGGCTGCTACCAGGCTGCGAAGTGTCCGACCTTATCGTTAGATGTTAT/
GTCGACCGGGCGATATGGGCTCTGATCAGCAAGATGAGGGGCGACAGCAGAACCAGACAGGGCAACCCAGTCCGCC/
GACAGACCGGGAGATGCTATTCCAGGCGGTCTGATCATCTCGGAGAGACGGTGGAGCGGGATGCGATCGTCGAACTTGG/
ACTATGATATGCGCGAGCAACCCCGGACCGGGCTTGCCTCGATCCGCTTGGCTCACTCAGACCTCCGGATTGCCAATGG/
GGCCGAGCAGCAAAATCGAGCACGCATGCCATGGAATAGCCCGCTGAACGGCTTCGGCCGTTGGCAAGCTTCAGAC/
CGTTTACTTCAGACGAAGCGAGTGCGTGAGGTTAATCCGCTGGCCGGGGCGCATCGTCACGGTGAGGTACTCGCGCCG/
GGAGGGTGCCAGAGCGGAGCCGGTGTGGCCGGCTGGAATGTCGTTGATGGCGAAGGCCCATCTCTGTCGGCGACC/
ATAGTACGGGTTTCTCGCCACAAAAATCCAGGCTCTCCATAAAGCTGTGAATGCCCGAGGTGAGCGCACACATTTCCG/
CGTCAACGTTACCGGCAGCTCCAGATCTGAACCGCCCGGATATTGGCCAACATTTGGGATTCACGGGAACCCCGCCG/
CACCTCAGAGACATGGATGTTGTGCGTAATTGAATCGAGGTTGGCAGGGCGCAGACGGGCGTTCCGTTCCATTGACGGG/
AGCCGAGATAAAGCGGCAGCCCTTTTGCATGATCTCGGCTGTTGGTTGGTGGCAAAGGGCTTGCACCCGACAATGTCG/
AAAGAATATGATGGCACCGCAAGCCCGCGCCCGCGCAAATCTTCGCTAACATGCGTTGTTGCCGAGATTTCC/
ATCTTTGGTAATCAGGATGCGCTCTGTGATGGGGACGTGATCTGCCGCCAAAATCCTACCTCCAGGCGCCCGCCCA/
AACCGGACGTTCTGGTAAGTGACGCTCGCCTCTCCGAAGCAAGGGGCGACGAAAGCGGCAAGAAGCGCGAACGCA/
ACTTGCAGACGCAATGGTGCAGCATGGCGTTACTCCGATAAAGAGGGCAGGCTCGGCCGCTCGATGGTGAATTTGTTGG/
CACCTCAGGCATTTCAGGAAGGCGACGAGATCCTTACCCTGCTTCTGTCAAGTCGATGGGCGCAGCTCGGAGCCTGT/
CATGTCGGGTGCGTTGTAGAAATCGACAACCTTCGCGGAGCGTCCAGAAGGCGCCATTGTGCATGTAAGGCGCTGTATA/
TCGTGTGCCGGAGCGGGGCTGTACGAAAGGCCCCCGATCGGCAAGATTGGCGGTGACGAGGAAGCGACCAGGATCTTC/
TGAGTGCCATCGCACTGCCGAGCGCTCAAGGACCTTGAAGCAAGGTTGACCTGCAGAGGGCCGCTAGCGGCCAGTTG/
CGGTATCGGGGACCTGGTACGTTGAAAAGCTTCCGTAAGAAAGCGTCCATTATGACACGACGTGCAATTTGGCCTT/
CAGAAAACACCTTCATGCCGCGCGTGGCCCGGGGAGAGTGGCTCATGCTCGCCGCGCAGGAACCTGTGCAACGGCGT/
CCGTGTGACGAGGGTGCCTCGAACGCGCGATCGCGGCCAAAATGTCCGCTTCTGCCAGCCGCTACTGTTGAAGAG/
TCCCAATACGTTCCATATATTCCGGTATTTCTGTAGGCGCGGATCATTAAATGCGGGATGGCCGTTGCCCTCGATCGG/
TCGTCATCGCCGCGGGGCTGCTCTTCGAGGCTGCTTGGCCGCCATCCAGAAAAGGCGTTTCAGGAACCCGGAATTC

ORF3

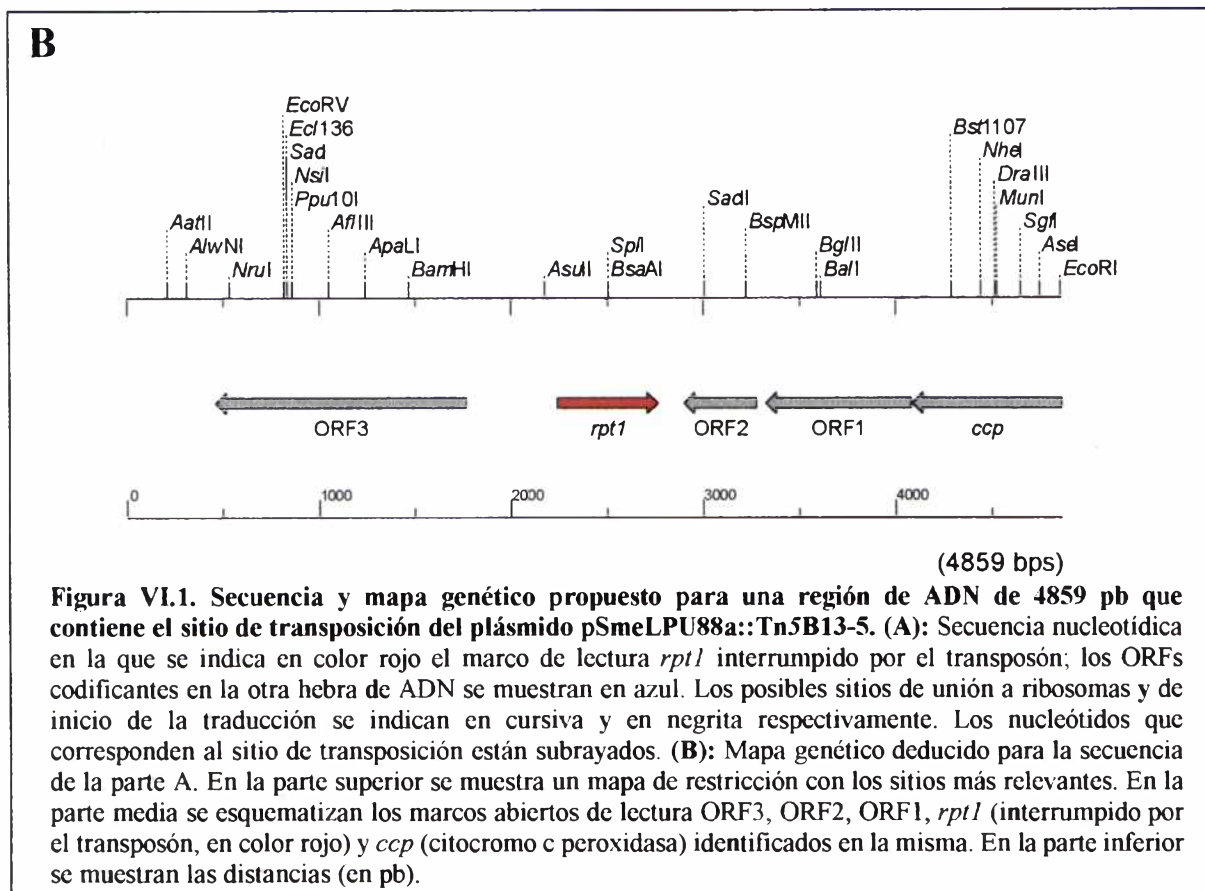
rpt1

ORF2

ORF1

ccp

(Figura V.1., continúa en la página siguiente)



La organización génica que se presenta en la Figura VI.1.B. indica que si la inserción Tn5B13-5 es la responsable de la pérdida de funciones conjugativas en la cepa *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5), tal alteración deriva de la disfunción primaria en un único marco de lectura (*rpt1*). La orientación opuesta de los ORFs que se encuentran localizados río abajo (*downstream*) de *rpt1* indica que no deben existir efectos polares del transposón sobre estructuras de tipo operón.

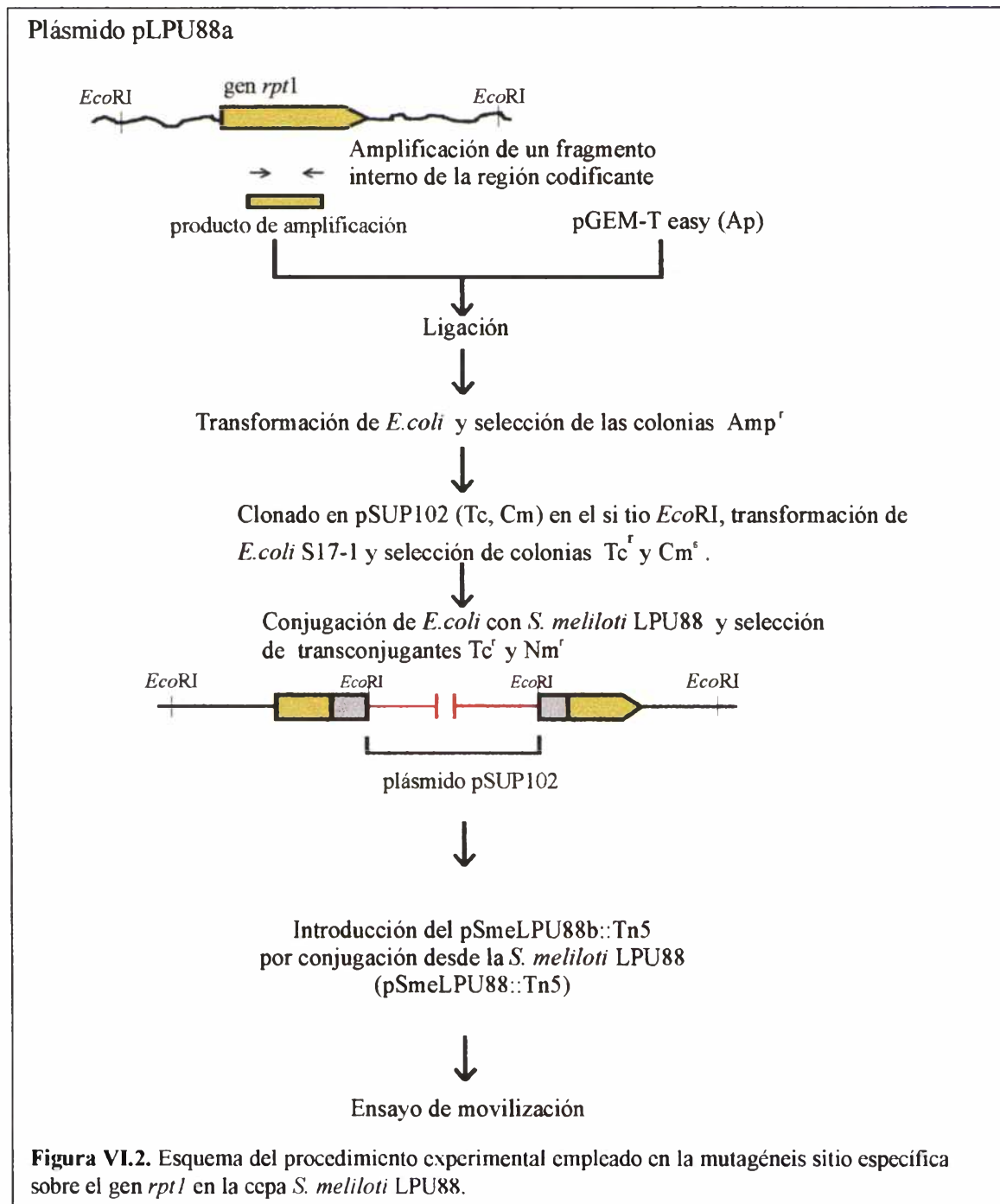
5. El requerimiento del gen *rpt1* para las funciones conjugativas de ayuda es dependiente del hospedador. Ensayos de complementación.

Con la información colectada hasta el momento realizamos los siguientes ensayos que nos permitieron confirmar el requerimiento de *rpt1* para la expresión de funciones de ayuda en la cepa *S. meliloti* 2011, pero no en la cepa LPU88.

Mutagénesis sitio específica de rpt1. Consecuencias fenotípicas sobre las funciones de ayuda en S. meliloti LPU88 y en S. meliloti 2011.

