

03062  
10  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO**  
**DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**DISTRIBUCION Y ORGANIZACION DE SECUENCIAS  
DE PLASMIDOS EN Rhizobium leguminosarum**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de Maestría  
en Investigación Biomédica Básica  
presenta

**VICTOR MANUEL GONZALEZ ZUÑIGA**

**Cuernavaca, Morelos.**

**Junio de 1990.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

|                              |    |
|------------------------------|----|
| Resumen - - - - -            | 1  |
| Introducción - - - - -       | 2  |
| Objetivos - - - - -          | 19 |
| Resultados - - - - -         | 20 |
| Discusión - - - - -          | 66 |
| Conclusiones - - - - -       | 76 |
| Material y Métodos - - - - - | 78 |
| Literatura Citada - - - - -  | 82 |
| Agradecimientos - - - - -    | 90 |

## RESUMEN

Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, es un conjunto heterogéneo de bacterias con una diversidad genética muy alta (Piñero, et. al., 1988). La presencia de plásmidos mayores de 100 kb., es una característica común y cada cepa tiene un conjunto particular de ellos. Nociones de equivalencia y distribución de la información genética residente en los plásmidos de una población bacteriana han sido poco estudiados. El objetivo de este trabajo fué definir la equivalencia y distribución de plásmidos, mediante criterios de hibridización de DNA y correlacionar estos resultados con la diversidad genética cromosomal medida por electroforesis de isozimas.

Para realizar esto, se purificaron cuatro de los plásmidos de una cepa de R. leguminosarum bv. phaseoli, y se utilizaron como detectores radiactivos en hibridaciones con DNA total digerido con una enzima de restricción (EcoRI) y los perfiles electroforéticos de los plásmidos de una colección de cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli. Esta colección incluye cepas de diferente origen geográfico, establecen una simbiosis efectiva con el frijol y tienen tres copias del gene de la nitrogenasa reductasa (nifH). Además, se incluyeron algunas cepas que tienen un solo gene nifH, que también establecen simbiosis con el frijol, y cepas aisladas de otras leguminosas, como son chicharo, trébol y alfalfa.

Los resultados obtenidos de la hibridación de los cuatro plásmidos, con las digestiones totales de DNA de las diferentes cepas, muestran que la mayoría contiene secuencias homólogas a los plásmidos probados, aunque el número de bandas de hibridación y su conservación sean muy variables. El plásmido más conservado es el pCE3-d (plásmido simbiótico de 390 kb). El pCE3-b (190 kb) le sigue en representación, mientras que los plásmidos pCE3-a (190 kb) y pCE3-c (220 kb), son los menos representados. Al correlacionar estos resultados con la diversidad genética cromosomal de las mismas cepas, se observa que el patrón de distribución es independiente del genotipo cromosomal, no hay plásmidos asociados a genotipos particulares.

Para examinar si la información genética presente en los plásmidos de una cepa, también reside en los plásmidos en las demás cepas, se hicieron experimentos de hibridación con los perfiles electroforéticos de los plásmidos de algunas de las cepas. Los resultados indican que es común que la información genética se conserve en un plásmido y en algunos casos en dos plásmidos.

En conjunto, estos experimentos nos permiten concluir que existe información genética extracromosomal común a grupos bacterianos muy diversos.

## INTRODUCCION

El genoma de las bacterias está constituido por un cromosoma y, generalmente, por plásmidos en número y tamaño variable. En el cromosoma se localizan los genes esenciales para el crecimiento de la bacteria en diversas condiciones ambientales, y en los plásmidos se encuentra información genética específica para determinadas funciones, tales como la simbiosis, la patogénesis y la resistencia a los antibióticos. Existen plásmidos capaces de transferirse entre distintos grupos bacterianos por conjugación y algunos pueden movilizar genes cromosomales. Sin embargo, de la mayoría de ellos se desconoce su función y no son indispensables para el crecimiento bacteriano en condiciones normales de cultivo en el laboratorio. Estas características han conducido a pensar que los plásmidos juegan un papel importante en la adaptación y evolución de las poblaciones bacterianas, permitiendo el flujo de genes entre ellas. Así mismo, se ha considerado que los plásmidos forman parte de una poza genética a la que diversos grupos bacterianos tienen acceso por conjugación (Reaney, 1978; Campbell, 1981). Si esto es así, se esperaría encontrar plásmidos homólogos o secuencias de los mismos en grupos bacterianos poco relacionados genéticamente. En este trabajo se examina esta propuesta en relación a algunos plásmidos de Rhizobium leguminosarum, en particular con aislamientos pertenecientes al bv. phaseoli.

El cromosoma de cepas del bv. phaseoli ha sido caracterizado por métodos de electroforesis de alelos de enzimas. Estos estudios han revelado que el grupo posee una gran diversidad genética, de las más altas encontradas en bacterias. La estructura genética de la población es básicamente clonal, con poca recombinación cromosomal entre las clonas (Piñero et. al. 1988). Cada una de las clonas generalmente equivale a una cepa, y contiene un conjunto particular de plásmidos diferenciable por su número y su tamaño. Esto ofrece la oportunidad de caracterizar la distribución y la equivalencia estructural de algunos de estos plásmidos en genotipos cromosomales definidos y genéticamente distantes.

Desarrollos recientes en el campo de la taxonomía y la genética de poblaciones del Rhizobium, resultan importantes para la discusión de los datos presentados en este trabajo. A continuación ofrezco una revisión de los aspectos principales de estas áreas.

#### **LA SITUACION TAXONOMICA DEL Rhizobium**

La familia Rhizobiaceae se encuentra incluida en la división alfa de las bacterias púrpureas (Woese, 1987). Comprende bacterias capaces de interaccionar con diversas plantas, ya sea estableciendo una simbiosis como lo hacen Rhizobium, Bradyrhizobium y Synorhizobium, o bien provocando hipertrofias (Phyllobacterium) o tumores (Agrobacterium). Algunos de estos géneros son claramente divergentes filogenéticamente de acuerdo a estimaciones basadas en homologías de los genes ribosomales (Fox et. al., 1985; Woese,

1987). La definición de las especies, sin embargo, no es muy clara. En la tabla 1 se muestra una clasificación de los géneros y especies capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las leguminosas. Los problemas a los que se enfrenta este esquema taxonómico son los siguientes:

**i) Los determinantes genéticos para la simbiosis están localizados en plásmidos.** Con excepción de las especies del Bradyrhizobium, en donde los genes para la nodulación y la fijación de nitrógeno se localizan en el cromosoma, en el resto de las especies descritas existe un plásmido (pSim) que lleva la mayor parte de la información genética necesaria para hacer simbiosis. El hecho de que los plásmidos simbióticos pueden ser transferidos entre cepas y especies de Rhizobium, cambiando la especificidad de hospedero, ha sido tomado como evidencia de que estas bacterias pertenecen a una misma especie (Jordan, 1984; Johnston, et. al., 1978; Brewin, et. al. 1980). Este es el caso de R. leguminosarum, donde los tres biovares considerados, (viceae, trifolii y phaseoli), pueden intercambiar plásmidos simbióticos, aún cuando estos tengan características distintivas, como son la organización de los genes simbióticos, la presencia de genes nifH repetidos y la especificidad de hospedero (Quinto et. al., 1982; Watson et. al., 1985). Sin embargo, estos experimentos de transferencia han sido hechos con un número pequeño de cepas y, por otra parte, se sabe que los plásmidos simbióticos pueden funcionar en fondos genéticos tan distintos como lo son cepas de Agrobacterium (Hooykaas, et. al., 1981). El pSim-299 puede, inclusive, realizar una simbiosis

**TABLA 1. LA FAMILIA RHIZOBIACEAE (Jordan, 1984; Chen, et al., 1988; Lindström, 1989)**

| <b>Género</b>  | <b>Especie</b>  | <b>Planta Hospedera</b>    |
|----------------|-----------------|----------------------------|
| Rhizobium      | meliloti        | Alfalfa                    |
|                | leguminosarum   |                            |
|                | biovar viceae   | Chicharo                   |
|                | biovar trifolii | Trébol                     |
|                | biovar phaseoli | Frijol                     |
|                | loti            | <u>Lotus</u>               |
|                | galegae         | <u>Galega</u>              |
| Sinorhizobium  | fredii          | Soya                       |
|                | xingiangensis   | Soya                       |
| Bradyrhizobium | japonicum       | Soya                       |
| Agrobacterium  | tumefaciens     |                            |
|                | rhizogenes      | Diversas<br>dicotiledóneas |
|                | radiobacter     |                            |
| Philobacterium |                 |                            |



completa en el fondo genético de una cepa de A. tumefaciens (GMI9023), curada de sus plásmidos nativos (Martínez et. al., 1988).

Por otra parte, algunos de los plásmidos simbióticos sufren rearrreglos genéticos que conducen a la pérdida de sus funciones (Soberón-Chávez, et. al. 1987; Flores, et. al., 1988). Esto sugiere que las características simbióticas son inestables por lo que no son buenos indicadores de relación taxonómica.

ii) **Promiscuidad de la relación hospedero-huésped.** En relación directa con el punto anterior, está el hecho de que una leguminosa puede ser nodulada por varios tipos de Rhizobium. Plantas de frijol pueden ser noduladas efectivamente por al menos dos tipos de Rhizobium, diferentes en su cromosoma y en su pSim (Martínez, et. al. 1985). Aislamientos de nódulos inefectivos de alfalfa son capaces de nodular frijol (Eardly, et. al., 1985). Existen cepas de Rhizobium que nodulan un amplio rango de leguminosas. El ejemplo más extremo es la NGR 234 que puede nodular efectivamente más de 10 leguminosas distintas (Lewin, et. al., 1987). Dado que solo una fracción de las leguminosas existentes (aproximadamente el 1%, de acuerdo a Allen and Allen, 1981), ha sido analizada para nodulación, es posible que se encuentren más cepas con afinidades cruzadas para distintos hospederos. El criterio de hospedero por lo tanto resulta insuficiente para clasificar al Rhizobium.

iii) **Diversidad intraespecifica.** Estudios de taxonomía numérica (Graham, 1964; Moffet and Calwell, 1968), hibridización de DNA total (Gibbins and Gregory, 1967; Crow, 1981), patrones de proteínas totales (Roberts et. al.,) y resistencia a los antibióticos (Beynon and Josey, 1980), han sido aplicados a una gran variedad de aislamientos de Rhizobium y constituyen las bases para proponer la taxonomía actual. Sin embargo, los mismos estudios dan cuenta de la gran variabilidad prevalente en estos grupos. Aislamientos de frijol, provenientes de los sitios de origen de esta leguminosa, tienen una diversidad genética muy alta (Piñero et. al., 1988), mayor a la encontrada en otras especies, de acuerdo a estimaciones basadas en la variación de enzimas cromosomales. Al menos dos grandes grupos han sido descritos para estos aislamientos, uno tiene repetidos los genes nifH y nodula efectivamente solo al frijol (bv. phaseoli tipo I). El otro grupo tiene un solo gene nifH y adicionalmente al frijol, nodula efectivamente algunas leguminosas tropicales como Leucaena y Macroptilum (bv. phaseoli tipo II, Martínez et. al., 1985). Un estudio más extenso realizado con cepas del bv. phaseoli tipo II, revela que tiene una diversidad genética equiparable o menor a aquella de las cepas con reiteraciones del nifH, y caen en dos agrupamientos distintos (Martínez, et. al., 1990).

Aislamientos provenientes de soya, considerados ahora como Bradyrhizobium japonicum, comprenden dos grupos altamente divergentes, de acuerdo a su patrón de substitución de bases en

genes simbióticos (nod y nif) y cromosómicos (glnA y recA) (Stanley, et. al., 1985). Keyser, et. al., (1981) han reportado el aislamiento de cepas con la capacidad de nodular cultivares de soya nativos de China, pero que son inefectivas en cultivares comerciales. Estas cepas son fisiológicamente distintas de las del género Bradyrhizobium y son de crecimiento rápido. Se ha propuesto, basándose en taxonomía numérica y en la baja similaridad en DNA de estos aislados, con respecto a otras cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium, que pertenecen a un nuevo género, llamado Sinorhizobium (Chen, et. al., 1988). Así mismo, cepas de R. meliloti, provenientes de distintos lugares geográficos pertenecen a dos líneas evolutivas distintas, como lo describen Eardly et. al. (1989), basándose en la variación en enzimas cromosomales y la divergencia en los genes que codifican para los RNA ribosomales.