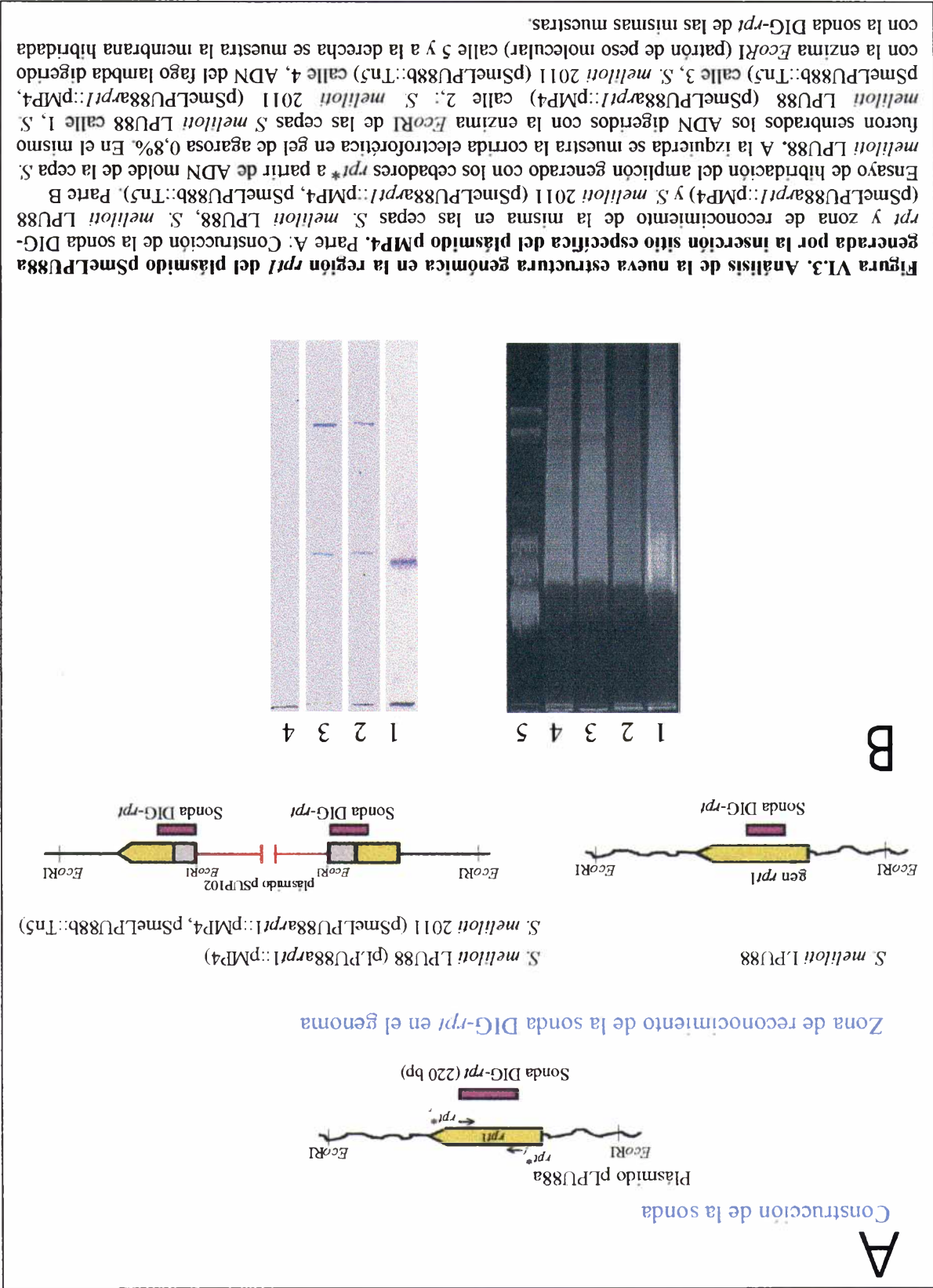
En primer lugar verificamos nuevamente que la mutagénesis de *rpt1* en la cepa LPU88 no conduce a la pérdida de su capacidad de movilizar el plásmido pequeño pLPU88b::Tn5. En la sección 3 de este capítulo habíamos obtenido ese resultado por homogenización de la mutación Tn5B13-5 original en la cepa LPU88. Dado que disponíamos ahora de la secuencia

del gen interrumpido *rpt1*, realizamos una mutagénesis insercional sitio específica con el plásmido pMP4 según se esquematiza en la Figura VI.2.. Los transconjugantes resistentes a



Sm y Tc obtenidos fueron analizados por hibridación según se muestra en la Figura VI.3. (panel B., calles 1 y 2) para confirmar su genotipo. Los rizobios mutantes *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88*arpt1*::pMP4) que analizamos resultaron capaces de movilizar el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 que les fue introducido. Los resultados que he obtenido muestran que dos mutantes independientes en *rpt1* generados ya sea por transposición/homogenización

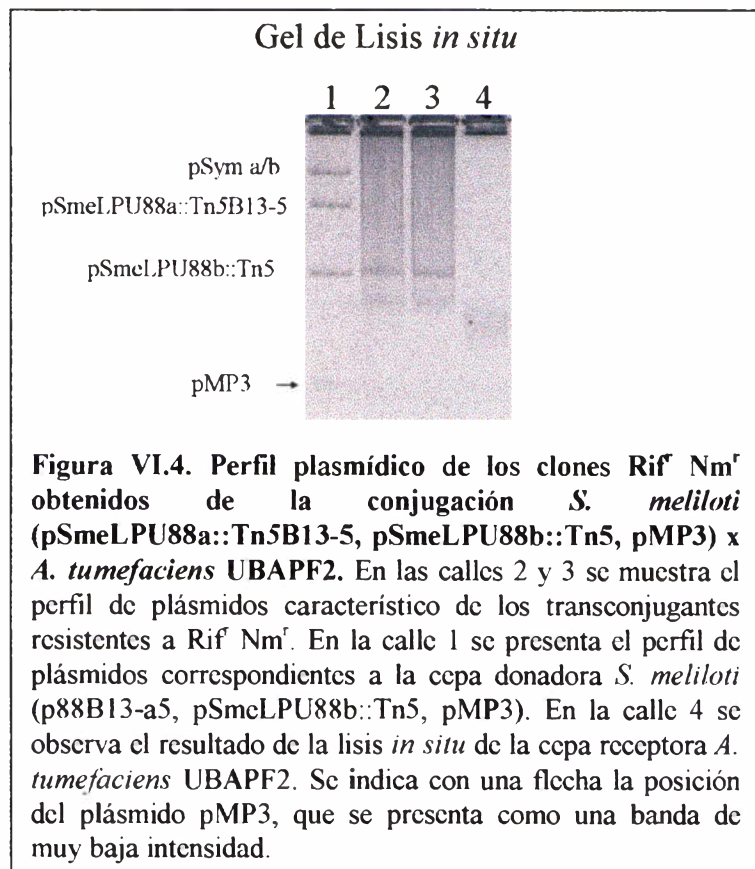
(sección 3) o por integración sitio específica del vector pSUP102 (esta sección) mostraron el mismo fenotipo positivo de ayuda en la cepa LPU88. Sin embargo, y en concordancia los resultados previos que he mostrado, la transferencia del plásmido pSmelPU88arpt1::MP4 a



la cepa *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88b::Tn5) mediante una conjugación triparental resultó en la pérdida de la capacidad de movilizar el plásmido pequeño. Estos experimentos se repitieron cuatro veces en forma independiente y en ningún caso se obtuvieron transconjugantes. Para controlar todo el procedimiento experimental realizamos en forma paralela una conjugación empleando la cepa *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) como cepa donadora, obteniéndose en todos los casos transconjugantes resistentes a Rif y Nm. La estructura genética de la región *rpt1* en la cepa *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::*rpt1*::pMP4, pSmeLPU88b::Tn5) fue confirmada por hibridación según se muestra en la Figura VI.3., panel B calles 3 y 4 confirmando que en la misma no han existido rearrreglos en la región de *rpt1* detectables por hibridación luego de la transferencia del plásmido mutado.

Complementación del mutante *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5) deficiente en las funciones de ayuda empleando el gen *rpt1*.

Para complementar la pérdida de función del gen *rpt1* interrumpido en el plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-5, se clonó la secuencia codificante del gen salvaje en un plásmido replicativo que se introdujo luego en la cepa *S. meliloti* 2011 (pSmeLPU88a::Tn5B13-5, pSmeLPU88b::Tn5). En un primer paso se amplificó por PCR un fragmento de 1.336 pb que incluye tanto a la secuencia codificante como el inicio del *orf2* y la terminación del *orf3* (nucleótidos 1646-2981 de la Figura VI.1.A). El producto de la amplificación obtenido fue luego clonado en el plásmido pGemT, liberado mediante la enzima de restricción *EcoRI* y ligado finalmente al plásmido movilizable pSW504 (replicativo en *S. meliloti*) generando el plásmido pMP3. Este último fue transferido a la cepa de *S. meliloti* (pSmeLPU88a::Tn5B13-5, pSmeLPU88b::Tn5) por conjugación desde la cepa la *E. coli* S17-1. Para verificar la presencia del plásmido pMP3 en el rizobio, y si su presencia es compatible con los plásmidos pSmeLPU88a::Tn5B13-5 y



pSmeLPU88b::Tn5, transconjugantes tomados al azar fueron analizados por el método de lisis *in situ* habiéndose confirmando la presencia de todas la bandas plasmídicas esperadas (una banda correspondiente a los megaplásmidos simbióticos y tres bandas adicionales) (Figura

capacidad conjugativa? ¿dichos cambios están asociados al Mpf (*mating pair formation*) o al Dtr (*DNA transfer and replication*)?

En otros sistemas conjugativos se han descrito genes que no son indispensables para la conjugación dentro de una misma especie habiéndose sugerido que podrían ser importantes en conjugaciones interespecíficas (Lessl *et al.*, 1993). Sin embargo no se han descrito hasta el momento genes cuya requerimiento absoluto dentro de una especie dada sea dependiente del genotipo bacteriano donador. Teniendo en cuenta la variada filogenia de la familia Rhizobiaceae y al mismo tiempo la extendida capacidad replicativa de los plásmidos de *S. meliloti* (en diferentes especies de rizobios y en *Agrobacterium*), puede pensarse que la disponibilidad de funciones conjugativas como *rpt1* que estén en los propios plásmidos favorecerán la movilización de los mismos en aquellos casos en los que el genotipo receptor no provea funciones equivalentes como es el caso de *S. meliloti* 2011 y posiblemente de otros rizobios. Recientemente hemos podido confirmar que el plásmido pequeño pSmeLPU88b es capaz de replicarse en *R. etli* y *R. leguminosarum*. Será importante analizar entonces si en los mismos rizobios replica el plásmido de mayor tamaño pSmeLPU88a, y en caso que así sea analizar si sus funciones de ayuda se expresan y son o no dependientes de *rpt1*.

DISCUSIÓN GENERAL
CONCLUSIONES

La comparación y análisis de secuencias nucleotídicas de genomas parcialmente secuenciados y de genomas completos, muestra que la evolución bacteriana ocurre a través de un muy activo flujo horizontal de información genética entre especies del mismo y de distinto género (Davidson, 1999; de la Cruz y Davies, 2000). En este contexto, la transferencia horizontal de genes en bacterias ha adquirido un sentido sustancial para la comprensión de muchos procesos adaptativos, de procesos de asociación y de agresión entre organismos, y particularmente para la interpretación de procesos básicos de evolución genómica en bacterias a nivel molecular. Estudios recientes empleando información de genomas completos han permitido determinar, por ejemplo, que durante el proceso que dio lugar a la separación de los linajes de *E. coli* y *Salmonella* han tenido lugar 234 eventos de transferencia génica horizontal (Davison, 1999).

Desde el punto de vista práctico, el conocimiento de los mecanismos y procesos que determinan el éxito de los eventos de transferencia génica horizontal en bacterias será determinante para el diseño de estrategias que permitan disminuir la diseminación no controlada de marcadores transgénicos desde cepas recombinantes a poblaciones naturales con la consecuente pérdida de biodiversidad. El avance del conocimiento de base en esa dirección será asimismo importante para disminuir los riesgos de diseminación de nuevo germoplasma introducido asociado a la liberación masiva de microorganismos no recombinantes con fines agronómicos (para mejorar por ejemplo la fijación biológica de nitrógeno, el control de hongos y bacterias fitopatógenas, la estimulación del crecimiento de plantas, el control de insectos, y la bioremediación de zonas contaminadas con compuestos xenobióticos). En este sentido son lamentablemente muy pocos los casos en los que se ha caracterizado la actividad de varios de los organismos liberados respecto de su contenido de elementos móviles y la frecuencia de transferencia de los mismos a la comunidad bacteriana del suelo.

De las tres formas conocidas de transferencia génica horizontal: transformación, transducción y conjugación; esta última es considerada en condiciones de suelo como la más significativa desde el punto de vista cuantitativo. Entre los miembros de la familia Rhizobiaceae, la biología y genética molecular de los plásmidos transmisibles de *Agrobacterium* spp. han sido intensamente caracterizadas. Pero por el contrario, es muy escasa la información disponible sobre las características de los sistemas de movilización de rizobios en los que paradójicamente se han encontrado varios plásmidos transmisibles incluidos algunos de los simbióticos (Mercado Blanco y Toro, 1996).

En este trabajo de Tesis enfocamos la búsqueda sistemática y la caracterización molecular de sistemas genéticos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación en la bacteria fijadora de nitrógeno y simbiote de alfalfa, *Sinorhizobium meliloti*. Para el desarrollo del estudio, construimos y caracterizamos genotípicamente (Capítulo III) una colección de aislamientos de *S. meliloti* que recuperamos de suelos locales. La caracterización genómica de esos aislamientos fue realizada mediante la generación de "huellas digitales" por PCR empleando cebadores MBOREPI (establecimos 13 grupos diferentes de acuerdo a los patrones de "huella digital" genómica). Analizamos además la

diversidad de plásmidos presentes (analizados por su tamaño), así como su distribución entre los diferentes aislamientos (los perfiles obtenidos fueron clasificados en 22 grupos de acuerdo al número de bandas plasmídicas y a su movilidad electroforética). El análisis conjunto de uno y otro estudio mostró que existen con frecuencia perfiles plasmídicos diferentes asociados con perfiles de "huella digital" genómica que son indistinguibles (y *vice versa*). La independencia entre la constitución genómica de los rizobios y su contenido plasmídico fue asimismo confirmado mediante el análisis numérico de índices de diversidad calculados a partir de ambos caracteres independientemente y en forma combinada. Estas observaciones dieron sustento formal a la posible existencia de una activa transferencia plasmídica en *S. meliloti*. La extensión de esta observación debe de todos modos considerarse con cautela dado que la diversidad de tamaños entre plásmidos puede generarse no sólo por transferencia horizontal de replicones sino también por integración/resolución de varios de ellos (incluido el cromosoma). Aún considerando esta última alternativa, son varios los estudios que reportan el carácter transmisible de varios plásmidos de rizobios (García de los Santos *et al.*, 1996; Mercado Blanco y Toro, 1996).