En conjunto estos estudios señalan que los marcadores cromosómicos son mejores indicadores de similaridad y divergencia entre cepas, que los basados en características plasmidicas o de hospedero.

iv) Poblaciones de bacterias son características similares al Rhizobium, pero sin la capacidad de hacer simbiosis. El hecho de que los aislamientos clasificados actualmente provengan de los nódulos de leguminosas, impone un sesgo a los estudios taxonómicos. Generalmente se hace uso de cepas que son buenos simbiotes. Esto deja fuera a una parte de la población con capacidades menores en cuanto a nodulación. Por otra parte, es significativo el descubrimiento de poblaciones bacterianas con características

similares al Rhizobium, pero que carecen de propiedades simbióticas. Estos aislamientos son parecidos al Rhizobium por homologías a nivel de DNA total con una cepa de R. leguminosarum bv. trifolii (Jarvis, et. al., 1989), por algunas características de crecimiento en cultivo, como son la producción de goma y la resistencia a nalidixico (Jarvis, et. al., 1989; Soberón Chávez, et. al., 1989), y por la presencia de dos tipos de glutamino sintetasa (Soberón-Chávez, et. al., 1989). Mediante un enfoque de poblaciones, Segovia et. al., (enviado a publicación), han demostrado que este tipo de bacterias no-simbióticas, están cromosomalmente relacionadas a cepas del bv. phaseoli, encontrándose interdispersas en un dendrograma de distancias genéticas, con cepas que si son efectivas para nodular y fijar nitrógeno con el frijol. Es importante señalar que la introducción por conjugación de un plásmido simbiótico de una cepa del bv. trifolii o del bv. phaseoli, a una cepa no-simbiótica, le confiere propiedades de nodulación (Soberón-Chávez et. al., 1989; Jarvis, et. al., 1989; Segovia, et. al., enviado a publicación).

Estas poblaciones bacterianas aún no ha sido tomada en cuenta en la taxonomía actual, y sería importante conocer que relaciones genéticas mantienen estas bacterias no-simbióticas con las simbióticas.

En síntesis, los estudios taxonómicos han revelado que las bacterias simbiotes fijadoras de nitrógeno son un grupo altamente diverso. Una mejor ubicación de las especies requiere además de un enfoque filogenético. La secuenciación de genes ribosomales y otras regiones del cromosoma podrían ayudar a establecer los patrones de divergencia y evolución de estos grupos bacterianos.

#### GENETICA DE POBLACIONES DEL Rhizobium

Con la aplicación de métodos de la genética de poblaciones, se han podido analizar la variación en un número muy grande de bacterias y describirla en términos cuantitativos. Los estudios más consistentes en ese sentido, están basados en la detección de alelos de enzimas cromosomales de acuerdo a su movilidad electroforética, que depende de su carga, y a final de cuentas de los residuos aminoácidos que forman la enzima. Esto es un buen reflejo de la variación en un locus cromosomal determinado, y de la utilización de un número adecuado de enzimas, en una muestra poblacional razonablemente grande, se obtienen indicaciones del grado de variación y recombinación entre diferentes cepas. Las conclusiones derivadas del estudio de diversas especies de bacterias, como E. coli, Shigella, Salmonella, Neisseria, Legionella y Rhizobium son las siguientes:

- i) Qué existe un gran polimorfismo genético dentro de las especies bacterianas.
- ii) Qué hay un gran desequilibrio de ligamiento entre los alelos detectados, es decir, las asociaciones de alelos no son producto

del azar, como sería el caso si los genes en las distintas poblaciones estuvieran recombinando frecuentemente (Selander, 1987).

El modelo que se propone para la evolución de las especies bacterianas, consiste en considerarlas como conjuntos de clonas independientes unas de otras y que no existe o hay muy poca recombinación cromosomal. La selección periódica, así como la extinción al azar de clonas, explicarían la diversidad encontrada. Sin embargo, es posible que no todo el cromosoma bacteriano se comporte clonalmente. Datos derivados de las secuencias nucleotídicas de los genes trpB, gndD y phoA de E. coli, indican que estos genes han experimentado intercambio genético en el curso de la evolución de esta bacteria (Stolfztus, et. al., 1988; Milkman and Stolfztus, 1988; Dubosse, et. al., 1988).

En Rhizobium los estudios de genética de poblaciones son básicamente los realizados por Young et. al. (1985, 1987, 1988), por Piñero et. al. (1988) y por Eardly et. al. (1989). Las conclusiones alcanzadas no difieren de las obtenidas para las demás especies de bacterias. Sin embargo, es importante destacar los siguientes puntos:

i) **Diversidad Genética.** La mayor diversidad genética encontrada en Rhizobium ( $H=0.69$ ), la presentan los aislamientos de frijol procedentes de los sitios de diversificación de esta leguminosa (Miranda, 1969; Piñero, et. al., 1988). Esta es una de las más altas encontradas en bacterias. E. coli tiene una diversidad genética ( $H$ ) de 0.47 (Selander, et. al. 1987), mientras que para Pseudomonas

y Frankia los valores de  $H$ , son del orden 0.75 (Denny, et. al., 1988; Gardes, et. al., 1987). Cepas de Rhizobium obtenidas de frijol procedentes de Inglaterra presentan una diversidad baja (Young, 1985). Aislamientos de alfalfa, chicharo y trébol, del mismo lugar tienen una diversidad genética ( $H=0.50$ ), equiparable a la encontrada en E. coli (Young, 1985).

En China, por otra parte, que es el sitio de diversificación de la soya, se han caracterizado al menos dos tipos de bacterias simbiotes (Bradyrhizobium y Sinorhizobium) (Keyser, et. al. 1982; Chen, et. al., 1988). Estos resultados indican que en los centros de origen de las leguminosas se encuentra una mayor diversidad en los microsimbiontes.

ii) **Relación Genética.** Como parte del análisis de la diversidad, está el estudio de las distancias genéticas que relacionen los distintos tipos. Estas se ilustran mediante un dendrograma, donde los tipos más relacionados tienen distancias genéticas (calculadas de acuerdo al método UPGMA de Nei, 1979) cercanas a 0, y los más diferentes se aproximan a 1 (Selander et. al. 1987). En muchas especies bacterianas (Legionella, Haemophilus, E. coli, Salmonella) la distancia genética tope va de 0.3 a 0.5 ( Selander, et. al., 1985; Selander, 1987; Beltrán, et. al. 1988; Musser, et. al., 1988). Aislamientos de R. leguminosarum bv phaseoli, se encuentran relacionados a distancias genéticas bastante altas (0.87) (Piñero, et. al., 1988; Martínez, et. al., 1990). Esto indica que R. leguminosarum bv. phaseoli, puede consistir de un ensamble polifilético de organismos (Piñero, et. al., 1988). Hay una

correlación muy fuerte entre la divergencia a nivel de DNA y los estimados de distancia genética (Selander, et. al., 1986). La divergencia en el gene trpB, de E. coli y Shigella, se estima en 25 y 30 millones de años. Esto representa una distancia genética de 0.3 entre ambas especies (Ochman and Wilson, 1987). Si esto es igual en Rhizobium, es posible que el bv. phaseoli, contenga varios linajes evolutivos. Cepas de R. meliloti, provenientes de todo el mundo se encuentran relacionadas una distancia genética de 0.84. Un análisis de RFLP's de los operones ribosomales indican que en esta agrupación hay al menos dos líneas evolutivas divergentes (Eardly, et. al., 1989).

iii) Límite de especies. La frecuencia con la que se recombinan marcadores cromosomales es indicativo del grado de homología entre dos genomas. Cepas de los tres biovares (viceae, trifolii y phaseoli) de R. leguminosarum, pueden recombinar marcadores cromosomales en condiciones de laboratorio (Jhonston and Beringer, 1978). Cepas de R. meliloti, pueden recombinar entre sí, pero no con cepas de R. leguminosarum. Sin embargo, el límite de intercambio genético entre las especies no está bien definido. La mayoría de los aislamientos de R. meliloti analizados por Young (1985), son bastante diferentes de los de R. leguminosarum, originarios del mismo lugar. Sin embargo, uno de los tipos electroforéticos (ET's) de R. meliloti está traslapado con el ET más común a los tres biovares de R. leguminosarum. Así mismo, dos de los ET's de R. leguminosarum son similares a uno de los ETs de R. meliloti. Además, se observa que la mayoría de los ET's de



R. leguminosarum, se encuentran intercalados en uno u otro biovar. Young, a partir de estos datos concluye que los aislamientos de R. leguminosarum de este lugar, comprenden distintas líneas cromosómicas que pueden llevar cualquiera de los determinantes de hospedero. Este tipo de observaciones, ha conducido a preguntar acerca del papel que juegan los plásmidos, en la diferenciación de las poblaciones de Rhizobium, dadas las características de conjugación que poseen algunos de estos elementos, y que el cromosoma se conserva relativamente aislado. Reaney (1978) y Campbell (1981), han propuesto que los plásmidos y otros elementos extracromosomales, forman una poza génica a la que distintas líneas cromosómicas tienen acceso, constituyendo así una genespecie. Algunos experimentos dirigidos a demostrar la transferencia horizontal de plásmidos en Rhizobium, son discutidas en la siguiente sección.

#### **LOS PLASMIDOS DEL Rhizobium**

Virtualmente cualquier aislamiento de Rhizobium tiene plásmidos. Cada cepa tiene un conjunto característico, diferente de otras por su número y por su movilidad electroforética. La gran mayoría de estos elementos son genéticamente crípticos, es decir, no se conoce su función. Solo el plásmido que codifica para la mayor parte de las funciones simbióticas ha sido analizado extensamente (Rolfe, et. al., 1988; Long, 1989). A diferencia de los miembros de la familia de las enterobacteriaceas, que poseen plásmidos de 7.5 a 45 kb (Hartl, et. al., 1986), Rhizobium y otras

bacterias fitopatógenas, tienen plásmidos grandes, cuyo tamaño va de 100 a 900 kb (Prakash, et. al., 1981; Hirsh, et. al., 1981; Martínez and Palacios, 1983). Dos aspectos de los plásmidos son importantes en relación a este trabajo, los estudios sobre transferencia horizontal y los referidos a la relación estructural entre diferentes plásmidos.

1) **Transferencia horizontal de genes.** En Rhizobium se han descrito plásmidos con propiedades conjugativas, algunos de los cuales llevan los determinantes de especificidad de hospedero (Johnston, et. al., 1978; Hirsh, et., al., 1979). En R. leguminosarum, un plásmido que codifica para la producción de bacteriocinas, se transfiere a frecuencias de  $10^{-2}$  por receptor, entre cepas de distintos biovars (Johnston, et. al., 1978; Hirsh, et. al., 1979; Brewin, et. al., 1980). Estos plásmidos también son capaces de movilizar genes cromosomales a baja frecuencia ( $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  por receptor). Sin embargo, estos experimentos solo indican el potencial de transferir plásmidos entre distintos grupos de Rhizobium, y no dan información acerca de la ocurrencia de este fenómeno en condiciones naturales. Broughton et. al. (1987) han reportado la transferencia del plásmido simbiótico de una cepa de R. leguminosarum *bv. viceae* a una cepa de R. meliloti, que no puede nodular ni pegarse a la raíz, en experimentos de complementación en una rizosfera definida de Medicago. Estudios recientes brindan una mejor evidencia mejor acerca de este tópico.

Schofield, et. al., (1987) y Demezas, et. al., (1988), a partir del análisis de 16 cepas de R. leguminosarum *bv. trifolii*,

encuentran que diferentes plásmidos simbióticos, caracterizados por las secuencias repetidas específicas (Watson, et. al., 1985), se presentan en tipos cromosomales iguales, de acuerdo a los alelos de enzimas cromosomales y serotipos. También encuentran que plásmidos simbióticos iguales están presentes en diferentes tipos cromosómicos. En un estudio similar, realizado con cepas nativas de Inglaterra, también se encuentran discordancias entre tipos plasmidicos y cromosómicos (Young and Wexler, 1988). En estos experimentos se utiliza para caracterizar los cromosomas, electroforesis de alelos de enzimas y una región de 21 kb del cromosoma que incluye el gene de  $\beta$ -galactosidasa, analizada con enzimas de restricción (RFLP). Los plásmidos simbióticos son caracterizados por RFLP'S de los genes de nodulación (nodABCD y nodEF) y de los genes de la nitrogenasa (nifHDK). Los tipos plasmidicos correlacionan en muchos de los casos con los tipos cromosómicos, pero algunas cepas con un fondo cromosómico igual, tienen diferentes tipos de plásmidos simbióticos. Un análisis posterior, utilizando un método computacional para evaluar transferencia genética entre poblaciones, con los mismos datos presentados, indica que entre el 20 y el 30 % de los tipos caracterizados, ha estado involucrado en eventos de transferencia horizontal (Valdés, 1990).

ii) **Relación estructural entre plásmidos.** Rhizobium, como ya se ha señalado, posee un sistema de plásmidos complejo, que puede llegar a constituir hasta un tercio de la información genética total, si se asume que el cromosoma tiene un tamaño de 5 300 kb (Crow, et. al., 1981). Poco se sabe de la relación estructural que tienen los

plásmidos en una población. Esto quiere decir que pese a la diversidad en contenido de plásmidos que tienen las cepas de Rhizobium, no se sabe cuales son equivalentes y en que rango de cepas se distribuyen.

Estudios globales de homologías entre plásmidos de Rhizobium, generalmente se refieren a un plásmido y consideran pocas cepas. Prakash, et. al., (1981), apoyado en experimentos de hibridización tipo Southern (Southern, 1975) de plásmidos totales, señala que al menos un plásmido está conservado extensivamente en los biovares trifolii, viceae y phaseoli, y que las secuencias de este plásmido están poco representadas en una cepa de R. meliloti. Por su parte, Haugland y Verma (1981) mediante experimentos de reasociación de DNA e hibridizaciones en Southern de plásmidos y DNA total, concluyen que algunas cepas de R. japonicum poseen secuencias homólogas a uno de los plásmidos y en uno de los casos éstas se localizan en el cromosoma. Cepas de R. meliloti, de origen geográfico distinto, comparten secuencias comunes en 5 plásmidos, como se observa de los experimentos de hibridización en Southern, realizados por Jouanin, et. al. (1981).