Iniciamos entonces, la búsqueda de plásmidos transferibles dentro de nuestros propios aislamientos (Capítulo IV). La utilización de una mutagénesis generalizada por transposición de la cepa LPU88 y la posterior conjugación en masa de la biblioteca de mutantes con una cepa receptora *S. meliloti* 2011 Sp^f, nos permitió recuperar el plásmido movilizable que hemos designado pSmeLPU88b y que utilizamos sistema modelo a lo largo de este trabajo. Ya hemos comentado que la cepa LPU88 fue escogida para iniciar la búsqueda de replicones móviles en razón de que su perfil plasmídico era muy similar al de otras cepas de su mismo suelo, a excepción de la presencia del plásmido que luego fue movilizado. La sospecha inicial de que el plásmido pSmeLPU88b no fuera conjugativo (autotransmisible) debido a su pequeño tamaño (aprox. 22 kb) fue confirmada al determinar su incapacidad de ser retransferido desde *S. meliloti* 2011 Sp^f a una tercera cepa. El estudio de las propiedades de movilización mostró que el plásmido pSmeLPU88b es movilizable por conjugación sólo en presencia del plásmido de ayuda (*helper*) pSmeLPU88a (aprox. 139 kb) que también está presente en la cepa LPU88. La transferencia de este plásmido a *A. tumefaciens* debió hacerse por incorporación de un sitio *mob* -presente en el Tn5B13- compatible con el sistema *tra* de RP4). Ninguno de los plásmidos pSmeLPU88a/b pareció modificar significativamente la competitividad de la cepa *S. meliloti* 2011 a la que dichos plásmidos le fueron incorporados.

La presencia de sistemas naturales binarios de movilización como el que hemos encontrado plantea la cuestión de si tal estructura es sólo la consecuencia fortuita de la pérdida de una parte del sistema conjugativo por parte de los plásmidos, o es el reflejo de un mecanismo natural más general destinado a preservar la excesiva diseminación de caracteres que están depositados en elementos móviles. Es evidente que la frecuencia de propagación del plásmido movilizable pSmeLPU88b estará siempre condicionada (limitada) al arribo del mismo a genotipos que sean portadores de funciones de ayuda compatibles. La existencia de sistemas de movilización divididos no parece ser una característica infrecuente en *S. meliloti*. El otro sistema que ha sido estudiado en detalle es el que está presente en la cepa GR4 y

también presenta uno de sus plásmidos, pRmeGR4b, cuya movilización depende de la presencia del plásmido acompañante pRmeGR4a que en ese caso es autotransmisible. La relación entre ambos sistemas plasmídicos pSmeLPU88a/b y pRmeGR4a/b parece extenderse también a la compatibilidad de sus sistemas de transferencia conjugativa según hemos demostrado en el Capítulo V (sección 2). En efecto, el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 ha sido movilizado desde cepas derivadas de *S. meliloti* GR4 y que son portadoras del plásmido de ayuda pRmeGR4a. Cuando el análisis fue extendido a aislamientos locales representativos de cada uno de los grupos de perfiles plasmídicos que habíamos establecido encontramos que más de 30% de ellos eran portadores de funciones de ayuda capaces de movilizar el plásmido pSmeLPU88b. No tenemos conocimiento de estudios similares en los que se haya evaluado, con una colección de rizobios genotípicamente diversa y bien caracterizada, la proporción de estirpes que comparten sistemas de movilización compatibles. La muy elevada proporción de cepas con funciones de ayuda que hemos encontrado proyecta una situación en la que puede imaginarse que 1 de cada 3-4 eventos de transferencia estarán nuevamente en condiciones de propagar la información recibida. Considerando además la complementación cruzada del sistema pSmeLPU88a/b con el presente en la cepa GR4, es muy posible que los mismos tengan una amplia distribución en *S. meliloti*. El haber utilizado una colección como la descrita en el Capítulo III (ver sección 5, índice de Shannon cercano al valor de su tendencia asintótica) hace muy probable que en relación al germoplasma local los resultados obtenidos tengan significación más allá del grupo de rizobios analizados.

Si bien hemos detectado la presencia de 3 nuevos plásmidos movilizables en las cepas *S. meliloti* LPU57, LPU87, y LPU172, los mismos no han sido caracterizados en este trabajo. Cabe sin embargo hacer un par de observaciones respecto de los dos primeros rizobios. La cepa LPU57 mostró una perspectiva interesante respecto de la posible existencia de otro sistema de movilización diferente al que aquí hemos estudiado: LPU57 no ha sido capaz de movilizar el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 pero ha transferido uno de sus propios plásmidos. Debe decirse sin embargo que cuando se introdujo el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en LPU57 la misma perdió uno de sus replicones que bien puede haber sido el portador de las funciones de ayuda. Esto resulta sin embargo poco probable dado que dicho plásmido posee un tamaño que parece demasiado pequeño como para soportar funciones de ayuda (aprox. 20 kb). La cuestión de si existe un nuevo sistema conjugativo está abierta y podrá ser dilucidada mediante la evaluación de la capacidad de ayuda de los distintos plásmidos de la cepa LPU57 sobre el plásmido pSmeLPU88b. Finalmente, y en relación a LPU87 cabe mencionar que: a) pertenece al mismo suelo del que fue aislada la cepa LPU88, b) pertenece al mismo grupo de "huella digital" genómica que LPU88, y c) además de los pSym sólo posee el plásmido que moviliza (conjugativo?) y el mismo es levemente mayor que el plásmido pSmeLPU88a. Cabe preguntar por tanto si el plásmido pSmeLPU88b ha llegado al aislamiento LPU88 desde otra cepa como ha sido nuestra suposición inicial, o si el mismo se ha originado a partir de la resolución de un plásmido de mayor tamaño (como el presente en LPU87) en dos replicones independientes: uno de ellos portador de las funciones de ayuda (pSmeLPU88a) y el otro del origen de transferencia (pSmeLPU88b). El avance sobre estas cuestiones referidas al origen

del plásmido pSmeLPU88b requerirá de la preparación de sondas específicas de cada uno de los replicones para investigar posibles relaciones entre los mapas físicos de los mismos.

El conjunto de resultados que hemos obtenido en los Capítulos III-V y que he comentado en las líneas precedentes han permitido el aislamiento y caracterización funcional de un sistema binario de transferencia conjugativa, así como su distribución y relación funcional con distintos genotipos locales de *S. meliloti* previamente sistematizados. Sobre esa base, en la etapa final de este trabajo hemos intentado avanzar sobre la caracterización molecular del sistema conjugativo. En particular, hemos iniciado la identificación de genes esenciales para la expresión de las funciones de ayuda (los estudios moleculares realizados con la cepa GR4 han enfocado esencialmente el aislamiento y análisis de los orígenes de transferencia conjugativa (Herrera-Cervera et al., 1998)). Para ello se generaron mutantes deficientes en el fenotipo de movilización a través del empleo del transposón Tn5B13. De los 18 transconjugantes que analizamos en los que obtuvimos transposiciones sobre los plásmidos, sólo 2 localizadas en el de mayor tamaño condujeron a la pérdida de la capacidad de movilizar el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 desde la cepa *S. meliloti* 2011. El análisis de uno de esos mutantes permitió identificar un marco de lectura que hemos designado *rpt1* cuya interrupción condujo a la pérdida de movilización en la cepa 2011. La orientación de los marcos de lectura localizados río abajo de *rpt1* en la hebra complementaria de ADN mostró que el fenotipo de pérdida de la función de ayuda no se debió a efectos polares generados por la transposición. Como hemos mostrado en el Capítulo VI, el sólo clonado de un fragmento de 1.336 pb que contenía el gen *rpt1*, y posiblemente su promotor, fue suficiente para restaurar las funciones de ayuda en la cepa 2011.

Una de las características más interesantes del gen *rpt1* ha sido su estricto requerimiento para la actividad conjugativa en la cepa 2011 pero no en la cepa LPU88 de donde hemos aislado el sistema binario pSmeLPU88a/b. Es posible por tanto que la cepa *S. meliloti* 2011 carezca de algún elemento estructural/catalítico que es aportado o activado por la presencia de *rpt1*. Cabe además mencionar que el ADN total de la cepa LPU88 digerido con *EcoRI* da una única señal de hibridación cuando se emplea una sonda interna a *rpt1*, hecho que pone de manifiesto que en esa cepa la mutación *rpt1* no es funcionalmente compensada por una copia extra del mismo gen. Resulta aún una cuestión abierta el modo en que el producto de *rpt1* es entonces sustituido por otro(s) componente(s) celular(es) en la cepa LPU88. Es posible que el reconocimiento de los genes de LPU88 asociados a la supresión fenotípica de la mutación ayuden a comprender la función bioquímica del producto de *rpt1*, aún muy poco clara (eventos Dtr?, Mpf?). Para abordar esta problemática podrá intentarse la complementación funcional del plásmido pSmeLPU88a::Tn5B13-a5 en la cepa 2011 con una biblioteca genómica de la cepa LPU88 (una dificultad práctica en dicha estrategia estará asociada a la identificación de los eventuales clones complementados que restauren su capacidad conjugativa dentro de la mezcla de transconjugantes).

Pocos son los ejemplos reportados de genes conjugativos en los que se ha sugerido que pueden existir requerimientos específicos de especie. En ese sentido, Lessl *et al.* (1993) demostraron que los genes *traA* hasta -E y *traL* hasta -O de la región TRA1 de RP4 no son

requeridos para apareamientos intraespecíficos en *E. coli*, pero podrían serlo para la transferencia conjugativa del plásmido a otras especies. En nuestro caso, sin embargo, el requerimiento estricto de *rpt1* es aún diferencial para cepas diferentes de una misma especie, *S. meliloti* 2011 y LPU88. Desde el punto de vista de la eficiencia del proceso conjugativo no debe descartarse que el plásmido pSmeLPU88a sea el residuo de un plásmido autotransmisible que ha perdido el *oriT* (como ya he mencionado), y en el que la presencia de *rpt1* sobre el propio replicón diera al sistema de movilización una mayor independencia del genotipo hospedador donante (ej. al arribar a cepas *S. meliloti* 2011 y *A. tumefaciens* UBAPF2). En este sentido deberá avanzarse en la búsqueda de homólogos de *rpt1* en otros sistemas conjugativos y avanzar en el requerimiento de ese gen para la movilización desde otras especies y géneros diferentes en los que los plásmidos sean replicativos.

Los resultados que he obtenido y presentado en este trabajo han permitido avanzar en los siguientes aspectos vinculados a la transferencia conjugativa de plásmidos en *S. meliloti*:

- Hemos aislado y caracterizado en detalle un sistema conjugativo binario presente en la cepa *S. meliloti* LPU88, constituido por el plásmido pSmeLPU88b movilizable y el plásmido de ayuda no-transmisible pSmeLPU88a. En el sistema binario descrito previamente en la cepa GR4, uno de los plásmidos es autotransmisible.
- Utilizando una colección de aislamientos locales de *S. meliloti* cuya diversidad hemos caracterizado en este trabajo, evaluamos la proporción de rizobios que son portadores de funciones de ayuda para la movilización del plásmido pSmeLPU88b. Hemos podido obtener así los primeros datos numéricos referidos a la incidencia de funciones conjugativas en una especie de rizobios. Durante el análisis hemos detectado cepas en las que posiblemente existen fenómenos de exclusión plasmídica aun no descritos en *S. meliloti* y/o de incompatibilidad de los sistemas de restricción-modificación.
- La extensión de la búsqueda de plásmidos movilizables a aislamientos representativos de la diversidad plasmídica de la colección nos permitió reconocer tres nuevos plásmidos transmisibles pSmeLPU57, pSmeLPU87, y pSmeLPU172 (movilizables / conjugativos?). Uno de ellos es posible que contenga un sistema de movilización diferente al que hemos encontrado en los plásmidos pSmeLPU88a/b.
- Hemos caracterizado a nivel molecular un gen del sistema de ayuda del plásmido pSmeLPU88a, designado *rpt1*, cuyo requerimiento para la transferencia conjugativa del plásmido pSmeLPU88b resultó dependiente del genotipo bacteriano donador. Es el primer ejemplo de un gen cuya presencia extiende el rango efectivo de cepas donantes dentro de una misma especie bacteriana (y en *Agrobacterium tumefaciens*).

Perspectivas: Los resultados y el material que hemos obtenido en este trabajo permitirán abordar el diseño de estrategias experimentales más rápidas y eficientes para la selección de mutantes alterados en genes conjugativos en los diferentes plásmidos que hemos aislado. Esperamos que la caracterización sistemática de un número importante de mutantes permita

avanzar sobre la organización de los genes de ayuda y su eventual relación con los correspondientes a otras bacterias como *A. tumefaciens* y *M. loti* para los que en algunos casos existen datos de secuencia disponible. Tal información será necesaria para ensayar el diseño de sondas genéricas que permitan detectar por métodos moleculares sistemas de movilización en cepas inoculantes de *S. meliloti* de interés agronómico y liberación masiva. Desde el punto de vista básico, el conocimiento de los sistemas de transferencia, de sus frecuencias de aparición en suelos locales, así como el grado de complementación funcional cruzada permitirán aproximarse a un análisis más cuantitativo de la dinámica del intercambio de información genética mediado por rizobios en el suelo.

ANEXO:



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

1W-31095

Construcción y caracterización de una cepa de *Sinorhizobium meliloti* marcada en forma estable en su cromosoma con el gen de la proteína de fluorescencia verde (GFP).

En este trabajo hemos utilizado una cepa marcada cromosomalmente en forma estable con la proteína de fluorescencia verde (GFP) para comparar su competitividad frente a un rizobio isogénico no marcado portador de distintos plásmidos crípticos. Describo en este Anexo la construcción de dicha cepa, así como la caracterización que he realizado de la estabilidad de la marca y la conservación de las propiedades simbióticas originales.

1. Construcción del plásmido vector portador de los marcadores *gfp*-Tc en la región intergénica *recA-alaS*

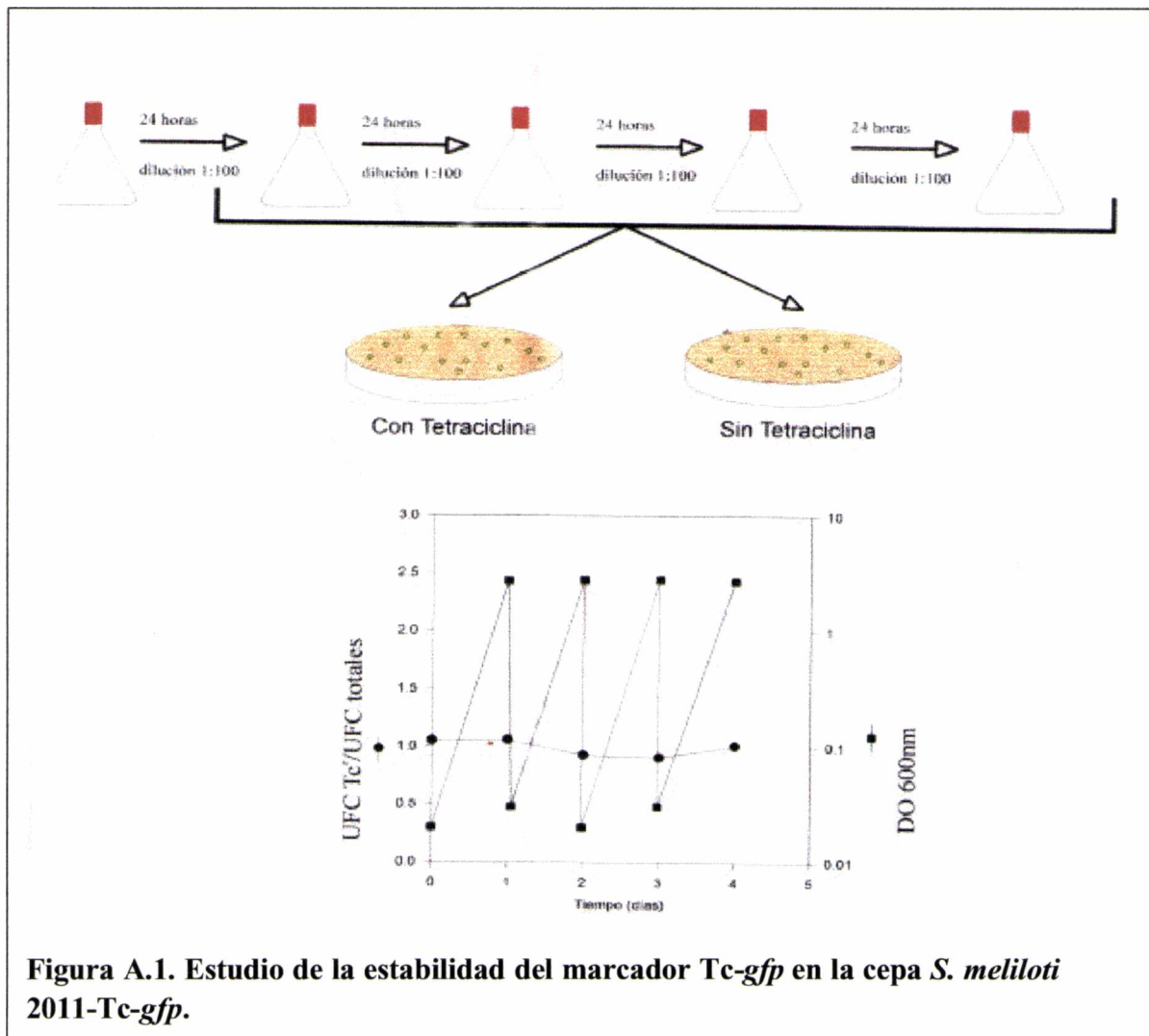
Estrategia utilizada: Homogenización de los marcadores *gfp* y de resistencia a tetraciclina (Tc^r) en una región definida del genoma de *S. meliloti*. Se empleó como vector el plásmido suicida pSM10 (Tabla II.1.). Dicho vector permite el clonado de marcadores de interés en la región intergénica que separa a los genes cromosomales *recA-alaS* de *S. meliloti* altamente conservados (Selbitschka *et al.*, 1992, 1995). El plásmido pSM10 contiene la región codificante C-terminal del gen *recA* de *S. meliloti* y la región codificante N-terminal del gen *alaS* (río abajo de *recA*). En la región intergénica ha sido introducido el promotor constitutivo del gen *nptII* y a continuación un sitio múltiple de clonado.

En el sitio *Bam*HI del vector previamente tratado con la enzima de Klenow, fue clonado en primer lugar un fragmento de ADN de 2 kb portador del gen de resistencia a Tc proveniente de plásmido pHP45Ω-Tc. En un segundo paso, entre el gen de resistencia a Tc y el promotor *nptII* se clonó una variante de la región codificante del gen *gfp* orientado en el sentido del promotor. La variante del gen *gfp* utilizada (P64L y S65T) presenta una mayor solubilidad y un corrimiento al rojo en el espectro de emisión que la proteína salvaje (Heim *et al.*, 1995, Cormack *et al.*, 1996). El plásmido así obtenido fue utilizado para homogenizar los marcadores en el cromosoma de *S. meliloti*.

2. Obtención de la cepa recombinante de *S. meliloti* marcada con *gfp*-Tc. Estudio de la estabilidad de la marcación y de las propiedades simbióticas de la cepa resultante.

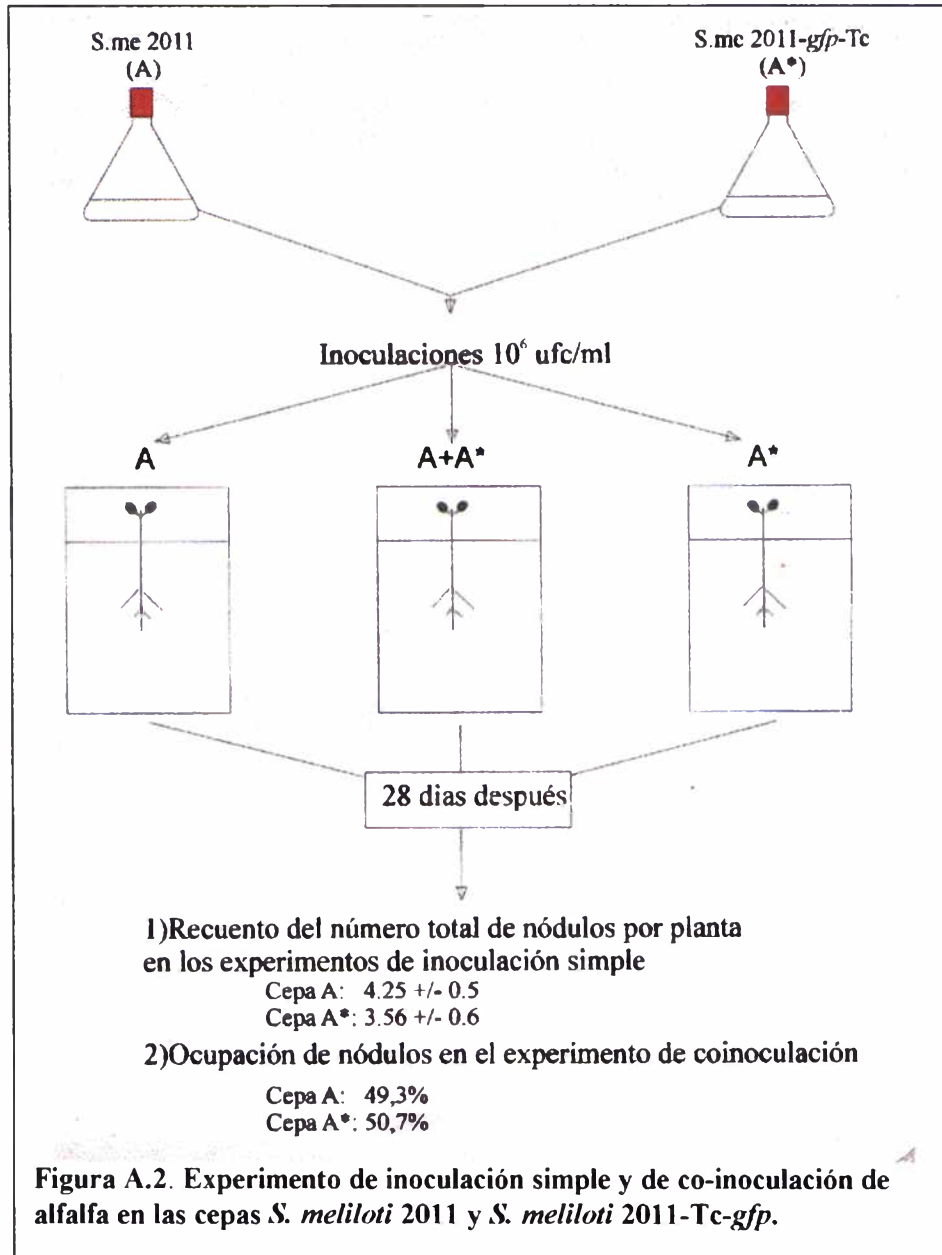
La cepa *S. meliloti* 2011 fue marcada por homogenización de los marcadores Tc-*gfp* descritos en el punto anterior. La estabilidad de la marca fue analizada en medio de cultivo TY líquido en ausencia de Tc durante aproximadamente 40 generaciones. Muestras tomadas a distintos tiempos fueron plaqueadas con y sin antibiótico para evaluar la posible aparición de clones sensibles. La fracción de colonias resistentes a la largo de las generaciones se muestra en la Figura A.1.. Los clones fueron fluorescentes a la luz UV ya sea en presencia o ausencia del antibiótico. Los resultados obtenidos muestran una elevada estabilidad de los marcadores en nuestra construcción en las condiciones de cultivo utilizadas por más de 40 generaciones.

Para evaluar el comportamiento simbiótico de la cepa recombinante se realizaron experimentos de inoculación directa y de coinoculación con la cepa salvaje empleando alfalfa como planta hospedadora (Figura A.2.). Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie con NaClO concentrado (55g Cl₂/l) durante 10 minutos y lavadas 6 veces con abundante agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas en su superficie fueron germinadas en la oscuridad durante 24 - 48 h en cajas de Petri con agar-agua. Cuando las raíces de las plantas alcanzaron una longitud de aproximadamente 0,5 cm, las mismas fueron colocadas en bolsas plásticas estériles con 10 ml de medio Jensen (Jensen, 1942) libre de nitrógeno. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de plantas con un fotoperíodo de 16 horas,



temperatura 22° C durante el día y 18° C durante la noche. Al quinto día post-germinación las raíces fueron inoculadas con 100 µl/planta de una suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente 1×10^6 bacterias en medio Fåhræus (Fåhræus, 1957) Las bolsas fueron regadas periódicamente con agua estéril. Los experimentos fueron realizados con las cepas *S. meliloti* 2011 y *S. meliloti* 2011::*Tc-gfp* inoculadas por separado y coinoculadas (relación 1:

utilizados fueron para la cepa *S. meliloti* 2011, $2 \cdot 10^6$ ufc/planta y para *S. meliloti* 2011:: Tc-*gfp* $3,2 \cdot 10^6$ ufc/planta ya sea en ensayos de simple o doble inoculación. Al cabo de 28 días el número promedio de nódulos por planta fue $4,25 \pm 0,5$ para *S. meliloti* 2011, y $3,56 \pm 0,6$ para



S. meliloti 2011::Tc-*gfp*. En el experimento de co-inoculación se analizó a los 30 días el número de nódulos ocupados por cada una de las cepas. Para determinar qué cepa ocupaba cada uno de los nódulos, los mismos fueron escindidos de las raíces y observados bajo microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss-Jena) (Figura A.3.). Se utilizó un filtro con un rango excitación de 470-490 nm y un filtro de barrera de 520-560nm. El total de nódulos analizados fue 67 de los cuales 33 mostraron fluorescencia y los 34 restantes fueron negativos. Como control del método de observación microscópica fueron removidos de las raíces 12 nódulos que mostraban fluorescencia y 11 nódulos que no la mostraban. Los mismos fueron

esterilizados en su superficie con agua oxigenada 30 volúmenes 10 min. y las bacterias del interior analizadas por plaqueo en medio TY sólido con antibióticos. Los cultivos mostraron que de los 12 nódulos positivos por fluorescencia, 11 resultaron resistentes a Tc y el restante no generó crecimiento bacteriano en ninguna condición. De los 11 nódulos negativos por fluorescencia, uno no generó crecimiento en ninguna condición y 9 fueron sensibles a Tc (posible falso negativo, resistente espontáneo a Tc ó mutante espontáneo *gfp*⁻). Los resultados obtenidos mostraron que la cepa *S. meliloti* 2011::Tc-*gfp* conserva una competitividad para la nodulación que es comparable a la cepa salvaje *S. meliloti* 2011 de la que deriva.