Por otra parte, los plásmidos de Agrobacterium, principalmente los que codifican las funciones de virulencia, han sido caracterizados en base a sus homologías. Mediante varios métodos de hibridización se ha podido establecer que los plásmidos tumorigénicos están conservados en promedio en un 50%, con regiones altamente conservadas, regiones variables y regiones ausentes (Drummond and Chilton, 1978; White and Nester, 1980; Thomashow, et. al., 1981). Las regiones conservadas son, generalmente, las que

llevan los genes de tumorigénesis. El trabajo de Currier y Nester (1976), indica que los plásmidos tumorigénicos pueden variar en homología sobre un amplio rango de cepas de varias partes del mundo. Además, las homologías en los plásmidos no correlacionan con las homologías cromosomales, ni tampoco con los esquemas de taxonomía numérica. Así, plásmidos homólogos se encuentran en fondos cromosómicos distintos (Currier and Nester, 1976).

## OBJETIVOS

En este trabajo nos propusimos lo siguiente:

i) Hacer una descripción de la distribución de las secuencias de algunos plásmidos en una colección de cepas de R. leguminosarum, procedente principalmente de México. Muchas de estas cepas pertenecen al bv. phaseoli tipo I y han sido caracterizadas desde el punto de vista cromosomal por Piñero et. al. (1988). Como citamos anteriormente, este conjunto de cepas tiene una gran diversidad genética. En este trabajo nos enfocamos a establecer si existen relaciones de homología entre algunos de sus plásmidos.

ii) También nos propusimos examinar si las secuencias presentes en las distintas cepas se localizan extracromosomalmente.

iii) Finalmente, examinamos la variación en contenido de plásmidos en cepas provenientes de un mismo lugar geográfico, y que pertenecen a los genotipos cromosomales más comunes en este lugar.

## RESULTADOS

### I. DIVERSIDAD EN PLASMIDOS EN R. leguminosarum bv. phaseoli.

Previamente Martínez y Palacios (1984) encontraron una gran variación en el contenido de plásmidos en aislamientos del bv. phaseoli nativos de suelos mexicanos. El número más común de plásmidos en cepas del bv. phaseoli tipo I es de tres a cuatro, aunque hay cepas que tienen hasta siete plásmidos. En cepas del bv. phaseoli tipo II, no se ha observado que tengan más de tres plásmidos. El número de plásmidos más común es de dos a tres (Martínez, sin publicar). Los pesos moleculares de los plásmidos varían en un rango de 100 a 750 kb aproximadamente, y cada cepa tiene un conjunto de plásmidos particular, diferenciable de otras, por su número y su tamaño. Es conveniente señalar que esta es solo una estimación aproximada, puesto que plásmidos de mayor tamaño no son detectados en los procedimientos utilizados, y plásmidos que son del mismo peso, aunque pueden ser diferentes genéticamente, pueden co-migrar durante la electroforesis.

Esta caracterización de las cepas por su contenido de plásmidos es útil para identificarlas, pero no alcanza a revelar la diversidad genética de estos elementos. El hecho de que en cepas distintas existan plásmidos de movilidad electroforética similar, sugiere que pueden ser equivalentes en estructura y función, pero no es concluyente a este respecto. Estudios de

homología a nivel de DNA pueden ayudarnos a revelar las relaciones existentes entre los plásmidos de diferentes cepas.

**II. PRESENCIA DE SECUENCIAS DE PLÁSMIDOS EN DISTINTAS CEPAS DE *R. leguminosarum*.** Para examinar la presencia de secuencias homólogas a algunos de los plásmidos en diferentes cepas de *R. leguminosarum*, procedimos de la siguiente manera:

i) Elegimos una cepa perteneciente al *bv. phaseoli* denominada CE3 (CFN 42 strp) como referencia y fuente de plásmidos. Esta cepa contiene seis plásmidos y con excepción de uno de ellos (pCE3-e), los demás han sido movilizados por conjugación a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (GMI9023), curada de sus plásmidos nativos (Flores et. al., 1987). A partir de estas construcciones se purificaron los plásmidos pCE3-a (190 kb), pCE3-b (190 kb), pCE3-c (220kb) y pCE3-d (390 kb), por el método de lisis alcalina de Hirsh (Hirsh, 1979).

ii) Elegimos un conjunto de cepas sobre las cuales buscar secuencias homólogas a los plásmidos de la CE3 purificados en el inciso anterior. La lista de cepas y algunas de sus características, como son su planta aislamiento y su origen geográfico, se encuentran descritas en la Tabla 2. La mayoría son cepas del *bv. phaseoli* tipo I aisladas en distintas localidades de México. También se encuentran cepas representativas de EEUU, Brasil, Colombia y Hawaii.



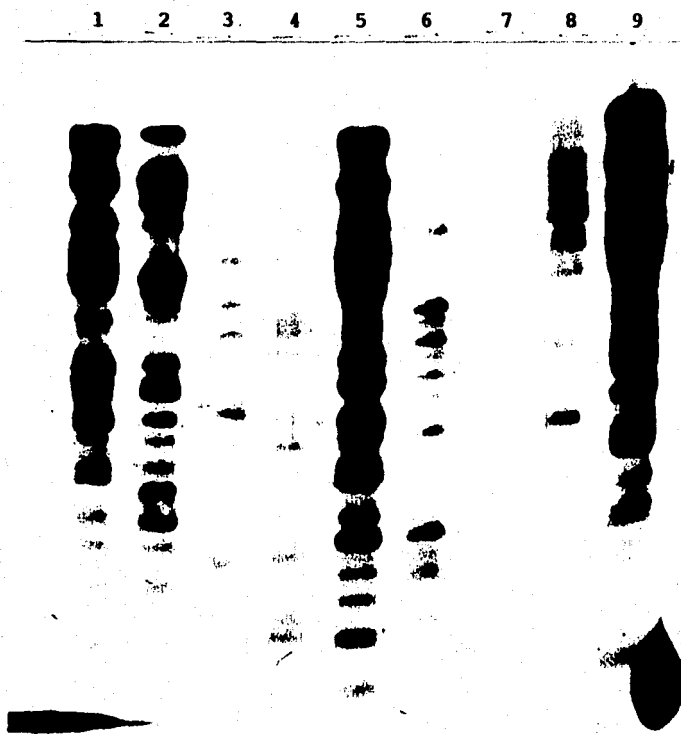
**TABLA 2. CEPAS DE Rhizobium UTILIZADAS**

| CEPA        | ORIGEN GEOGRAFICO  | HOSPEDERO             | NUMERO DE PLASMIDOS |
|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| Acu 3       | Texas, USA         | <i>P. acutifolius</i> | 3                   |
| Bra 5       | Brazil             | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| Bra 8       | Brazil             | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| Car 22      | Brazil             | <i>P. vulgaris</i>    | 2                   |
| CE3         |                    |                       |                     |
| (CFN42 str) | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 6                   |
| CFN 3       | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| CFN 299     | Colombia           | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| CAR 22      | Brazil             | <i>P. vulgaris</i>    | 2                   |
| CO5-I       | Brazil             | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| CO5-II      | Brazil             | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| CIAT 281    | Colombia           | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| CIAT 893    | Colombia           | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| CIAT 894    | Colombia           | <i>P. vulgaris</i>    | 5                   |
| CIAT 899    | Colombia           | <i>P. vulgaris</i>    | 2                   |
| COC 8       | D.F., México       | <i>P. coccineus</i>   | 4                   |
| Des 109     | Jalisco, México    | <i>Desmodium spp.</i> | 3                   |
| F 2         | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| F 6         | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| F 8         | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 7                   |
| F 13        | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 6                   |
| F 14        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| F 17        | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| Fe 4        | Hidalgo, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| Fe 12       | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| FL 10       | Guanajuato, México | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| Nitragin    |                    |                       |                     |
| 8251        | USA                | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| Rme 1       | México             | Medicago              | 1                   |
| Sil 4       | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| Tal 182     | Hawaii             | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| USDA 2046   | USA                | Trifolium             | 1                   |
| Vic 1       | ----               | Pisum                 | 5                   |
| Viking I    | Minnesota, USA     | <i>P. vulgaris</i>    | 2                   |
| 125         | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 129         | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 6                   |
| 1018        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1019        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1021        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1091        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1253        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1273        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1911        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 3                   |
| 1966        | Morelos, México    | <i>P. vulgaris</i>    | 4                   |
| 1596        | ----               | Trifolium             | 3                   |

Incluimos además, 5 cepas del bv. phaseoli tipo II, 2 del bv. trifolii, 1 del bv. viceae y una de R. meliloti, nativa de México. De cada una de esta cepas se obtuvo el DNA total y una vez digerido con la endonucleasa EcoRI, fué sujeto a electroforesis en geles de agarosa y transferido a membranas de nitrocelulosa, como se indica en los métodos. Los perfiles de digestión son sustancialmente diferentes uno de otro, de acuerdo a lo publicado anteriormente (Flores, et. al., 1987).

iii) Finalmente, los plásmidos purificados en el inciso i) fueron marcados radiactivamente y utilizados como detectores de homología en el genoma total digerido en EcoRI de nuestra colección de cepas.

**II-A. Homologías con el plásmido pCE3-a.** El plásmido pCE3-a tiene un peso molecular de 190 kb. No se ha encontrado que tenga un papel en la simbiosis, pero está relacionado con el pCE3-d (pSim) por algunas secuencias homólogas (Flores et. al., 1987; Girard, et. al., sin publicar). En las figuras 1 y 2 se muestran las autoradiografías correspondientes a la hibridización del pCE3-a con cepas del bv. phaseoli tipo I. La cepa de referencia da un promedio de 19 bandas, algunas de las cuales son de gran intensidad. Estas pueden representar fragmentos de tamaño similar. Entre las cepas existe un extenso polimorfismo en este sitio de restricción y no hay dos perfiles de hibridización que sean iguales. Por el número de bandas y por la intensidad relativa de las mismas, las cepas que tienen más secuencias homólogas al plásmido pCE3-a son la F8, la F17 y la Nitragin 8251 (figura 1). En seguida podemos observar un



**FIGURA 1. Presencia de secuencias del plásmido pCE3-a en cepas del bv. phaseoli tipo I.**

**Carriles: 1- F 8; 2- F 17; 3- CIAT 894; 4- CIAT 281; 5- Nitragin 8251; 6- CFN 3; 7- Des 109; 8- Viking I; 9- CE3.**

1 2 3 4 5 6 7 8 9



FIGURA 2. Presencia de Secuencias homólogas al plásmido pCE3-a en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- CE3; 2- F 2; 3- Bra 5; 4- Bra 8; 5- Acu3

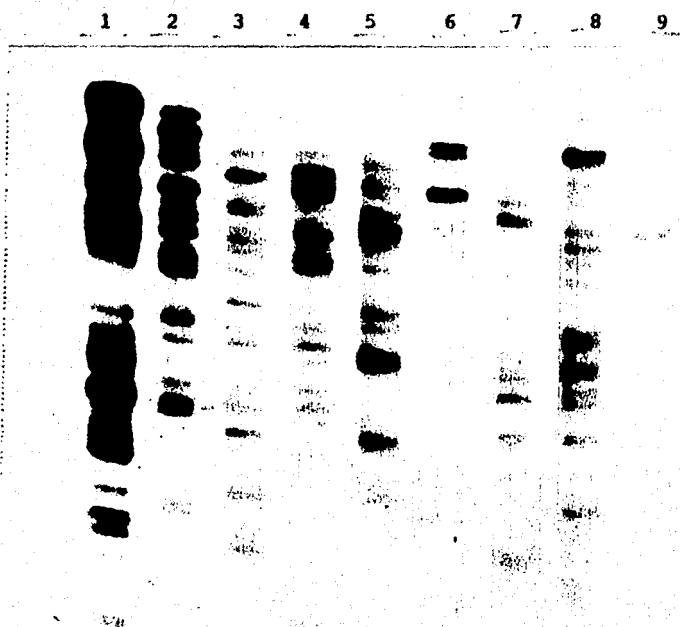
6- Sil 4; 7- CIAT 281; 8- F 6; 9- Tal 182.

grupo de cepas con homologías intermedias, estas son la F2, la CIAT 281, la F6 y la Tal 182 (figura 2). Finalmente hay un conjunto de cepas que tienen muy poca homología con el pCE3-a. Estas son la CIAT 894, CIAT 893, CFN3, Viking I, Bra 5 y Bra 8 (figuras 1 y 2).

Dos de las cepas no demuestran homologías significativas con el pCE3-a (Des 109 y Acu 3). Es conveniente señalar que estas cepas no provienen de nódulos de frijol, sino de las leguminosas Desmodium sp. (Des 109) y de P. Acutifolius (Acu 3).

La presencia de secuencias homólogas al pCE3-a también fue examinada en cepas consideradas como grupos diferentes del bv. phaseoli tipo I. En la figura 3 se muestra la autoradiografía correspondiente a este experimento. Existe una gran heterogeneidad tanto en el número de bandas como en la intensidad de las mismas. La C05 I, es la que presenta mayor homología con el pCE3-A. Las cepas CAR 22 y CIAT 899 (bv. phaseoli tipo II), la VIC 1 (bv. viceae), la USDA 2045 (bv. trifolii) tienen una homología moderada con el pCE3-a, mientras que la 1596 (bv. trifolii) y la Rme 1 (R. meliloti) comparten muy pocas zonas de homología. Es conveniente señalar que las homologías observadas en la autoradiografía anterior no son comparables a las del bv phaseoli tipo I mostradas en las figuras 1 y 2. Estas últimas tienen un tiempo de exposición de 3 días, mientras que la autoradiografía de la figura 3 corresponde a una exposición de siete días.