Otros usos de la cepa que hemos construido en relación a la temática de este trabajo de tesis. Los ensayos de evaluación de transferencia de genes entre bacterias en condiciones naturales requiere del desarrollo de cepas de referencia que, portadoras de marcadores cromosomales apropiados y estables, permitan su reconocimiento inequívoco en muestras complejas como las de suelo no esteril. La cepa que aquí hemos construido por marcación con *gfp*-Tc cumple con esas condiciones y podrán ser utilizada como atrapadora (*trapping bacteria*) de plásmidos movilizables recibidos desde otros genotipos de la comunidad bacteriana presentes en muestras de suelos. Además, el alto grado

de conservación de secuencia de la región *recA-alaS* permite el uso extendido de la herramienta que hemos desarrollado para la marcación de otras cepas de *S. meliloti*.

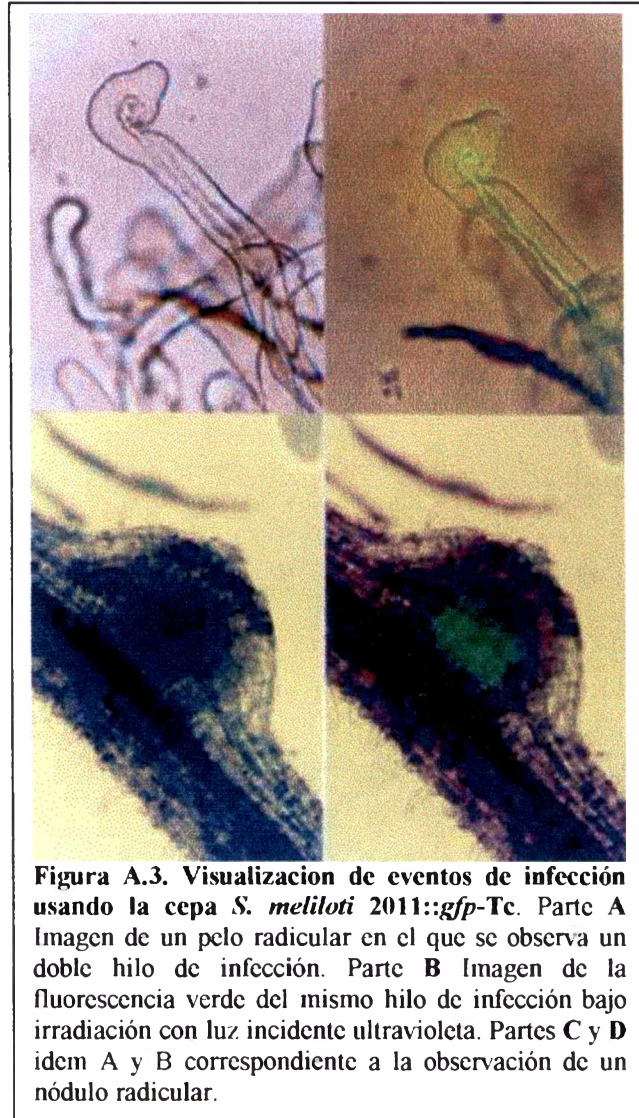


Figura A.3. Visualización de eventos de infección usando la cepa *S. meliloti* 2011::*gfp*-Tc. Parte A Imagen de un pelo radicular en el que se observa un doble hilo de infección. Parte B Imagen de la fluorescencia verde del mismo hilo de infección bajo irradiación con luz incidente ultravioleta. Partes C y D idem A y B correspondiente a la observación de un nódulo radicular.

REFERENCIAS

- Alt-Mörbe, J., Stryker, J. L., Fuqua, C., Li, P. L., Farrand, S. K., y Winans, S. C.** 1996. The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid vir genes. *J. Bacteriol.* **178**:4248-4257.
- Amábile-Cuevas, C. F., y Chicurel, M. E.** 1993. Horizontal gene transfer. *Am. Sci.* **81**:332-342.
- Arber, W.** 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiology reviews* **24**:1-7.
- Armstrong, J. L., Wood, N. D., y Porteous, L. A.** 1990. Transconjugation between bacteria in the digestive tract of the cutworm *Peridroma saucia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1492-1493.
- 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.
- Bale, M. J., Fry, J. C., y Day, M. J.** 1988. Novel method of studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2756-2758.
- Balis, E., Vatopoulos, A. C., Kanelopoulou, M., Mainas, E., Hatzoudis, G., Kontogianni, V., Malamou-Lada, H., Kit-sou-Kiriakopoulou, S., y Kalapothaki, V.** 1996. Indications of *in vivo* transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. *J. Clin. Microbiol.* **34**:977-979.
- Banfalvi, Z., Kondorosi, E., y Kondorosi A.** 1985. *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. *Plasmid* **13**:129-138.
- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, J., y Kondorosi, A.** 1981. Location of nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**:318-325.
- Bardin, S., Dan, S., Osteras, M., y Finan, T. M.** 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **178**:4540-4547.
- Barinaga M.** 1996. A shared strategy for virulence. *Science*, **272**:1261-1263.
- Barnett, M. J., y Long, S. R.** 1997. Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:550-559.
- Barran, L. R., y Bromfield, E. S. P.** 1988. Symbiotic gene probes hybridize to cryptic plasmids of indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **34**:703-707.
- Batut, J., Terzaghi, B., Ghérardi, M., Huguet, M., Terzaghi, E., Garnerone, A. M., Boistard, P., y Huguet, T.** 1985. Localization of a symbiotic *fix* region on *Rhizobium meliloti* pSym megaplasmid more than 200 kilobases from the *nod-nif* region. *Mol. Gen. Genet.* **199**:232-239.
- Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W., y Jenni, B.** 1996. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3673-3678.

- Behnke, D.** 1981. Plasmid transformation of *Streptococcus, sanguis* (Challis) occurs by circular and linear molecules. *Mol. Gen. Genet.* **181**:490-1197.
- Beringer, J.E.** 1974. R. factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
- Bertani, G., y Baresi, L.** 1987. Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *J. Bacteriol.* **169**:2730-2738.
- Bertolla, F. y Simonet, P.** 1999. Horizontal gene transfer in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* **150**:375-384.
- Bhattachajee, M. K. y Meyer, R. J.** 1991. A segment of plasmid gene required for conjugal transfer encodes a site-specific, single-strand DNA endonuclease and ligase. *Nucleic Acids Res.* **19**:1129-1137.
- Björklöf, K., Suoniemi, A., Haahtela, K., y Romantschuk, M.** 1995. High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations. *Microbiology* **141**:2719-2727.
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., y Valla, S.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol.* **63**:370-9.
- Boivin, C., Camut, S., Malpica, C. A., Truchet, G., y Rosenberg, C.** 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell* **2**:1157-1170.
- Bolland, S., Llosa, M., Avila, P., y de la Cruz, F.** 1990. General organization of the conjugal transfer of the IncW plasmid R338 and interaction between R338 and IncN y IncP plasmid. *J Bacteriol.* **172**:5795:5802.
- Bratoeva, M. P., y John, J. F., Jr.** 1994. *In vivo* R-plasmid transfer in a patient with a mixed infection of *Shigella* dysentery. *Epidemiol. Infect.* **112**:247-252.
- Brewin, N.J., Beringer, J.E. y Johnston, A.W.B.** 1980 *J. Gen. Microbiol.* **120**:413-420.
- Brom, S., Garcia de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., y Palacios, R.** 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* **174**:5183-5189.
- Brom, S., Santos, A. G., Girard, M. L., Davila, G., Palacios, R., y Romero, D.** 1991. High frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.* **173**:1344-1346.
- Bromfield, E. S. P., Lewis, D. M., y Barran, L. R.** 1985. Cryptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. Bacteriol.* **164**:410-413.
- Buchanan-Wollaston, A. V., Beringer, J. E., Brewin, N. J., Hirsch, P. R., y Johnston, A. W. B.** 1980. Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **178**:185-190.

- Burgos, P. A., Velázquez, E., y Toro, N.** 1996. Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in Rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:843-849.
- Burkhardt, B., D. Schillik, y Pühler, A.** 1987. Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasms. *Plasmid* **17**:13-25.
- Burkhardt, B., y Burkhardt, H. J.** 1984. Visualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. *J. Mol. Biol.* **175**:213-218.
- Carlson, C. A., Pierson, L. S., Rosco, J. J., y Ingraham, J. L.** 1983. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J. Bacteriol.* **153**:93-99.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M., y Denarie, J.** 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**:229-242.
- Catlin, B. W.** 1960. Transformation of *Neisseria meningitidis* by deoxyribonucleates from cells and from culture slime. *J. Bacteriol.* **79**:579-590.
- Cava, J. R., Elias, P. M., Turowski, D. A., y Noel, K. D.** 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic region encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* **171**:8-15.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. y Prasher, D. C.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994 **263**:802-805.
- Chamier, B., Lorenz, M. G., y Wackernagel W.** 1993. Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed to sand and groundwater aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1662-1667.
- Charles, T. C., Singh, R. S., y Finan, T. M.** 1990. Lactose utilization and enzymes encoded by megaplasms in *Rhizobium meliloti* SU47: implications for population studies. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2497-2502.
- Charles, T. C., y Finan, T. M.** 1991. Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated *in vivo*. *Genetics* **127**:5-20.
- Charles, T. C., y Finan, T. M.** 1990. Genetic map of *Rhizobium meliloti* megaplasmid pRmeSU47b. *J. Bacteriol.* **172**:2469-2476.
- Christensen, B. B., Sternberg, C., Andersen, J. B., Eberl, L., Moller, S., Givskov, M., y Molin, S.** 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2247-2255.
- Clewell, D. B., Flannagan, S. E., y Jaworski D. D.** 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: The Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* **3**:229-236.
- Cook, D. M. y Farrand, S. K.** 1992. The *oriT* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J. Bacteriol.* **174**:6238-6246.
- Cook, D. M., Li, P. L., Ruchaud, F., Padden, S., y Farrand, S.K.** 1997. Ti plasmid conjugation is independent of *vir*: reconstitution of the *tra* functions from pTiC58 as a binary system. *J. Bacteriol.* **179**:1291-1297.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., y Falkow, S.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**. 33-38.

- Courtois, J., Courtois, B., y Guillaume, J.** 1988. High frequency transformation of *Rhizobium meliloti* J. Bacteriol. **170**:5925-5927.
- Coutinho, H. L. C., Oliveira, V. M., Lovato, A., Maia, A. H. N. y Manfio, G. P.** 1999. Evaluation of diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. Applied Soil Ecology **13**:159-167.
- Daane, L. L., Molina, J. A., Berry, E. C., y Sadowsky, M. J.** 1996. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **62**:515-521.
- Dahlberg, C., Bergstrom, M., y Hermansson, M.** 1998. *In situ* detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 26702675.
- David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P., y Kahn, D.** 1988. Cascade regulation of *nif* gene SmA818 expression in *Rhizobium meliloti*. Cell **54**:671-683.
- Davies, J.** 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* **12**, 9-16.
- Davison, J.** 1988. Plant beneficial bacteria. *Biotechnology* **6**, 282-286.
- Davison, J.** 1999. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. Plasmid **42**:73-91.
- de Bruijn, F. J.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl Environ Microbiol. **58**:2180-7.
- De Greve, H., Decraemer, H., Seurinck, J., van Montagu, M. y Schell, J.** 1981. The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6s3. Plasmid **6**:235-248.
- de la Cruz y Davies J.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trend in Microbiology **8**:128-133
- De Rore, H., Demolder, K., De Wilde, K., Top, E., Houwen, F., y Verstraete, W.** 1994. Transfer of the catabolic plasmid RP4::Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown. FEMS Microbiol. Ecol. **15**:71-78.
- 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.
- Derbyshire, K. M., Hatfull, G., y Willets, N.** 1987. Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic and DNA sequence analysis of the mobilization region. *Mol Gen Genet.* **206**:161-168.
- Di Gioia D., Peel M., Fava F., y Wyndham, R. C.** 1998. Structures of homologous composite transposons carrying *cbaABC* genes from Europe and North America. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1940-1946

- DiGiovanni, G. D., Neilson, J. W., Pepper, I., y Sinclair, N. A.** 1996. Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2521-2526.
- Eardly, B.D., Young, J.P.W. y Selander, R.K.** 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1809-1815
- Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**:584-588.
- Farrand, S. K., Hwang, I., y Cook, D. M.** 1996. The tra region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. *J. Bacteriol.* **178**:4233-4247.
- Farrand, S. K.** 1997. Conjugal plasmids y their transfer. En: Spanik, H. P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P. J. J., *The Rhizobiaceae*, pp 199-233, Kluwers Academic Publishers.
- Fahraeus, G.** 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 374-381.
- Ferreira, A. M., Suzart, S., Vidotto, O., Knowles, D. P., Vidotto, M. C.** 2001. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* **197**: 139-43.
- Figurski, D.H. y Delinski, D.R.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acade. Sci. USA.* **76**:1648-1652.
- Finan, T. M., Kunkel, B., De Vos, G. F., y Signer, E. R.** 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**:66-72.
- Finan, T. M., Oresnik, I., y Bottacin, A.** 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. *J. Bacteriol.* **170**:3396-3403.
- Firth, N., Ippen-Ihler, K., y Skurray, R.A.** 1996 Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. En *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 2377-2401.
- Flannagan, S. E., Zitzow, L. A., Su, Y. A., y Clewell, D. B.** 1994. Nucleotide sequence of the 18 kb conjugative transposon *Tn916* from *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **32**:350-354.
- Flores, M., Gonzalez, V., Brom, S., Martinez, E., Pinero, D., Romero, D., Davila, G., y Palacios, R.** 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium spp.* *J. Bacteriol.* **169**:5782-5788.
- 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.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., y Perret, X.** 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**:394-401.