**II-B. Homologías con el plásmido pCE3-b.** Este plásmido tiene un tamaño aproximado de 190 kb, y co-migra con el pCE3-a en electroforesis en geles de agarosa. No se ha demostrado que tenga



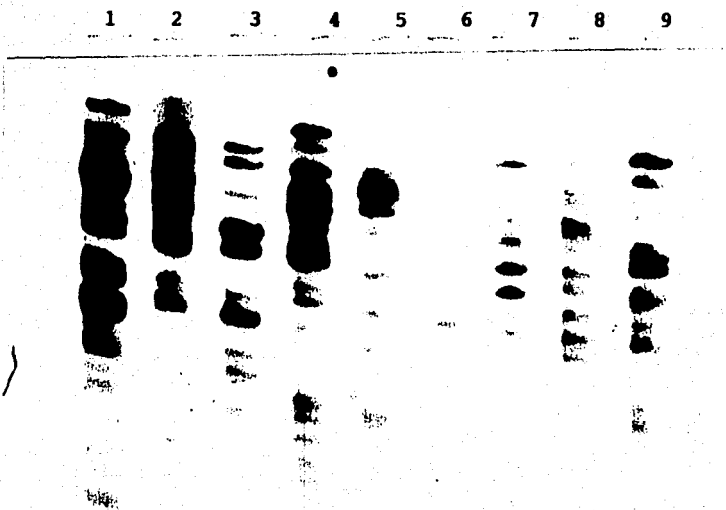
**FIGURA 3.** Presencia de secuencias homólogas al pCE3-a en distintas cepas de Rhizobium.

Carriles: 1- CE3 (bv. phaseoli tipo I); 2- C05-I (bv. phaseoli tipo II); 3- CAR 22 (bv. phaseoli tipo II); 4- CIAT 899 (bv. phaseoli tipo II); 5. Vic 1 (bv. viceae); 6- 1596 (bv. trifolii); 7- Rme 1 (R. meliloti); 8- USDA 2046 (bv. trifolii); 9- GMI 9023 (A. tumefaciens, sin plásmidos).

alguna relación con la simbiosis, pero contiene una de las secuencias que codifican para la producción del lipolísido extracelular (lps) (Noel et. al. sin publicar). Secuencias de este plásmido demuestran una mayor uniformidad en cuanto a su conservación en las cepas del bv. phaseoli tipo I, que las del plásmido pCE3-a (figuras 4, 5 y 6). Las cepas con más secuencias homólogas al pCE3-b son la Viking I, Des 109, CFN 3 y F8. Las cepas con homologías abajo del 50% son la Nitragin 8251, la CIAT 894 y la CIAT 894 y la F17. Hay algunas cepas del bv. phaseoli tipo I presentan patrones de hibridización muy similares (F 13, F 14, Fe 12, FL 10 y COC 8) (figura 6). Estas cepas se hallan agrupadas dentro de la misma rama de diversidad genética cromosomal (distancia genética = 0.4) de acuerdo a Piñero et. al. (1988). Este dato sugiere que estas cepas pueden tener un origen común.

Las secuencias del pCE3-b se encuentran bastante representadas en cepas diferentes del bv. phaseoli tipo I. Las cepas CO5 I y CAR 22 (bv. phaseoli tipo II) muestran el mismo perfil de hibridización (figura 7). Las cepas del bv. phaseoli tipo II no están relacionadas a las del tipo I, de acuerdo al criterio de enzimas cromosomales. La distancia genética entre ambos tipos de 0.8 (Piñero, et, al., 1988; Martínez, et. al., 1990). La Rme 1 (R. meliloti), no muestra homología significativa con el pCE3-b

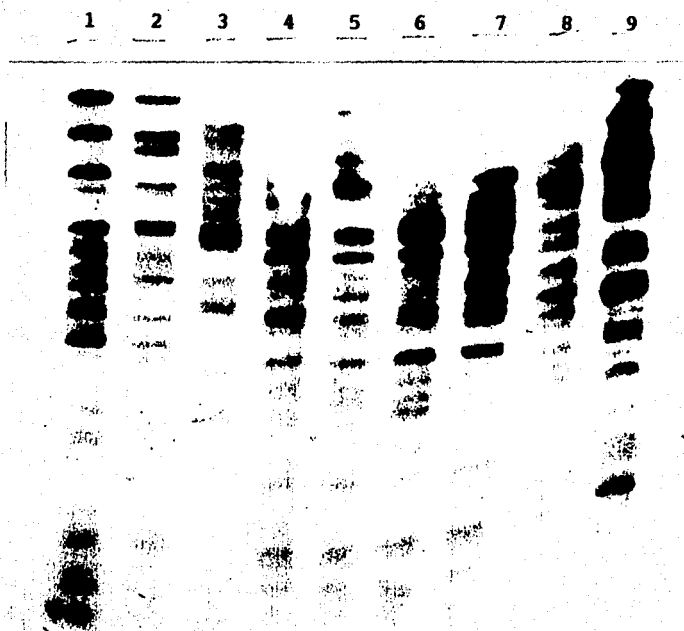
**II-C. Homologías con el plásmido pCE3-c.** El plásmido pCE3-c tiene un peso molecular aproximado de 220 kb. Se conoce que este plásmido se puede perder espontáneamente a baja frecuencia en condiciones



**FIGURA 4.** Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-b en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- CE3; 2- Viking I; 3- Des 109; 4- CFN 3;  
5- Nitragin 8251; 6- CIAT 893; 7- CIAT 894; 8- F 17;  
9- F 8.





**FIGURA 5.** Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-b en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- Tal 182; 2- F 6; 3- CIAT 281; 4- Sil 4;

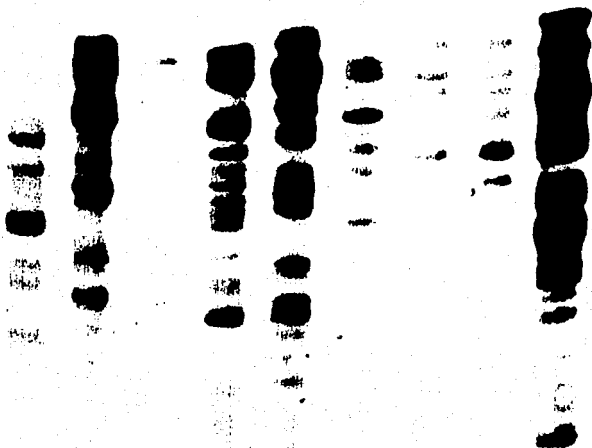
5- Acu 3; 6- Bra 8; 7- Bra 5; 8- F 2; 9- CE3.



**FIGURA 6.** Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-b en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- CE3; 2- F 13; 3- F 14; 4- Fe 12; 5- FL-10;  
 6- Coc8; 7- Fe 4; 8- CFN 299 (bv. phaseoli tipo II); 9-  
 GMI 9023 (A. tumefaciens sin plásmidos)

-1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8 -9



**FIGURA 7. Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-B en distintas cepas de Rhizobium.**

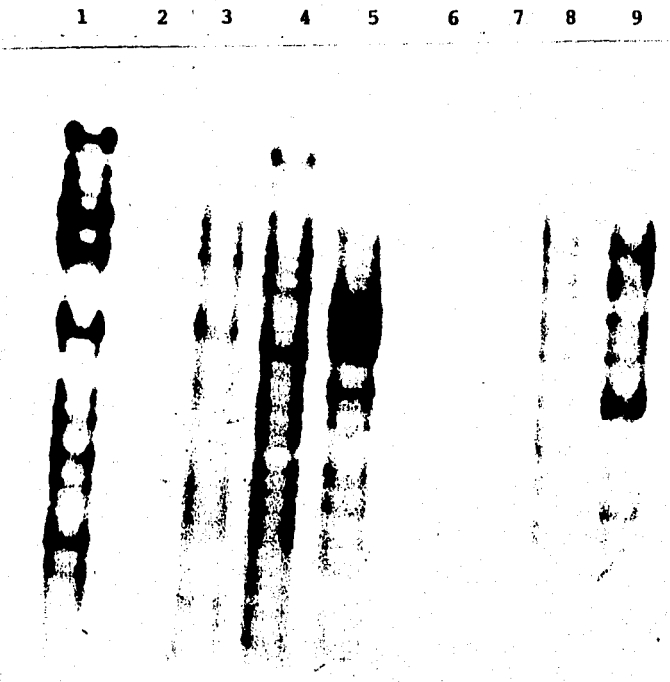
**Carriles: 1- GMI 9023 (A. tumefaciens sin plásmidos); 2- USDA 2046 (bv. trifolii); 3. Rme 1(R. meliloti); - 4- 1596 (bv. trifolii); 5- Vic 1 (bv. viceae); 6- CIAT 899 (bv. phaseoli tipo II); 7. CAR 22 (bv. phaseoli - tipo II); 8. CO5-I (bv. phaseoli tipo II); CE3 (bv. - phaseoli tipo I).**

normales de cultivo en el laboratorio. Cepas curadas de este plásmido nodulan tardíamente (S. Bromm, datos sin publicar). Los experimentos de hibridización con este plásmido indican que es el menos representado en las cepas analizadas (figuras 8, 9, 10 y 11). Las cepas con mayor homología tanto por el número de bandas que presentan como por la intensidad de las mismas son la CFN3, la Nitragin 8251, F 8, Bra 5, Bra 8, Acu 3 y Tal 182. El conjunto de cepas con homologías débiles está representado por la F17, la F6, F2 y Des 109. El tercer conjunto de cepas lo constituyen cepas que carecen de secuencias homólogas al pCE3-c o tienen muy pocas. Estas son la Viking I, la CIAT 893, la CIAT 894, la Sil 4 y la CIAT 281.

De nueva cuenta el perfil de hibridización de las cepas F 13, F14, Fe 12 y Coc 8, es bastante similar, como sucede con el plásmido pCE3-b.

Secuencias homólogas al pCE3-c, prácticamente no se encuentran en cepas del bv. phaseoli tipo II (figura 11). Hay pocas secuencias homólogas a este plásmido en las cepas del bv. trifolii (USDA 2046 y 1596) y en la Vic 1 (bv. viceae)

**II-D. Homologías con el plásmido pCE3-d.** El plásmido pCE3-d contiene la mayor parte de los genes necesarios para efectuar una simbiosis efectiva con el frijol. Tiene un peso molecular aproximado de 390 kb. Actualmente existe un mapa físico de todo este plásmido construido a partir de un conjunto de cósmidos traslapables en algunas regiones. Se conoce la ubicación de las tres regiones genéticas que codifican para la nitrogenasa (nifHDK) y la de algunos genes de nodulación (nodABCD), la del gene de inhibición

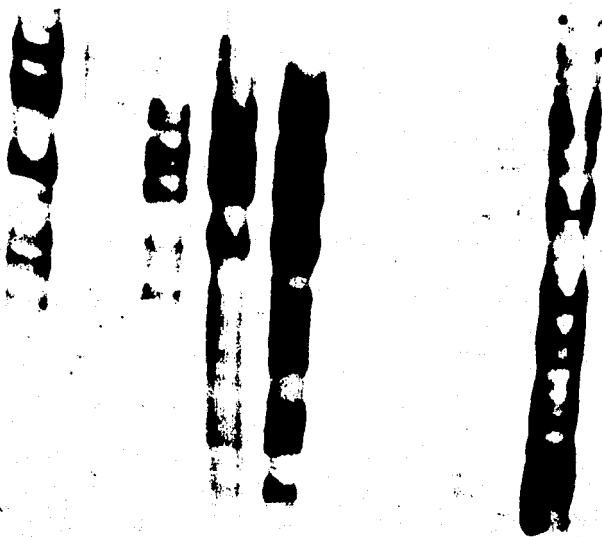


**FIGURA 8. Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-c en cepas del bv. phaseoli tipo I.**

**Carriles: 1- CE3; 2- Viking I; 3- Des 109; 4- CFN 3; 5-**

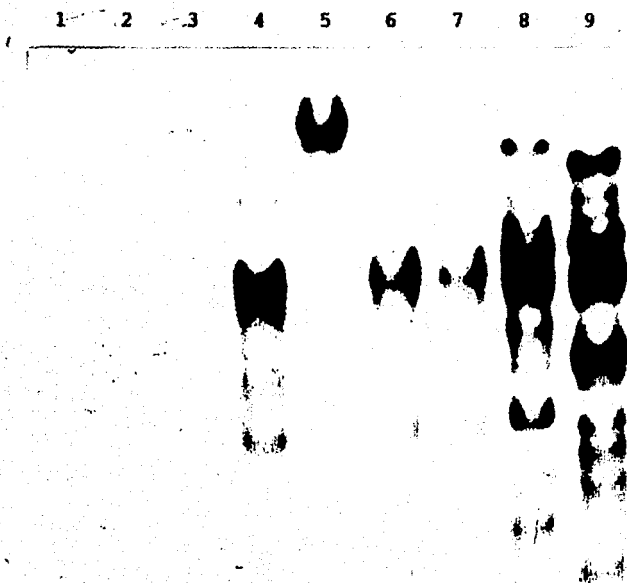
**Nitragin 8251; 6- CIAT 893; 7- CIAT 894; 8- F 17; 9- F 8.**