- Frey, J., y Bagdasarian M.** 1989. The molecular biology of IncQ plasmids, in: Promiscuous plasmids of Gram-negatives bacterias (C. M. Thomas, ed). Academic Press, London, pp. 79-94.
- Frischer, M. E., Thurmond, J. M., y Paul, J. H.** 1990. Natural plasmid transformation in a high-frequency-of-transformation marine *Vibrio* strain. *Appl. Environ. Microbiol* **56**:3439-3444.
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., y Skurray, R. A.** 1994. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**:162-210.
- Fry, J. C. y M. J. Day (Eds).** 1990. Bacterial genetics in natural environments. Chapman and Hall. London.
- Fulthorpe, R. R., y Wyndham, R. C.** 1991. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacterial recipients in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1546-1553.
- Fulthorpe, R. R., y Wyndham, R. C.** 1992. Involvement of a chlorobenzoate-catabolic transposon, Tn5271, in community adaptation to chlorobiphenyl, chloroaniline, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a freshwater eco-system. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:314-325.
- Furste, J. P., Pansegrau, W., Ziegelin, G., Kroger, M., y Lanka, E.** 1989. Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:1771-1775.
- Gage, D. J., Bobo, T. y Long, S. R.** 1996. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol* **178**:7159-7166
- Galas, D. J., y Chandler, M.** 1989. Bacterial insertion sequence. In: Berg, D., Howe, M., (eds) *Mobile DNA*, pp 109-162. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Gallie, D. R., y Kado, C. I.** 1987. *Agrobacterium tumefaciens* pTAR *parA* promoter region involved in autoregulation, incompatibility and plasmid partitioning. *J. Mol. Biol.* **193**:465-478.
- Gallie, D. R., Zaitlin, D., Perry, K. L., y Kado, C. I.** 1984. Characterization of the replication and stability regions of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTAR. *J. Bacteriol.* **157**:739-745.
- García de los Santos, A., Brom, S., y Romero D.** 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**:119-125.
- Geniaux, E., Laguerre, G., y Amarger, N.** 1993. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* **2**:1-8.
- Glazebrook, J., y Walker, G. C.** 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**:661-672.
- Glew, J. G., Angle, J. S., y Sadowsky, M. J.** 1993. In vivo transfer of pR68.45 from *Pseudomonas aeruginosa* into indigenous soil bacteria. *Microb. Releases* **1**:237-241.

- Goldberg, I. D., Gwinn, D. D., y Thorne, C. B.** 1966. Interspecies transformation between *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**:543-548.
- Goodman, A. E., Hild, K. C., Marshall, K. C., y Hermansson, M.** 1993. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1035-1040.
- Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., Vanelson, J.D. y Smalla, K.** 1996. Detection and characterization of broad host range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2621-2628.
- Götz, A., y Smalla, K.** 1997. Manure enhances plasmid mobilization and survival in *Pseudomonas putida* introduced into the field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1980-1986.
- Grigorieva, G., y Shestakov, S.** 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**:367-370.
- Groisman E.A., y Ochman H.** 1997 How Salmonella became a pathogen. *Trends Microbiol.*, **5**:343-349.
- Gruzza, M., Fons, M., Ouriet, M. F., Duval-Iflah, Y., y Ducluzeau, R.** 1994. Study of gene transfer *in vitro* and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microb. Releases* **2**:183-189.
- Guiney, D. G., y Lanka, E.** 1989. Conjugative transfer of IncP plasmids, in: *Plasmids of Gram-negative bacteria* (C. M. Thomas, ed.), Academic Press, London, pp. 27-56.
- Haas, R., Meyer, T. F., y van Putten, J. P. M.** 1993. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol. Microbiol* **8**:753-7110.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., y Tschape, H.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**, 1089-1097.
- Hahn, M., y Hennecke, H.** 1987. Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2247-2252.
- Haring, V., y Scherzinger, E.** 1989. Replications proteins of the IncQ plasmid RSF1010, in: *Promiscuous plasmids of Gram-negatives bacterias* (C. M. Thomas, ed). Academic Press, London, pp. 95-124.
- Harrison, S. P., Jones, D. G., Schunman, P. H. D., Forster, J. W., y Young, J. P.** 1988. Variation in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sym plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2721-2730.
- Heim, R., Cubitt, A.B. y Tsien, R.Y.** 1995. Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Henderson, D., y Meyer, R.** 1999. The MobA-linked primase is the only replication protein of R1162 required for conjugal mobilization. *J. Bacteriol.* **181**:2973-2978.

- Herrick, J. B., Stuart-Keil, K. G., Ghiorse, W. C., y Madsen, E. L.** 1997. Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2330-2337.
- Hill, K. E., Fry, J. C., y Weightman, A. J.** 1994. Gene transfer in aquatic environment: Persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. *Microbiology* **140**:1555-1563.
- Hill, K. E., Weightman, A. J., y Fry, J. C.** 1992. Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1292-1300.
- 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.
- Hofer, F.** 1985. Transfer of lactose-fermenting ability in *Lactobacillus lactis*. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **20**:179-183.
- Hoffmann, A., Thimm, T., Droge, M., Moore, E. R., Munch, J. C., y Tebbe, C. C.** 1998. Intergeneric transfer of conjugative and mobilizable plasmids harbored by *Escherichia coli* in the gut of the soil microarthropod *Folsomia candida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2652-2659.
- Holsters, M., Silva, B., van Vliet, F., Genetello, C., de Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inze, D., Engler, G., Villarroel, R., van Montagu, M. y Schell, J.** 1980. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* **2**:212-230.
- Hombrecher, G., Brewin, N. J., y Johnston, A. W. B.** 1981. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* **182**:133-136.
- Honeycutt, R. J., McClelland, M., y Sobral, B. W. S.** 1993. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **175**:6945-6952.
- Hooykaas, P. J. J., den Dulk-Ras, M., Regensburg-Twink, A. J. G., van Brussel, A. A., y Schilperoort, R. A.** 1985. Expression of a *Rhizobium phaseoli* sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *R. trifolii* sym plasmid. *Plasmid* **14**:47-52.
- Hooykaas, P. J. J., Snijdwint, F. G. M., y Schilperoort, R. A.** 1982. Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to an expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **8**:73-82.
- Hooykaas, P.J.J., van Brussel AAX, den Dulk-Ras, H., van Slogteren, G.M.S. y Schilperoort, R.A.** 1981 *Nature* **291**:351-353.
- Hopwood, D. A., y Wright, H. M.** 1972. Transformation in *Thermoactinomyces vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **71**:383-398.
- Huguet, T., Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., de Lajudie, P., Jouanin, L., Batut, J., Boistard, D. P., Julliot, J. S., y Dénarié J.** 1983. Studies on *Rhizobium meliloti* plasmids

- and on their role in the control of nodule formation and nitrogen fixation: The pSym megaplasmid and the other large plasmids. Pages 35-45 in: *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*. A. Pühler, ed. Springer, Berlin.
- Hwang, I., P. Li, L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E., y Farrand, S. K.** 1994. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4639-4643.
- Hynes, M. F., y Finan, T. M.** 1997. *General Genetic Knowledge*. En: Spanik, H. P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P. J. J., *The Rhizobiaceae*, pp 25-43, Kluwers Academic Publishers.
- Hynes, M. F., Simon, R., Puhler, A.** 1985. The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid*. **13**:99-105
- Hynes, M. F., Brucksch, K., y Priefer, U.** 1988. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. *Arch. Microbiol.* **150**:326-332.
- Hynes, M. F., Simon, R., Müller, P., Niehaus, K., Labes, M., y Pühler, A.** 1986. The two megaplasmid of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.* **202**:356-362.
- Hynes, M. F., y McGregor, N. F.** 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**:567-571.
- Hynes, M. F., y McGregor, N. F.** 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**:567-574.
- Hynes, M.F., Simon, R. y Pühler, A.** 1984. The Development of Plasmid-free Strains of *Agrobacterium tumefaciens* by Using Incompatibility with a *Rhizobium meliloti* Plasmid to Eliminate pAtC58. *Plasmid* **13**:99-105.
- Itoh T., Takemoto K., Mori H., y Gojobori, T.** 1999. Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Mol Biol Evol*, **16**:332-346.
- Iyer, V. N.** 1989. IncN group plasmids and their genetic systems, in: *Plasmids of Gram-negative bacteria* (C. M. Thomas, ed.), Academic Press, London, pp. 165-183.
- Jacob, A. E., Shapiro, J. A., Yamamoto, L., Smith, D. L., Cohen, S. N., y Berg, D.** 1977. plasmids studied in *Escherichia coli* and other enteric bacteria, in *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomas* (A. I. Bukhari, J. A. Shapiro and S. I. Adhya, eds), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 607-638.
- Jarrett, P., y Stephenson, M.** 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1608-1614.
- Jensen, H. L.** 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* **66**:98-108.

- Jetfrey, W. H., Paul, J. H., y Stewart, G. J.** 1990. Natural transformation of a marine *Vibrio* species by plasmid DNA. *Microb. Ecol.* **19**:259-268.
- Jiang, S. C., y Paul J. H.** 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2780-2787.
- Johnson, T. M., y Das, A.** 1997. Organization and Regulation of expression of the *Agrobacterium* virulence genes. En: Spanik, H. P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P. J. J., *The Rhizobiaceae*, pp 25-43, Kluwers Academics Publishers.
- Johnston, A. W. B., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Setchell, S. M., Hirsch, P. R., y Beringer, J. E.** 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* **276**:634-636.
- Johnston, A. W. B., Hombrecher, G., Brewin, N. J., y Cooper, M. C.** 1982. Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* **128**:85-93.
- Juni E.** 1972. Interspecies transformation of *Acinetibacter*. Genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* **112**:917-931.
- Juni, E.** 1974. Simple genetic transformation assay for rapid diagnosis of *Moraxella osloensis*. *Appl. Microbiol.* **27**:16-24.
- Juni, E., Heym, G. A., y Newcomb, R. D.** 1988. Identification of *Moraxella bovis* by qualitative genetic transformation and nutritional assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1304-1306.
- Juni, E., y Heym G. A.** 1980. Transformation assay for identification of psychrotrophic achromobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:1106-1114.
- Juni, E., y Janik, A.** 1969. Transformation of *Acinetobacter calcoaceticus (Bacterium anitratum)*. *J. Bacteriol.* **98**:281-88.
- Ka, J. O., y Tiedje, J. M.** 1994. Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J. Bacteriol.* **176**:5284-5289.
- Kado, C. I., y Liu, S. T.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-73.
- Kaijalainen, S., y Lindström, K.** 1989. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *J. Bacteriol.* **171**:5561-3269.
- Kaluza, K., Hahn M., y Hennecke, H.** 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. *J. Bacteriol.* **162**:535-542.
- 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.
- Kidambi, S. P., Ripp, S., y Miller, R. V.** 1994. Evidence for phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:496-500.

- Kinkle, B. K., Sadowski, M. J., Schmidt, E. L., y Koskinen, W. C.** 1991. Plasmids JP4 and r68.45 can be transferred between populations of Bradyrhizobia in non-sterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1762-1766.
- Kinkle, B. K., y Schmidt, E. L.** 1991. Transfer of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3264-3269.
- Kleckner, N.** 1981. Transposable and illegitimate recombination in procaryotes. En: Lemontt, J. F., Generoso, W. M., (eds) *Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis*, pp 245-258. Plenum, New York.
- Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C. E., Broughton, W. J., y Banfalvi, Z.** 1982. Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* **188**:433-439.
- Kosier, B., Pühler, A., y Simon, R.** 1993. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements. *Mol. Ecol.* **2**:35-46.
- Kosovich, P. V., y Prozorov, A. A.** 1990. Intraspecies and interspecies transfer of plasmid and chromosomal DNA during natural transformation in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Microbiology (Engl. Transl. Mikrobiologiya)* **59**:731-734.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N., y Furukawa, K.** 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus spp.* *J. Bacteriol.* **166**:338-340.
- Kruse, H., y Sørum, H.** 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4015-4021.
- Lacks S. A., Greenberg, B., y Neuberger, M.** 1975. Identification of a deoxyribonuclease implicated in genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **123**:222-232.
- Lacy, G. H., Stromberg, V. K., y Cannon, N. P.** 1984. *Erwinia amylovora* mutants and *in planta* derived transconjugants resistant to oxytetracycline. *Can. J. Microbiol.* **6**:33-39.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier, P., Mazurier, S. I., Rigottier-Gois, L. y Amarger, N.** 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol.* **62**:2029-36.
- 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 B. M. Wilkins.** 1995. DNA Processing reactions in Bacterial Conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:141-69.
- Lawrence J. G. y J. R. Roth.** 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, **143**:1843-1860.
- Lawrence J. G., y J. R. Roth.** 1998. Roles of horizontal transfer in bacterial evolution. In *Horizontal Transfer*. Edited by Syvanen M, Kado CI. London: Chapman and Hall;pp 208-225.