1 2 3 4 5 6 7 8 9



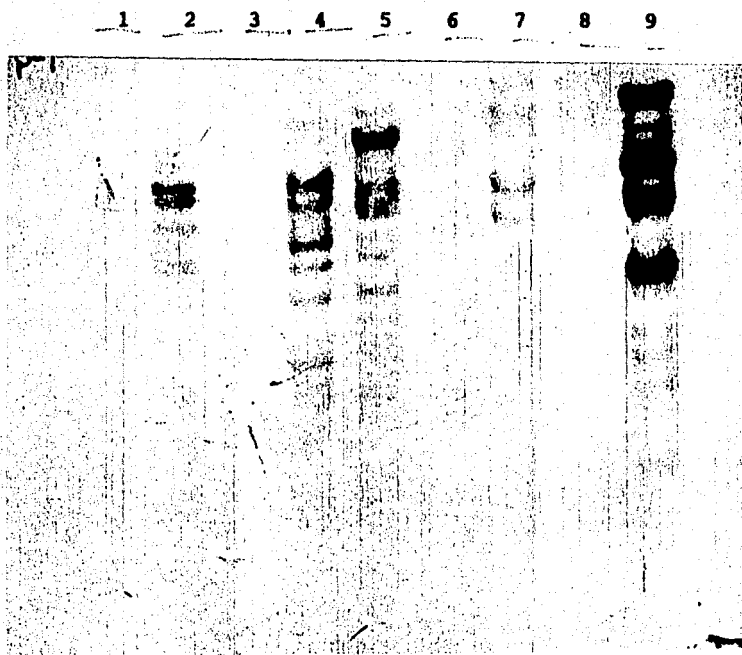
**FIGURA 9. Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-c en cepas del bv. phaseoli tipo I.**

**Carriles: 1- CE3; 2- F 2; 3- Bra 5; 4- Bra 8; 5- Acu 3; 6- Sil 4; 7- CIAT 281; 8- F 6; 9- Tal 182.**



**FIGURA 10.** Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-c en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- GMI 9023 (A. tumefaciens sin plásmidos); 2- CPN 299 (bv. phaseoli tipo II); 3- Fe 4; 4- Coc 8; 5- PL 10; 6- Fe 12; 7- F 14; 8- F 13; 9- CE3.



**FIGURA 11.** Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-c en distintas cepas de Rhizobium.

**Carriles:** 1. GMI9023 (A. tumefaciens sin plásmidos); 2- USDA 2046 (bv. trifolii); 3. Rme 1 (R. meliloti); 4- 1596 (bv. trifolii); 5- Vic 1 (bv. viceae); 6- CIAT 899 (bv. phaseoli tipo II); 7- CAR 22 (bv. phaseoli tipo II); 8- CO5- I (bv. phaseoli tipo II); 9- CE3 (bv. phaseoli tipo I).



de la producción de polisacáridos (psi) y la de un gene homólogo a nifa (Girard et. al. en preparación). En relación al presente trabajo es necesario señalar la presencia de zonas de DNA reiterado dentro del mismo plásmido, así como en otros plásmidos y en el cromosoma (Flores, et. al. 1987; Girard et. al. en preparación).

En los experimentos de hibridización del plásmido pCE3-d, con digestiones totales en EcoRI de cepas del bv. phaseoli tipo I (figuras 12, 13 y 14), detectamos una extensa conservación tanto en el número de bandas observadas como en la intensidad de las mismas. El patrón de hibridización en cada cepa es altamente polimórfico y complejo, no podemos hacer una buena comparación con el objeto de mostrar las zonas en las cuales hay conservación de los fragmentos de restricción.

En cinco de las cepas del bv. phaseoli tipo I, no se detecta una homología significativa con el pCE3-d (CIAT 893, Des 109, Fe 12, F 14 y Fe 4). Estas cepas han perdido el pSim durante los periodos de cultivo en el laboratorio. Hay evidencia de que en algunas cepas ocurren rearrreglos genómicos a alta frecuencia, que involucran la pérdida de los genes nifHDK y de nodulación, sin involucrar un cambio en el perfil electroforético de los plásmidos que contiene la cepa (Soberón-Chávez, et. al., 1987; Flores et. al., 1988). Dos explicaciones se han ofrecido a esta observación, una de ellas postula que el pSim sufre amplificaciones y deleciones, entre las zonas de nodulación y fijación, la otra postula la existencia de un plásmido de peso molecular similar al pSim, el cual se pierde sin alterar el perfil de los plásmidos de la cepa. Nuestros datos indican que, al menos estas cepas, son curadas de



**FIGURA 12.** Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-d en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- CE3; 2- F 2; 3- Bra 5; 4- Bra 8;

5- Acu 3; 6- Sil 4; 7- CIAT 281; 8- F 6; 9-

Tal 182.

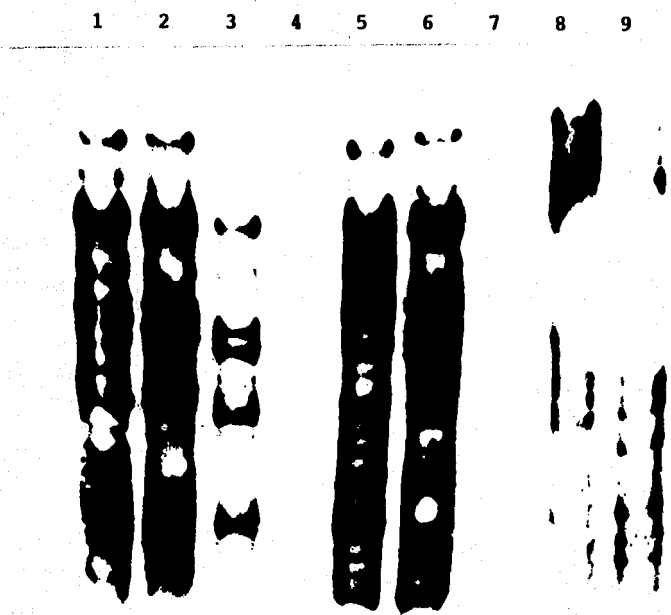


FIGURA 13. Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-d en cepas del bv. phaseoli tipo I.

Carriles: 1- F 8; 2- F-17; 3- CIAT 894; 4- CIAT 893; 5- Nitragin 8251; 6- CFN 3; 7- Des 109; 8- Des 109; 9- CE3.

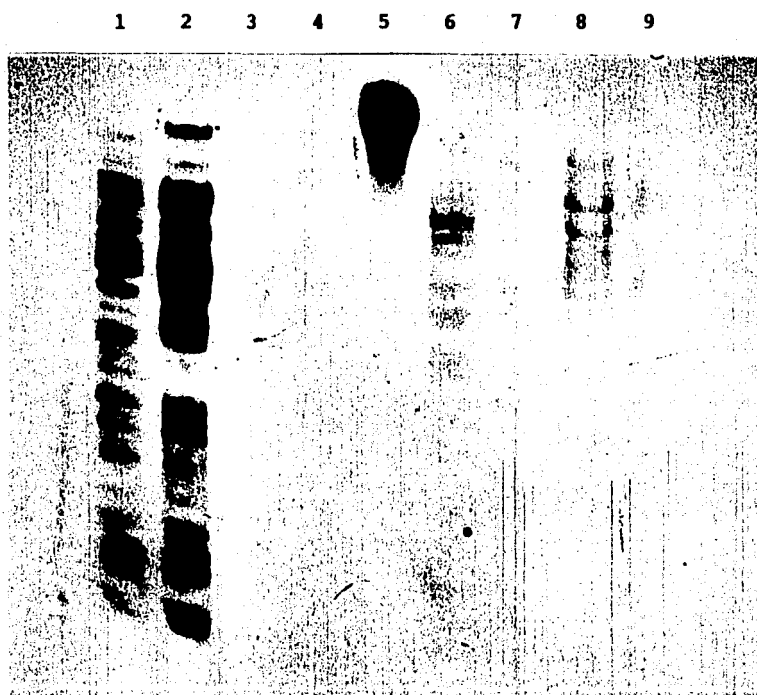


FIGURA 14. Presencia de secuencias homólogas al plásmido pCE3-d en cepas del bv. phaseoli tipo I. Carriles: 1- CE3; 2- F 13; 3- F 14; 4- Fe 12; 5- FL 10; 6- Coc 8; 7- Fe 4; 8- CFN 299 (bv. phaseoli tipo II); 9- GMI 9023 (A. tumefaciens sin plásmidos).

su plásmido simbiótico. Finalmente las cepas que tienen la menor homología en relación al pCE3-d, son la Coc 8, la Fe 4, la CIAT 894, y la CFN 299 (bv. phaseoli tipo II). La GMI9023 (A. tumefaciens) también muestra algunas bandas de muy baja homología con este detector.

Con lo que respecta a las cepas definidas como grupos distintos del bv. phaseoli encontramos una representación baja de las secuencias del pCE3-d (figura 15). La cepa con mayor número de bandas de homología (9 bandas) es la CAR 22, una cepa del bv. phaseoli tipo II. La CO5-1 y la CIAT 899 (bv. phaseoli tipo II) muestran un grado de homología similar a la Vic 1 (bv. viceae), la USDA 2046 (bv. trifolii), Rme 1 (R. meliloti) y a la GMI9023 (A. tumefaciens), en cuanto a la intensidad y el número de sus bandas, pero no en la conservación de sus sitios de restricción. La 1596 (R. trifolii) solamente posee 2 bandas de homología débil.

Estos datos indican que el pCE3-d (pSim) se encuentra predominantemente en cepas del bv. phaseoli tipo I, y que secuencias de este plásmido están poco representadas en otras cepas.

**III. LOCALIZACION DE LAS SECUENCIAS DE LOS PLASMIDOS pCE3-a, b, c y d EN DIFERENTES CEPAS DE R. leguminosarum.** De los datos presentados hasta aquí, podemos decir que hay secuencias de DNA homólogas a los plásmidos pCE3-a, b, c y d, en la mayoría de las cepas de R. leguminosarum analizadas, con un grado de conservación variable. Para conocer si tales secuencias se localizan también en plásmidos en otras cepas hicimos experimentos de hibridización, utilizando los plásmidos pCE3-a, b, c y d, marcados radiac

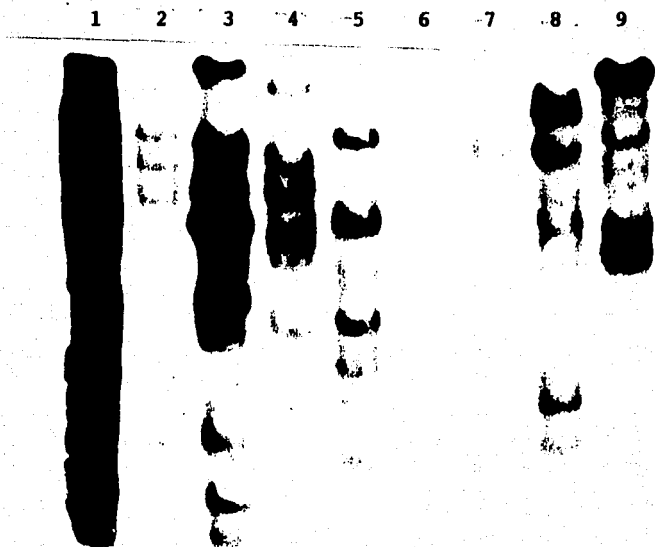


FIGURA 15. Presencia de secuencias homólogas al -- plásmido pCE3-d en distintas cepas de Rhizobium.