- Lawrence J.G.:**1997. Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends Microbiol.* **5**:355-359.
- Lawrence, J. G., y Ochman H.** 1998. Molecular archae-ology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9413–9417.
- Lawrence, J.G.:**1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol* **5**:519-23
- Ledeboer, A. M., Krol, A. J., Dons, J. J., Spier ,F., Schilperoort, R. A., Zaenen, I., van Larebeke, N., y Schell, J.** 1976. On the isolation of TI-plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* **3**:449-63.
- Lessl, M., Balzer, D., Weyrauch, K., y Lanka E..** 1993. The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J. Bacteriol.* **175**:6415-6425.
- Lessl, M., Balzer, Lurz, R., Waters, V., Guiney, D. G., y Lanka E..** 1992. Dissection of IncP conjugative plasmid transfer: definition of the transfer region Tra2 by mobilization of the Tra1 region *in trans*. *J. Bacteriol.* **174**:2493-2500.
- Lessl, M., D. Balzer, K. Weyrauch, y Lanka E..** 1993. The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J. Bacteriol.* **175**:6415-6425.
- Levy, S. B..** 1994. "The Antibiotic Paradox. How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle." Plenum Press, NY.
- Li, P., y Farrand ,S. K.** 2000. The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing system. *J. Bacteriol.* **182**:179-188.
- Li, P.-L., D. M. Everhart, y Farrand S. K..** 1998. Genetic and sequence analysis of the *trb* locus on pTiC58, a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J. Bacteriol.* **180**:6164–6172.
- Lilley, A. K., Fry, J. C., Day, M. J., y Bailey, M. J.** 1994. *In situ* transfer of an exogenously isolated plas-mid between *Pseudomonas* spp in the sugar beet rhizosphere. *Microbiology* **140**:27-33.
- Lilley, A. K., Fry, J.C., Day, M. J., Bailey y M. J..** 1994. In situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology* **140**:27–33.
- Lilley, A. K., y Bailey, M. J.** 1997. The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked *Pseudomonad* population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Adv. Appl. Microbiol.* **63**:1577-1583.
- Lorenz, M. G., Aardema, B. W., y Wackernagel W..** 1988. Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J. Gen. Microbiol.* **134**:107-112.
- Lorenz, M. G., Gerjets, D., y Wackernagel, W.** 1991. Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Arch. Microbiol.* **156**:319-326.

- Lorenz, M. G., Reipschlager, K., y Wackernagel, W.** 1992. Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch. Microbiol.* **157**:355-360.
- Lorenz, M. G., y Wackernagel W.** 1990. Natural Genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-absorbed DNA. *Arch. Microbiol.* **154**:380-385.
- Lorenz, M. G., y Wackernagel W.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**:563-602.
- Lorenz, M. G., y Wackernagel, W.** 1993. Transformation as a mechanism for bacterial gene transfer in soil and sediment studies with a sand/clay microcosm and the cyanobacterium *Synechocystis* OL50, p. 325-330. In R. Guerrero and C. Pedros-Alio (ed.), Trends in microbial ecology. Spanish Society for Microbiology, Barcelona.
- Louvrier, P., Laguerre, G., y Amarger, N.** 1996. Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosa-rum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4202-4205.
- Lunsford, R. D.** 1998. Streptococcal transformation: Essential features and applications of a natural gene ex-change system. *Plasmid* **39**:10-20.
- Mancini, P., Fertels, S., Nave, D., y Gealt, M. A.** 1987. Mobilization of plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 in a laboratory-scale waste treatment facility. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:665-671.
- Maniatis, T., Fritsch E. F., y Sambrook J.** 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Marcinek, H., Wirth, R., Muscholl-Silberhorn, A., y Gauer, M.** 1998. *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:626-632.
- Margolin, W., y Long, S. R.** 1993. Isolation and characterization of a DNA replication origin from the 1,700-kilobase-pair symbiotic megaplasmid pSymb of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **175**:6553-6561.
- Marra, D., y Scott J. R.** 1999. Regulation of excision of the conjugative transposon Tn916. *Mol Microbiol* **31**:609-621.
- Martínez, E., Palacios, R., y Sánchez, F.** 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harbouring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**:2828-2834.
- Martínez, E., Palacios, R., y Sánchez, F.** 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harbouring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**:2828-2834.
- Martínez, E., Romero, D., y Palacios, R.** 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**:59-93.
- Martinez-Romero, E.** 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* **161**:11-20.

- Mozo, M. T., Cabrera, E., y Ruíz-Argoese, T.** 1990. Isolation of the replication region from a *Rhizobium* plasmid an examination of its potential as a replicon for Rhizobiaceae cloning vectors. *Plasmid* 23:201-215.
- Mulder, J. A., y Venema. G.** 1982. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* mutants impaired in DNA entry. *J. Bacteriol.* 150:260-268.
- Murphy, E.** 1989. Transposable elements in Gram positive bacteria. In: Berg, D., Howe, M., (eds) *Mobile DNA*, pp 269-288. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Nakatsu, C. H., Fulthorpe, R. R., Holland, B. A., Peel, M. C., y Wyndham, R. C.** 1995. The phylogenetic distribution of a transposable dioxygenase from the Niagara River watershed. *Mol. Ecol.* 4:593-603.
- Neilson, J. W., Josephson, K. L., Pepper, I. L., Arnold, R. B., Di Giovanni, G. D., y Sinclair, N. A.** 1994. Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4053-4058.
- Nielsen, K. M., Bones, A. M., y van Elsas J. D.** 1997a. Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3972-3977.
- Nielsen, K. M., van Weerelt, M. D., Berg, T. N., Bones, A. M., Hagler, A. N., y van Elsas. J. D.** 1997b. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1945-1952.
- Nijsten, R., London, N., van den Bogaard, A., y Stobberingh, E.** 1995. *In-vivo* transfer of resistance plasmids in rat, human or pig-derived intestinal flora using a rat model. *J. Antimicrob. Chemother.* 36:975-985.
- Nikolich, M. P., Hong, G., Shoemaker, N. B., y Salyers, A. A.** 1994. Evidence for natural horizontal transfer of *tetQ* between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3255-3260.
- Nishiguchi, R., M. Takanami, y Oka, A.** 1987. Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206:1-8.
- Norgard, M. V., y Imaeda, T.** 1978. Physiological factors involved in the transformation of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 133:1254-1262.
- Normander, B., Christensen, B. B., Molin, S., y Kroer, N.** 1998. Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bushbean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1902-1909.
- NuBlein, K., Maris, D., Timmis, K., y Dwyer, D. F.** 1992. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3380-3386.
- Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Prakash, R. K., Schilperoort, R. A., y Cannon, F. C.** 1979. Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature* 282:533-535.
- O'Connell, M. P., Hynes, M. F., Puehler, A.** 1987. Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and a Ri plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid* 18:156-63.
- O'Connor, M., A. Wopat y Hanson, R. S.** 1977. Genetic transformation in *Methylobacterium organophilum*. *J. Gen. Microbiol.* 95:265-272.

- Ogawa, J., y Long, S. R.** 1995. The *Rhizobium meliloti* *groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.* **9**:714-729.
- Oger, P., Kim, K. S., Sackett, R. L., Piper, K. R. y Farrand, S. K.** 1998. Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of *traR*, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol Microbiol.* **27**:277-88
- Ormerod, J. G.** 1988. Natural genetic transformation in *Chlorobium p.* 315-319. In J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt, y H. G. Trüper (ed.), *Green photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York
- Paffetti, D., Scotti, C., Gnocchi, S., Fancelli, S. y Bazzicalupo, M.** 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl Environ Microbiol.* 1996 **62**:2279-85
- Page, W. J.** 1985. Genetic transformation of molybdenum-starved *Azotobacter vinelandii*: increased transformation frequency and recipient range. *Can. J. Microbiol.* **31**:659:662.
- Palmer, K. M. y Young, J. P. W.** 2000. Higher Diversity of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils. *Appl. Envir. Microbiol.* **66**:2445-2450.
- Pankhurst, C., Macdonald, P., y Reeves, J.** 1986. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2321-2328.
- 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 plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol.* **239**:623-63.
- Pansegrau, W., y Lanka E.** 1991. Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucleic Acids Res.* **19**:3455.
- Pansegrau, W., y Lanka, E.** 1996 Enzymology of DNATransfer by conjugative mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**:197-251.
- parainfluenzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**:1428-1434.
- Pardo, M. A., Lagunez, J., Miranda, J., y Martinez, E.** 1994. Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmidencoded citrate synthase. *Mol. Microbiol.* **11**:315-321.
- Paul, J. H., Thurmond, J. M., Frischer M. E., y Cannon, J. P.** 1992. Intergeneric natural plasmid transformation between *E. coli* and marine *Pseudomonas* species. *Mol. Ecol.* **1**:37-46.
- Paul, J. H., Thurmond, J. M., y Frischer, M. E.** 1991. Gene transfer in marine water column and sediment microcosm by natural transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3380-3386-
- Perwea, T., y Meyer R.** 1999. Stabilization of the relaxosome and stimulation of transfer are genetically distinct functions of the R1162 protein MobB. *J. Bacteriol.* **181**:2124-2131.

- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A., y Nurk, A.** 1997. Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4899-4906.
- Pielou, E. C.** 1969. An introduction to mathematical ecology. Wiley, New York, N.Y.
- Piper, K. R. y Farrand, S. K.** 2000. Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J. Bacteriol.* **182**:1080-8.
- Poyart-Salmeron, C., P. Trieu-Cuot, C. Carlier, y Courvalin P.** 1989. Molecular characterisation of two proteins involved in the excision of the conjugative transposon *Tn1545*: homologies with other site-specific recombinases. *EMBO J.* **8**:2425-2433.
- Prakash, R. K., y Atherly, A. G.** 1984. Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **160**:785-787.
- Pretorius-Güth, I. M., Puhler, A., y Simon, R.** 1990. Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2354-2359.
- Prodinger, W. M., Fille, M., Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Amann, S., Pfausler, B., Lass-Flörl, C., y Dierich, M. P.** 1996. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: parallel out-breaks due to multiple plasmid transfer. *J. Clin. Microbiol.* **34**:564-568.
- Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha D. T., Banfalvi, Z., y Kondorosi, A.** 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* **172**:5450-8.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., y Palacios, R.** 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* **299**:724-728.
- Ramírez-Romero, M. A., Bustos, P., Girard, M. L., Rodríguez, O., Cevallos, M. A., y Dávila, G.** 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* **143**:2825-2831.
- Ramírez-Romero, M. A., Soberón, N., Pérez-Oseguera, A., Téllez-Sosa, J., y Cevallos M. A.** 2000. Structural Elements Required for Replication and Incompatibility of the *Rhizobium etli* Symbiotic Plasmid. *J. Bacteriol.* **182**:3117-3124.
- Rao, J. R., Fenton, M., y Jarvis, B. D. W.** 1994. Symbiotic plasmid transfer in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii and competition between the inoculant strain lcmp2163 and transconjugant soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **26**:339-351.
- 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.
- Ravatn, R., Zehnder, A. J. B., y van der Meer, J. R.** 1998. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. Strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2126-2132.