Carriles: 1- CE3 (bv. phaseoli tipo I); 2- COS-I (-bv. phaseoli tipo II); 3- CAR 22 (bv. phaseoli tipo II); 4- CIAT 899 (bv. phaseoli tipo II); 5- Vic 1 (-bv. viceae); 6- 1596 (bv. trifolii); 7- Rme 1 (R. -meliloti); 8- USDA 2046 (bv. trifolii); 9- GMI 9023 (A. tumefaciens sin plásmidos)

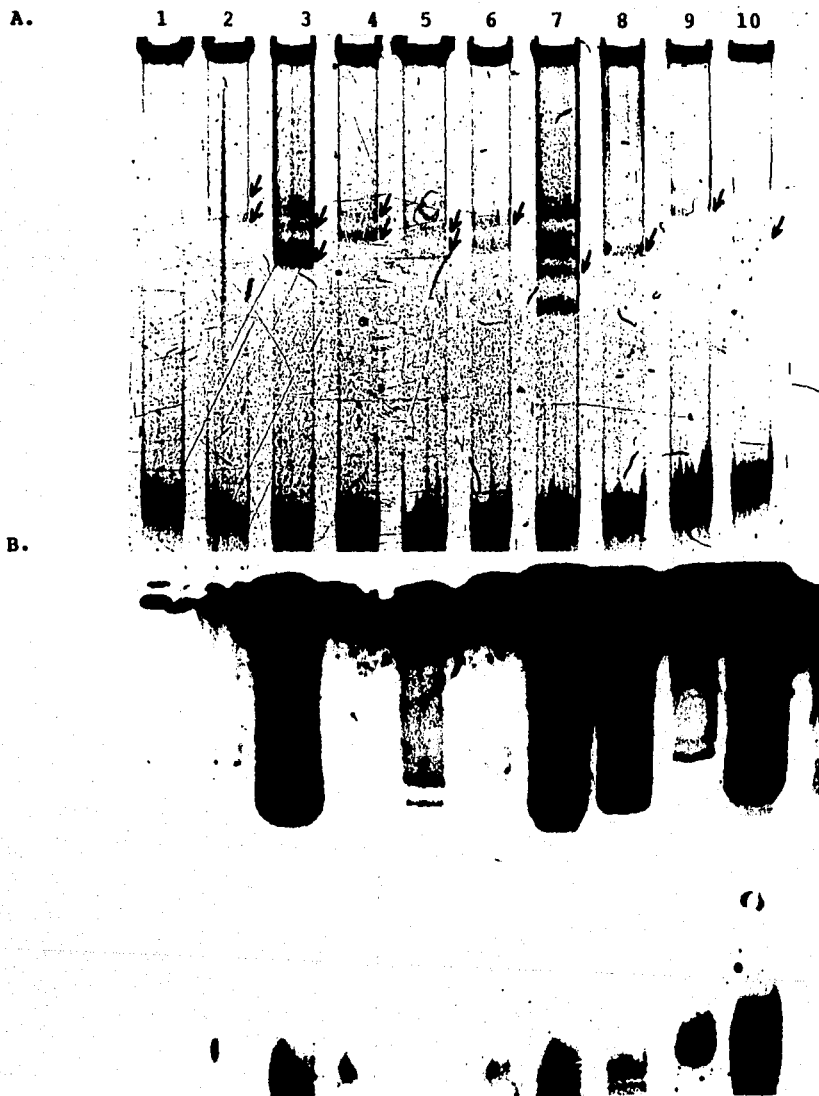
tivamente contra los perfiles electroforéticos de los plásmidos de algunas de las cepas, mediante el método de Eckhardt (1979).

**III-A. Localización de las secuencias homólogas al pCE3-a en cepas del bv. phaseoli tipo I.** En la figura 16 se muestran los perfiles electroforéticos y las hibridizaciones correspondientes al pCE3-a, en cepas pertenecientes al bv. phaseoli tipo I. Con excepción de la Viking I, todas las demás cepas dan señal de hibridización en uno o en dos plásmidos. Las cepas analizadas presentan los siguientes patrones de hibridización:

- i) Cepas con la señal de hibridización en un plásmido de peso molecular igual o de tamaño similar: Nitragin 8251, F 8, F 19
- ii) Una cepa cuya homología con el pCE3-a reside en una estructura de peso molecular mayor de 250 kb (Bra 5).
- iii) Cepas que tienen dos lugares de homología, generalmente una principal y otra de intensidad menor: CFN3, Acu3, F4, CIAT 281 . En este caso una de las bandas es de peso molecular cercano a la pCE3-a, mientras que la otra es de un peso molecular mayor de 250 kb.

En la CE3 se ha descrito que el plásmido pCE3-a tiene zonas de homología con el pCE3-d, y cuando es hibridizado contra su mismo perfil de plásmidos, se observan la señal en dos lugares. Es posible que en este conjunto de cepas se conserve una relación similar.

FIGURA 16. Localización de las secuencias homólogas al plásmido pCE3-a en cepas del bv. phaseoli tipo I.



A. Perfil electroforético de los plásmidos de las cepas. Carriles: 1- Viking I; 2- Acu 3; 3- CE3; 4- CFN 3; 5- F 4; 6- Bra 5; 7- F 8; 8- F 19; 9- CIAT 281; 10- Nitragin 8251. Las flechas señalan los sitios de hibridización.

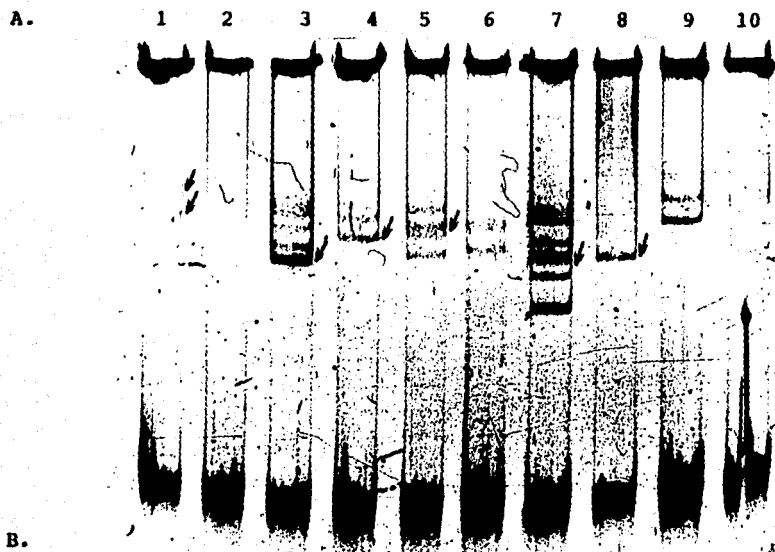
B. Autoradiografía correspondiente al gel.



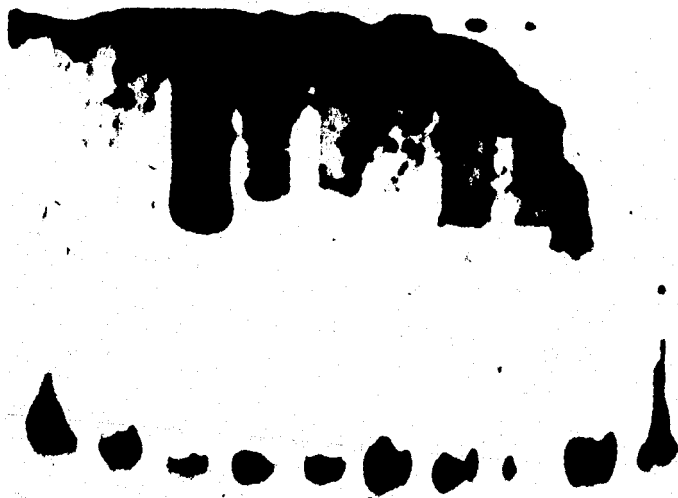
**III-B. Localización de las secuencias homólogas al pCE3-b en cepas del bv. phaseoli tipo I.** Las secuencias homólogas al pCE3-b se encuentran presentes en el genoma de la mayoría de las cepas analizadas y se localizan en un plásmido de peso molecular variable (figura 17). En algunas cepas (F8 y F19), la señal de homología se localiza en un plásmido de peso molecular similar al pCE3-b. Las cepas Viking I, Acu3, CIAT 281 y Nitragin 8251 no exhiben señal de hibridización o es muy débil en ninguno de sus plásmidos. Estas cepas tienen secuencias homólogas con el pCE3-b, como se observó en los experimentos de hibridización con DNA total. Es posible que estas secuencias se localizan principalmente en el cromosoma o en un plásmido de peso molecular elevado que no es detectado en nuestros procedimientos.

**III-C. Localización de las secuencias homólogas al pCE3-c en cepas del bv. phaseoli tipo I.** Las secuencias homólogas al pCE3-c se localizan generalmente en un plásmido de tamaño variable en cepas pertenecientes al bv. phaseoli tipo I (figura 18). Las cepas con mayor homología son la CFN3, la Bra 5, la F19. Las cepas Viking I y F4 muestran una homología débil que sólo se revela con un tiempo de exposición de la autoradiografía más prolongado, mientras que la CIAT 281 y la Nitragin 8251 no revelan homologías con ninguno de sus plásmidos.

FIGURA 17. Localización de las secuencias homólogas al plásmido pCE3-b en cepas del bv. phaseoli tipo I.



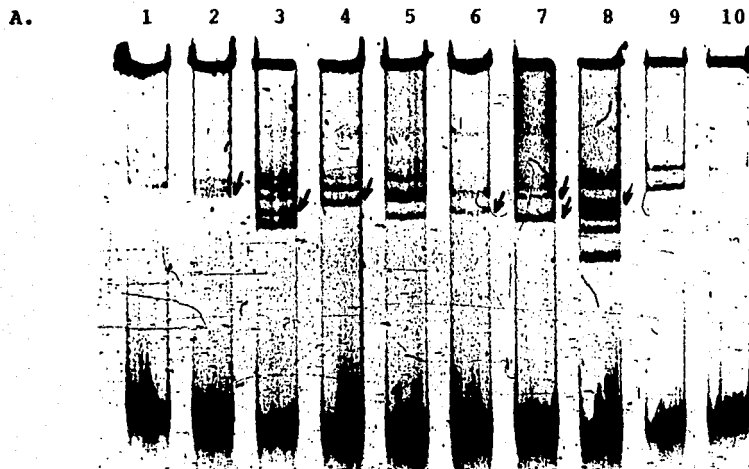
B.



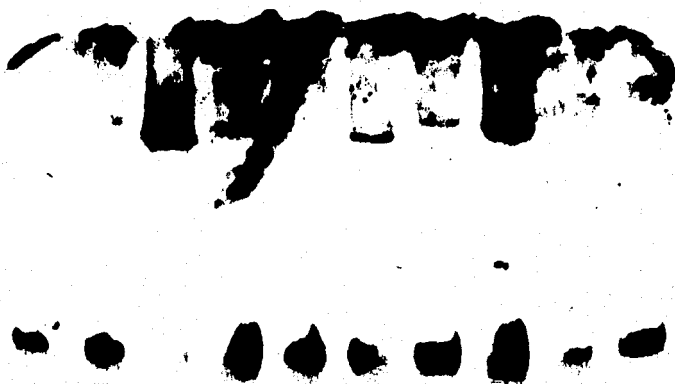
A. Perfil electroforético de los plásmidos de las cepas. Carriles: 1- Viking I; 2- Acu 3; 3- CE3; 4- CFN 3; 5- F 4; 6- Bra 5; 7- F 8; 8- F 19; 9- CIAT 281; 10- Nitragin 8251. Las flechas señalan los sitios de hibridización.

B. Autoradiografía correspondiente al gel.

FIGURA 18. Localización de las secuencias homólogas al plásmido pCE3-c en cepas del bv. phaseoli tipo I.



B.



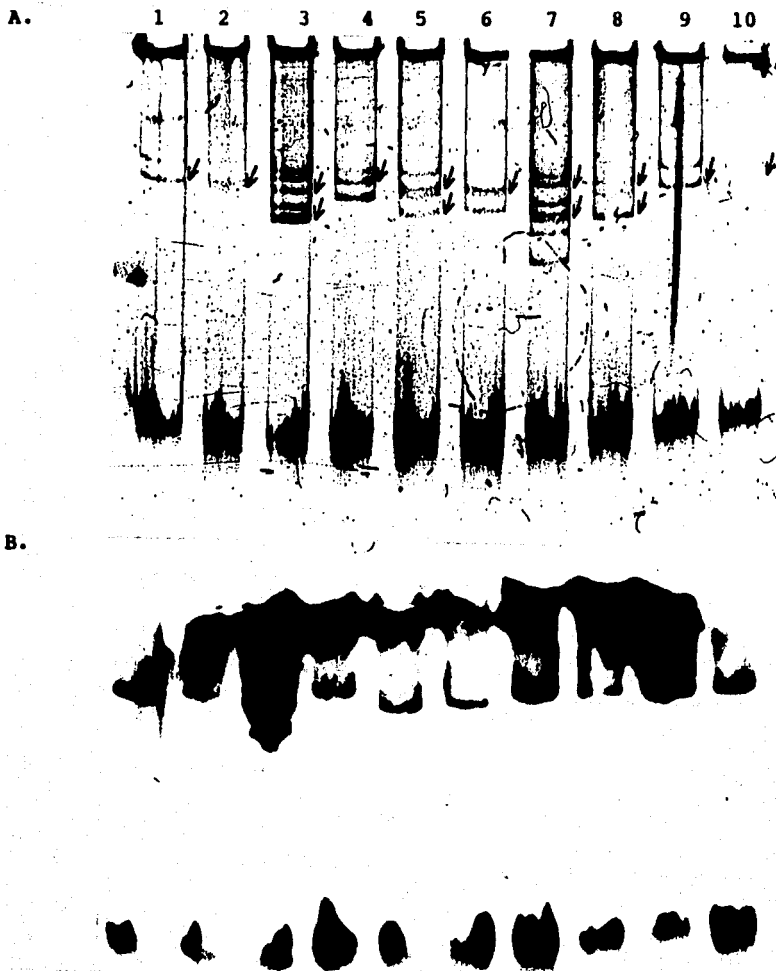
A. Perfil electroforético de los plásmidos de las cepas. Carriles: 1- Viking I; 2- Acu 3; 3- CE3; 4- CFN 3; 5- F 4; 6- Bra 5; 7- F 19; 8- F 8; 9- CIAT 291; 10- Nitragin 8251. Las flechas señalan los sitios de hibridización.

B. Autoradiografía correspondiente al gel.

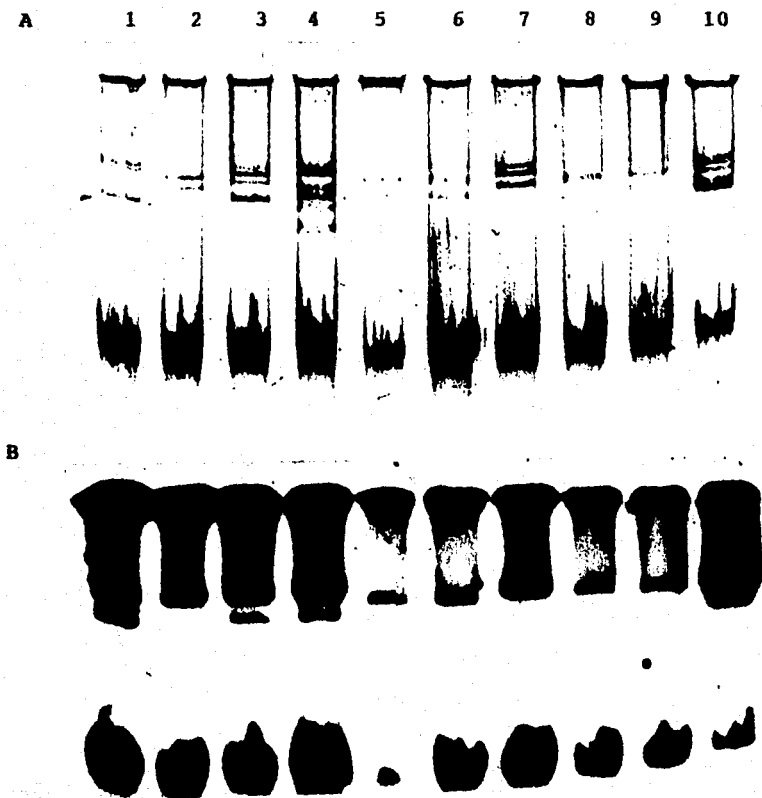
III-D. Localización de las secuencias homólogas al pCE3-d en cepas del bv. phaseoli tipo I. Como citamos anteriormente, existen datos acerca de la relación estructural del pCE3-d y el pCE3-a. En los experimentos descritos aquí, damos evidencia que esta es una relación común en cepas del bv. phaseoli. En seis de las cepas del bv. phaseoli analizadas: F 4, F 8, F 19, Nitragin 8251, adicionalmente a una banda de homología principal que corresponde al pCE3-d, hay una banda de bajo peso molecular. Esta es la misma que hibridiza con el pCE3-a (figura 19). En algunas cepas el plásmido que hibridiza es de un tamaño ligeramente superior al pCE3-d, estas son la Nitragin 8251, la CIAT 281, la F19, la F8, la CFN3 y la Acu 3. Un plásmido homólogo y de igual tamaño al pSim lo contienen las cepas F4 y Bra 5.

Con el objeto de conocer el grado en que se relacionan los plásmidos homólogos al pCE3-d y al pCE3-a, en las distintas cepas, hibridizamos seis cósmidos que contienen secuencias del pCE3-D contra los perfiles de plásmidos de cada una de las cepas. Estos cósmidos representan un 25% del plásmido completo. En la figura 20 se muestra la autoradiografía correspondiente a uno de estos cósmidos (cGD-35), que lleva la región nifH-c. Cuatro de estas cepas (F4, Bra5, F8 y Nitragin 8251) hibridizan en dos plásmidos, en el resto de las cepas solamente hay señal de hibridización en el plásmido simbiótico. Sin embargo, no es la única región en la que se comparten homologías. En la tabla 3 se indica la hibridización con los seis cósmidos, en las 10 cepas utilizadas. Todos los cósmidos dan dos señales de hibridización en,

FIGURA 19. Localización de las secuencias homólogas al plásmido pCE3-d en cepas del bv. phaseoli tipo I.



A. Perfil electroforético de los plásmidos de las cepas. Carriles: 1- Viking I; 2- Acu 3; 3- CE3; 4- CFN 3; 5- F 4; 6- Bra 5; 7- F 8; 8- F 19; 9- CIAT 281; 10- Nitragin 8251. Las flechas señalan los sitios de hibridización.  
B. Autoradiografía correspondiente al gel.



**FIGURA 20.** Localización de las secuencias homólogas al cósmido 35 del pSim-CE3. A. Perfil electroforético de los plásmidos. Carriles: 1- Nitragin 8251; 2- CIAT 281; 3- F 19; 4- F-8; 5- Bra 5; 6- F 4; 7- CFN 3; 8- Acu 3; 9- Viking I; 10- CE 3.

**B.** Autoradiografía correspondiente al gel.

**TABLA 3. PRESENCIA DE REGIONES DEL pCE3-d  
EN LOS PLÁMIDOS DE CEPAS DEL bv. phaseoli**

| CEPA          | COSMIDO |       |       |       |        |        |
|---------------|---------|-------|-------|-------|--------|--------|
|               | cGD15   | cGD35 | cGD45 | cGD47 | cGD105 | cGD106 |
| CE3           | 2*      | 2     | 2     | 1**   | 2      | 1      |
| ACU 3         | 1       | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      |
| BRA 5         | 1       | 1     | 1     | 1     | 1      | 2      |
| CFN 3         | 1       | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      |
| CIAT 281      | 1       | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      |
| F 4           | 1       | 1     | 1     | 2     | NP***  | 2      |
| F 8           | 2       | 2     | 2     | 2     | 2      | 2      |
| F 19          | 2       | 2     | 2     | 2     | 2      | 1      |
| NITRAGIN 8251 | 2       | 2     | 2     | 1     | 1      | 2      |
| VIKING I      | NP      | 1     | NP    | NP    | 1      | 1      |

\* Hibridización en dos plásmidos

\*\* Hibridización en un plásmido

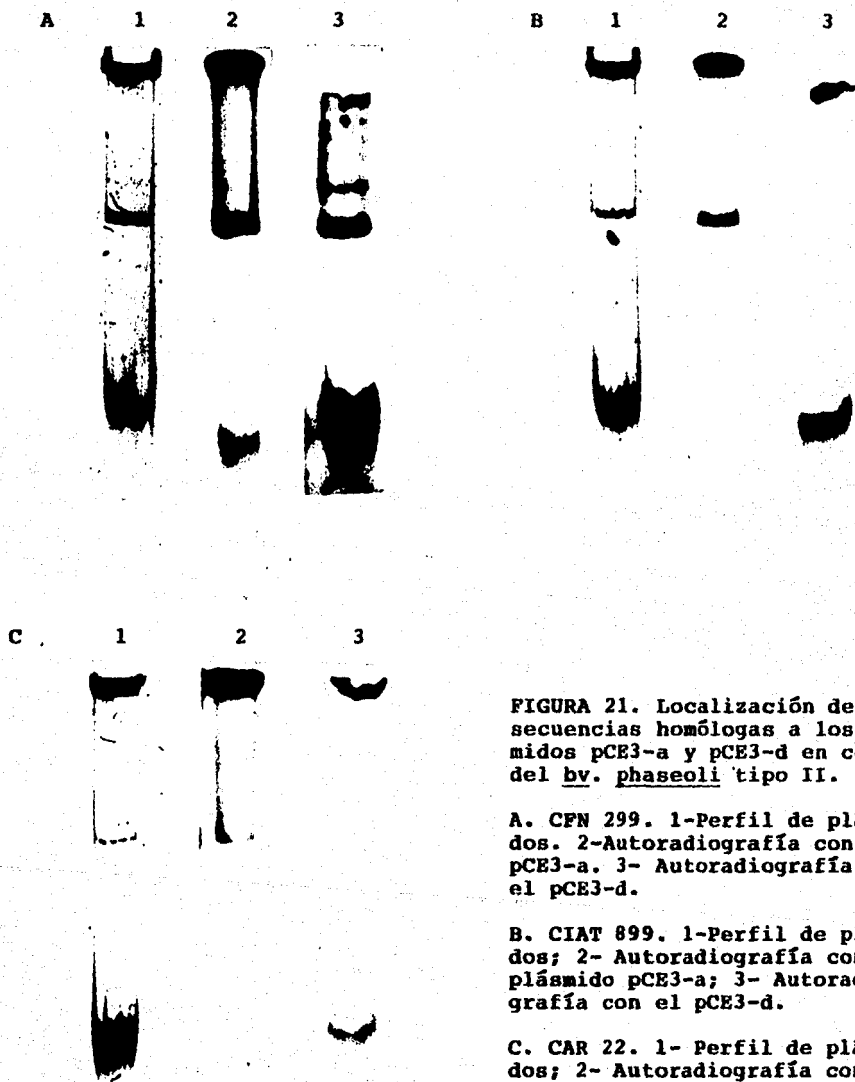
\*\*\* No probadas.

**Nota:** Los cósmidos cGD105 y cGD106 han sufrido rearrreglos genéticos durante su mantenimiento en el laboratorio, por lo que finalmente no fueron considerados en el mapa total del pSim (M. L. Girard, comunicación personal).

al menos, tres o cuatro de las cepas. La Acu 3, la CFN3 y la CIAT 281 solamente dan una señal de hibridización con cualquiera de los cósmidos utilizados. Las cepas con más regiones homólogas repartidas en dos plásmidos son la F8, F19, Nitragin 8251, CE3, F4 y Bra5. Estos experimentos indican que no es una sola región del plásmido simbiótico la que presenta homología con el pCE3-a, y que esta relación se conserva en la mayoría de las cepas.

III- E. Localización de las secuencias homólogas a los plásmidos pCE3 a, b, c y d en cepas del bv. phaseoli tipo II. Solamente dos de los plásmidos probados dan señal de hibridización con los plásmidos de tres cepas del bv. phaseoli tipo II. El pCE3-a y el pCE3-d hibridizan en un plásmido de aproximadamente 250 kb en las tres cepas probadas (figura 21). La CFN 299 tiene dos plásmidos de peso muy similar. En este experimento no podemos discernir en cual de ellos se localiza la homología. El pSim-CFN 299, tiene un peso molecular de aproximadamente 450 kb. El pCE3-d da una señal de homología principalmente con este plásmido, pero también con uno de los plásmidos de menor tamaño. El plásmido pCFN-299-b, es capaz de incrementar la fijación de nitrógeno en A. tumefaciens GMI9023, que contiene el pSim-299 (Martínez, et. al., 1987). Además, cuando este plásmido es transferido a cepas del bv. phaseoli tipo I, les confiere a estas cepas una capacidad competitiva por nodulación mayor, en relación a las cepas parentales que no lo tienen (Martínez and Rosenblueth, enviado a publicar). Esto sugiere, que el pCFN299-b, tiene determinantes simbióticos que aún no han sido detectados. Experimentos de hibridización de este plásmido





**FIGURA 21.** Localización de las secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a y pCE3-d en cepas del bv. phaseoli tipo II.

**A. CFN 299.** 1-Perfil de plásmidos; 2-Autoradiografía con el pCE3-a; 3- Autoradiografía con el pCE3-d.

**B. CIAT 899.** 1-Perfil de plásmidos; 2- Autoradiografía con el plásmido pCE3-a; 3- Autoradiografía con el pCE3-d.

**C. CAR 22.** 1- Perfil de plásmidos; 2- Autoradiografía con el pCE3-a; 3- Autoradiografía con el pCE3-d.

purificado, contra un conjunto de cósmidos derivados del pCE3-d, indican que no es en este plásmido donde reside la homología que observamos (Rosenblueth, sin publicar). Es probable, que la homología con el pCE3-d, resida entonces en el plásmido pCFN-299-a.

En estos experimentos no detectamos homologías para los plásmidos pCE3-b y pCE3-c. A nivel de genoma total, estos plásmidos presentan algunas secuencias comunes a la cepa CIAT 899, pero no con la CFN 299. Es posible, que en la cepa CIAT 899, las secuencias homólogas a estos plásmidos, se localizen cromosomalmente o en un plásmido de gran tamaño que no es recuperado en nuestros procedimientos.

**III- F. Localización de las secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a, b, c y d en las cepas Vic 1 (by. viceae), 1596 (by. trifolii) y Rme 1 (R. meliloti).** La cepa Vic 1 revela algunas secuencias homólogas a los cuatro plásmidos utilizados como detectores, en experimentos de hibridación en DNA total (figuras 4, 8, 11 y 15). Solamente los plásmidos pCE3-c y pCE3-d muestran una homología buena con alguno de los plásmidos de esta cepa (figura 22). El pCE3-d hibridiza fuertemente en tres de los plásmidos de la VIC 1.