- Renalier, M.-H., Batut, J., Ghai, J., Terzaghi, B., Gherardi, M., David, M., Garnerone, A. M., Vasse, J., Truchet, G., Huguet, T., y Boistard, P.** 1987. A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a *nod* locus. *J. Bacteriol.* **169**:2231-2238.
- Ridout, C. J., James, R. y Greenwood, C.** 1995. Nucleotide sequence encoding the di-haem cytochrome c551 peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **365**:152-154.
- Rigottier-Gois, L., Turner, S. L., Young, J. P. W., y Amarger, N.** 1998. Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmid and iso-lates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology* **144**:771-780.
- Roelants, P., Konvalinkova, V., Mergeay, M., Lurquin, P. F., y Ledoux, L.** 1976. DNA uptake by *Streptorrryces* species. *Biochim. Biophys. Acta* **442**:117-122.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., y Wackernagel W.** 1993. Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm-Adsorption, DNAase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Ecol.* **2**,171-181.
- Romero, D., Brom, S., Martinez-Salazar, J., Girard, M. L., Palacios, R., y Davila, G.** 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**:2435-2441.
- Romine, M.F., Stillwell L. C., Wong K. K., Thurston S. J., Sisk E. C., Sensen C., Gaasterland T., Fredrickson J. K., y Saffer J. D.** 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* **181**, 1585-1602
- Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J., y Casse-Delbart, F.** 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**:326-333.
- Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Dusha, I., David, M., y Boucher, C.** 1982 Megaplasmids in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* **150**:402-406.
- Roumiantseva, M. L., Andronov, E. E., y Simarov, B. V.** 2001. Symbiotic genotype diversity of *Sinorhizobium meliloti* isolates native to Center Asian and Siberian gene centre of alfalfa diversity. Presentado en el "13th International Congress on Nitrogen Fixation", Hamilton, Ontario, Canada, 2-7 de Julio de 2001. Resumen P170.
- Rudin, L., .J. E. Sjöström, Lindberg, M., y Philipson, L.** 1974. Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **118**:155-164.
- Salyers, A. A., y Shoemaker N. B.** 1996. Resistance gene transfer in anaerobes: New insights, new problems. *Clin. Infect. Dis.* **23**, S36-S43.
- Salyers, A. A., y Shoemaker, N. B.** 1996. Resistance gene transfer in anaerobes: New insights, new problems. *Clin. Infect. Dis.* **23**: S36-S43.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sandaa, R-A., y Enger, E.** 1994. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 en-coding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4234-4238.
- 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.
- Sassanfar M., Kranz J.E., Gallant P., Schimmel P., y Shiba K.** 1996. A eubacterial *Mycobacterium tuberculosis* tRNA synthetase is eukaryote-like and resistant to a eubacterial-specific antisynthetase drug. *Biochemistry*, **35**:9996-10003.
- Saye, D. J., Ogunseitan, O. A., Sayler, G. S., y Miller R. V.** 1990. Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation in situ in a freshwater habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 140-145.
- Saye, D. J., Ogunseitan, O., Sayler, G. S., y Miller R. V.** 1987. Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: Effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 987-995.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Pühler, A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmid pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
- Schonfield, P. R., Gibson, A.H., Dudman, W. F., y Watson, P. J.** 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2942-2947.
- Scott, K. P., y Flint, H. J.** 1995. Transfer of plasmids between strains of *Escherichia coli* under rumen conditions. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:189-193.
- Segovia, L., Young, J. P. W., y Martinez-Romero, E.** 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:374-377.
- Selbitschka, W., Jording, D., Nieman, S., et al.** 1995. Construction and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae strain designed to assess horizontal gene transfer in the environment. *FEMS Microbiology* **128**:255-263.
- Selbitschka, W., Pühler, A., y Simon R.** 1992. The construction of recA-deficient *Rhizobium meliloti* and *R. leguminosarum* strains marked with gusA or luc cassettes for use in risk assessment studies. *Molecular Ecology* **1**, 9-19
- Shah, G. R., y Caufield, P. W.** 1993. Enhanced transformation of *Streptococcus mutans* by modifications in culture conditions. *Anal. Biochem.* **214**:343-346.
- Shannon, C. E. y Weaver. W.** 1949. *The Mathematical Theory of communication.* University of Illinois Press, Urbana.
- Shestalcav, S. V., y Khyen, N. T.** 1970. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **107**:372-375.
- Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M. G., y Wackernagel, W.** 1988. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiology* **144**:569-576.

- Simon, R., Hötte, B., Klauke, B., y Kosier, B.** 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. *J. Bacteriol.* **173**:1502-1508.
- 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.
- Simon, R., Quandt, J. y Klipp, W.** 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **80**:161-169.
- Smit, E., Venne, D., y van Elsas, J. D.** 1993. Mobilization of a IncQ plasmid between bacteria on agar surfaces and in soil via cotransfer or retrotransfer. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2257-2263.
- Smit, E., Wolters, A., y van Elsas, J. D.** 1998. Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacterial populations: Influence of wheat roots and mercury addition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1210-1219.
- Sobral, B. W. S., Honeycutt, R. J., Atherly, A. G., y McClelland, M.** 1991. Electrophoretic separation of the three *Rhizobium meliloti* replicons. *J. Bacteriol.* **173**:5173-5180.
- Sørensen, S. J.** 1993. Transfer of plasmid RP4 from *Escherichia coli* K-12 to indigenous bacteria of seawater. *Microb. Releases* **2**:135-141.
- 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., 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**:307309.
- Soto, M. J., Zorzano, A., Olivares, J., y Toro, N.** 1992b. Sequence of ISRM4 from *Rhizobium meliloti* strain GR4. *Gene* **120**:125-126.
- Stevens, S. E., y Porter R. D.** 1986. Heterospecific transformation among cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **167**:1074-1076.
- Stewart, G. J., Sinigalliano C. D., y Garko K. A.** 1991. Binding of exogenous DNA to marine sediments and the effect of DNA/sediment binding on natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell in sediments columns. *FEMS Microbial. Ecol.* **85**:1-8.
- Stewart, G. J., y C. D. Sinigalliano.** 1991. Exchange of chromosomal markers by natural transformation between the soil isolate, *Pseudomonas stutzeri* JM300, and the marine isolate, *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell. *Antonie Van Leeuwenhoek* **59**, 19-25.
- Sullivan, J. T., Eardly, B. D., van Berkum, P., y Ronson, C. W.** 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2818-2825.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D., 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.

- Sullivan, J. T., y Ronson, C. W.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5145-5149.
- Sundin, G. W., Demezas, D. H., y Bender, C. L.** 1994. Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4421-4431.
- Suzuki, K., N. Ohta, Y. Hattori, M. Uraji, A. Kato, y Yoshida K.** 1998. Novel structural difference between nopaline- and octopine-type *trbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *trb/tral* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**:1-7.
- Syvanen, M.** (1994). Horizontal gene transfer: Evidence and possible consequences. *Annu. Rev. Genet.* **28**, 237-261.
- Tabata, S., P. J. J. Hooykaas, y Oka A.** 1989. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bacteriol.* **171**:1665-1672.
- Tauxe, R. V., Cavanagh, T. R., y Cohen, M. L.** 1989. Interspecies gene transfer in vivo producing an outbreak of multiply resistant shigellosis. *J. Infect. Dis.* **160**:1067-1070.
- 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.
- Terefework, Z., Nick, G., Suomalainen, S., Paulin, L., Lindstrom, K.** 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Bacteriol.* **2**:349-356.
- 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.
- Tirgari, S., y Moseley, B. E. B** 1980. Transformation in *Micrococcus radiodurans*: measurement of various parameters and evidence for multiple, independently segregating genomes per cell. *J. Gen. Microbiol.* **119**:287-296.
- Top, E. M., Van Daele, P., De Saeyer, N., y Forney, L. J.** 1998. Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**:87-94.
- Top, E., Mergeay, M., Springael, D., y Verstraete, W.** 1990. Gene escape model: Transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2471-2479.
- Top, E., Mergeay, M., Springael, D., y Verstraete, W.** 1994. Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:831-839.
- Toro, N. y Olivares, J.** 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* **202**:259-268.

- Toro, N., y Olivares, J.** 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* **202**:331-335.
- Trehan, K., y Sinha, U.** 1981. Genetic transfer in a nitrogenfixing filamentous cyanobacterium. *J. Gen. Microbios.* **124**:349-352.
- Troxler, J., Azelvandre, P., Zala, M., Défago, G., y Haas, D.** 1997. Conjugal transfer of chromosomal genes between fluorescent Pseudomonads in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:213-219.
- Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Julliot, J. S., Camut, S., y Denarie, J.** 1984. Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: host-specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.* 1984 **157**:134-42.
- Turner, S. L., L. Rigottier-Gois, R. S. Power, N. Amarger, y. Young J. P. W.** 1996. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **142**:1705-1713.
- Turner, S. L., y Young, J. P. W.** 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8JI. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**:53-58.
- Valdez, A. M. y Piñeiro, D.** 1992. Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria. *Evolution* **46**:641-656.
- Valentine, C. R., y Kado C. I.** (1989). Molecular genetics of IncW plasmids, in: Promiscuous plasmids of Gram-negatives bacterias (C. M. Thomas, ed). Academic Press, London, pp. 125-163.
- van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S., y Zhender A. J. B.** 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**, 677-694.
- van der Meer, J.R.** 1997. Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 159-178
- van Elsas, J. D., Gardener, B. B., Wolters, A. C., y Smit, E.** 1998. Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:880-889.
- van Elsas, J. D., McSpadden Gardener, B. B., Wolters, A. C., y Smit E.** 1998. Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:299-306.
- van Elsas, J. D., Nikkel, M., y van Overbeek L. S.** 1989. Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and the occurrence of homology to RP4 in soil bacteria. *Curr. Microbiol.* **19**, 375-381.
- van Elsas, J. D., Trevors, J. T., y Starodub M. E.** 1988. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**, 299-306.
- van Veen, R., den Dulk-Ras, H., Bisseling, T., Schilingeroot, R. y Hooykaas, P.** 1974. Crown gall tumor and root nodule formation by the bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* after the introduction of an *Agrobacterium* Ti plasmid or a *Rhizobium* plasmid. *Mol. Plant Microb. Inter.* **1**:231-234.
- Velázquez, E., Mateos, P. F., Velasco, N., Santos, F., Burgos, P. A., Villadas, P., Toro, N., y Martínez-Molina, E.** 1999. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous

- strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1039-1047.
- Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J.R.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831.
- Villarroel, R., Hedges, R. W., Maenhaut, R., Leemans, j., Engler, G., Van Montagu, M., y Schell J.** 1983. Heteriduplex analysis of P-plasmid evolution: the role of insertion and deletion of transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* 189:390-399.
- von Bodman, S. B., McCutchan, J. E, y Farrand, S. K.** 1989. Characterization of conjugal transfer functions of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 171: 5281-5289.
- Wai Lin Tung y King-Chuen Chow.** 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics* 11:128-129.
- Wang, H., Roberts, A. P., Lyras, D., Rood, J. I., Wilks, M., y Mullany, P.** 2000. Characterization of the Ends and Target Sites of the Novel Conjugative Transposon Tn5397 from *Clostridium difficile*: Excision and Circularization Is Mediated by the Large Resolvase, TndX. *J. Bacteriol.* 182:3775-3783.
- Wang, Y., y Taylor, D. E.** 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.* 172:949-955.
- Watanabe, K., y Sato, M.** 1998. Plasmid-mediated gene transfer between insect-resident bacteria, *Enterobacter cloacae*, and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola*, in guts of silkworm larvae. *Curr. Microbiol.* 37:352-355.
- Waters, V. L., Hirata, K. H., Pansegrau, W., Lanka, E., y Guiney D. G.** 1991. Sequence identity in the nick regions of IncP plasmid transfer origins and T-DNA borders of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Proc Natl Acad Sci* 88:1456-60.
- Waters, V. L., y Guiney D. G.** 1993. Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol Microbiol.* 9:1123-30
- Watson, R. J., Y.-K. Chan, R. Wheatcroft, A.-F. Yang, y Han S.** 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C4 -dicarboxylate transport and sym-biotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J. Bacteriol.* 170:927-934.
- Wernegreen, J.J., Hardin, E.L., Riley, M.** 1997. *Rhizobium* gone native: unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5483-8
- Wheatcroft, R., McRae D G, Miller R W.** 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* Genome and the Ability to Detect Supercoiled Plasmids During Bacteroid Development. *MPMI* 1:9-17.
- Wheatcroft, R., y Laberge, S.** 1991. Identification and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* sequence *ISRM3*: Similarity between the putative transposase encoded by *ISRM3* and those encoded by *Staphylococcus aureus* IS256 and *Thiobacillus ferrooxidans* IST2. *J. Bacteriol.* 173:2530-2538.

- Wheatcroft, R., y Watson, R. J.** 1988. Distribution of insertion sequence *ISRml* in *Rhizobium meliloti* and other Gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 134:113-121.
- Wilkins, B. M., y Lanka E.** 1993. DNA processing and replication during plasmid transfer between Gram-negative bacteria, p. 105–136. *In* D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Willets, N. S., y Crowther C.** 1981. Mobilization of the non-conjugative IncQ plasmid RSF1010. *Genet. Res.* 37:311-316.
- Willets, N., y Maule J.** 1985. Specificities of IncF plasmid conjugation genes. *Genet. Res.* 47:1–11.
- Williams, H. G., Day, M., Fry, J. C., y Stewart G. J.** 1996. Natural transformation in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2994–2998.
- Williams, P.A. y Sayers J.R.** 1994. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* 5, 195–217
- Wilson, M., y Lindow S. E.** 1993. Release of recombinant microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 913–944.
- Winans, S. C.** 1992. Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56:12–31.
- Winans, S. C. y Walker G. C.** 1985a. Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101. *J. bacteriol.* 161:402-410.
- Winans, S. C. y Walker G. C.** 1985b. Entry exclusion determinants of the IncN plasmid pKM101. *J. bacteriol.* 161:411-416.
- Worrell, V. E., Nagle, D. P., McCarthy, D., y Eisenbraun, A.** 1988. Genetic transformation system in the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J. Bacteriol.* 170:653-656.
- Yakobson, E., y Guiney D. G.** 1983. Homology in the transfer origins of broad-host-range IncP plasmids: definitions of two subgroups of P-plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 192:436-438.
- Yanagi, M. y Yamasto, K.** 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letters* 107:115-120.
- Yankofsky, S. A., Gurevich, R., Grimland, N., y Stark. A. A.** 1983. Genetic transformation of obligately chemolithotrophic *thiobacilli*. *J. Bacteriol.* 153:652-657.
- Yarosh, O. K., T. C. Charles, y Finan T. M.** 1989. Analysis of C4 dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 3:813–823.
- Young, J. P. W., y Wexler, M.** 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2731-2739.
- Zechner, E.L., de La Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A.M., Koraimann, G., Lanka, E., et al.** 2000 Conjugative DNA transfer processes. *En* The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread. Thomas, C.M. (ed.). Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers, pp. 87-174.

- Zhang, S., y Meyer. 1997 R.** The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer. *Mol. Microbiol.* **25**:509-516.
- Zhou, J. Z., y Tiedje, J. M.** 1995. Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium. *Mol. Ecol.* **4**:613-618.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

ORACION.....
A.....
Fecha.....
Inv. R..... Inv..... B. 57095