Los plásmidos de la cepa 1596, tienen homología con el pCE3-b, con el pCE3-c y con el pCE3-d. Por último, la Rme 1 tiene secuencias homólogas al plásmido pCE3-a, y muy débiles al plásmido pCE3-d, localizadas en el único plásmido detectado. En general,

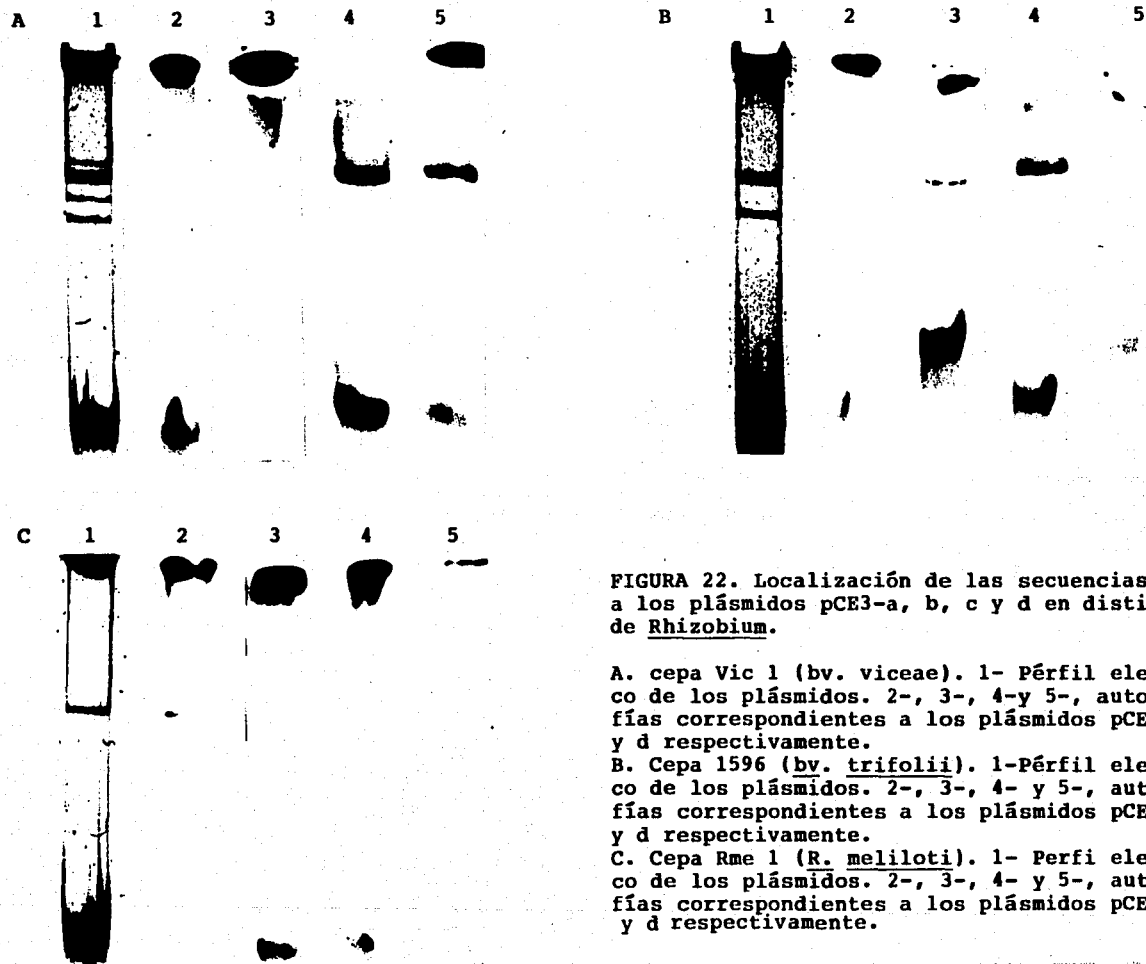


FIGURA 22. Localización de las secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a, b, c y d en distintas cepas de Rhizobium.

A. cepa Vic 1 (*bv. viceae*). 1- Perfil electroforético de los plásmidos. 2-, 3-, 4-y 5-, autoradiografías correspondientes a los plásmidos pCE3-a, b, c y d respectivamente.

B. Cepa 1596 (*bv. trifolii*). 1-Perfil electroforético de los plásmidos. 2-, 3-, 4- y 5-, autoradiografías correspondientes a los plásmidos pCE3-a, b, c y d respectivamente.

C. Cepa Rme 1 (*R. meliloti*). 1- Perfil electroforético de los plásmidos. 2-, 3-, 4- y 5-, autoradiografías correspondientes a los plásmidos pCE3-a, b, c y d respectivamente.

esta cepa tiene muy pocas secuencias comunes a los plásmidos de la CE3.

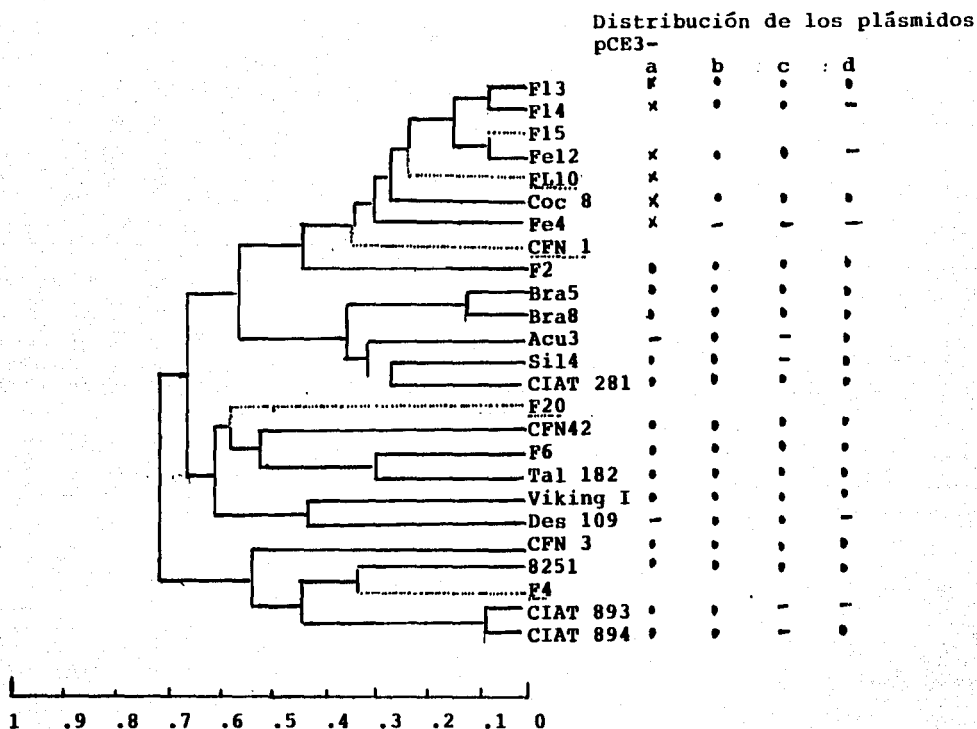
**IV. DIVERSIDAD DE PLASMIDOS EN RELACION AL GENOTIPO.** Cada una de las cepas utilizadas en este trabajo tienen un conjunto de plásmidos característico. Como hemos señalado, la mayoría contiene secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a, b, c y d en proporción variable. Las cepas correspondientes al bv. phaseoli tipo I han sido caracterizadas en cuanto a la variación en sus enzimas cromosomales, representando cada una de estas un electroferotipo (ET) distinto (Piñero et. al., 1988). En la figura 23 se muestra el dendrograma que relaciona a los ETs de acuerdo a la distancia genética (Piñero, et. al. 1988). En relación a la distribución de las secuencias de los plásmidos en estos genotipos podemos hacer las siguientes observaciones:

i) Las secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a, b, c y d son prevalentes en distintos genotipos cromosomales. La presencia de estas secuencias no es particular a uno de los grupos de genotipos sino que es independiente de la distancia genética que los relacione.

ii) Los patrones de variación en el número y conservación de las secuencias homólogas no son uniformes. Esto es, que en una cepa un plásmido puede estar bien representado, mientras que otro no.

iii) El pCE3-d (pSim), aunque tiene un extenso polimorfismo en el sitio EcoRI, se encuentra con una buena conservación general, en cepas del bv. phaseoli tipo I.

FIGURA 23. Distribución de las secuencias de los plásmidos pCE3-a, pCE3-b, pCE3-c y pCE3-d en distintos genotipos cromosomales de cepas del bv. phaseoli. El dendrograma fué generado a partir de los datos reportados por Piñero et. al., (1988) por el método de Nei (1979).



Distancia Genética

• Presencia de secuencias homólogas

- Ausencia de secuencias homólogas

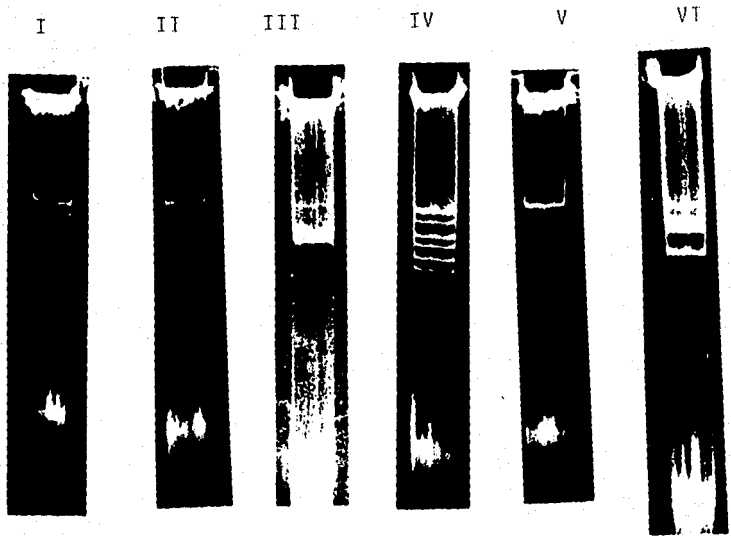
x no probadas

..... Las líneas punteadas indican cepas que no se analizaron

**V. DIVERSIDAD DE PLÁSMIDOS EN ELECTROFEROTIPOS CERCANOS.** Los distintos patrones de migración electroforética de los plásmidos observados en cada cepa han sido un buen marcador de su identidad. Generalmente un ET es equivalente a una cepa y le corresponde un perfil de plásmidos particular. Sin embargo no se ha examinado un conjunto adecuado de cepas pertenecientes a un mismo ET como para detectar alguna variación en los plásmidos que poseen.

En este experimento nosotros analizamos el perfil de los plásmidos de cepas del bv. phaseoli provenientes de un campo de cultivo de frijol de Tepoztlán, Morelos, que han sido caracterizadas de acuerdo a sus ETS (Souza, 1990). De tres de los ETS más frecuentes tomamos los siguientes números de cepas: ET 10, 4 cepas, ET 12, 4 cepas y ET 19, 2 cepas. La figura 24 muestra los perfiles de plásmidos obtenidos en este conjunto de cepas, y en la tabla 4 se puede observar, la variación en sus patrones de plásmidos. La observación principal que se deduce de estos experimentos es que ETS iguales pueden tener hasta tres perfiles de plásmidos distintos, y que un mismo perfil de plásmidos puede encontrarse al menos en dos electroferotipos.

Los patrones de plásmidos pueden generarse por eventos de rearrreglos internos a la cepa o bien por adición de plásmidos por transferencia horizontal. Si hay rearrreglos de plásmidos, la información contenida en el ET debe ser común. Nosotros hibridizamos los plásmidos pCE3-a, pCE3-b, pCE3-c y pCE3-d con cada uno de



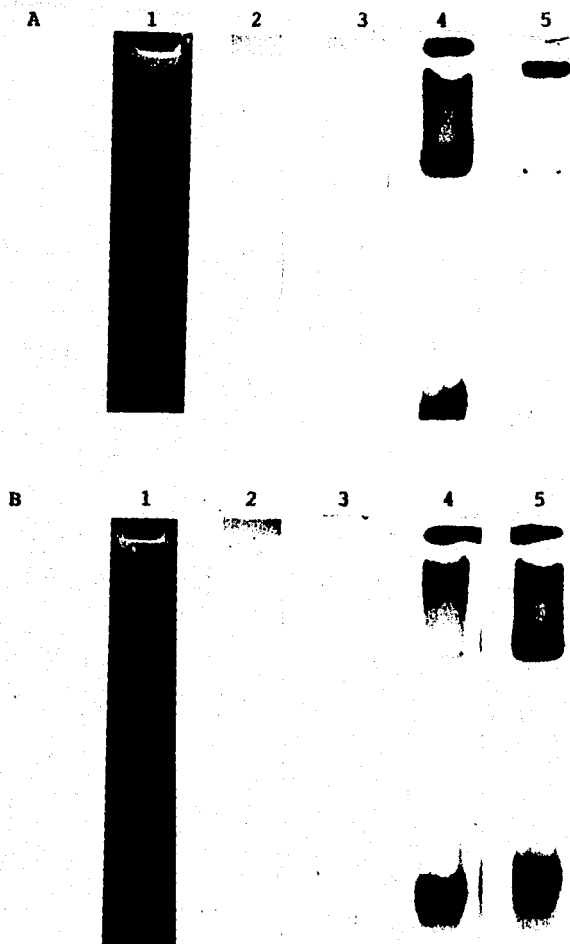
**FIGURA 24.** Perfiles electroforéticos de los plásmidos de cepas aisladas de nódulos de frijol en Tepoztlán, Morelos.

**TABLA 4. PATRONES DE PLASMIDOS EN RELACION AL ELECTROFEROTIPO (ET) EN CEPAS DEL bv. phaseoli DE TEPOZTLAN, MORELOS**

| <b>ET</b> | <b>CEPA</b> | <b>PATRON</b> |
|-----------|-------------|---------------|
| 10        | 18          | II            |
| 10        | 19          | II            |
| 10        | 21          | VI            |
| 10        | 91          | VI            |
| 12        | 5           | V             |
| 12        | 9           | IV            |
| 12        | 53          | V             |
| 12        | 73          | I             |
| 19        | 11          | III           |
| 19        | 66          | II            |



estos perfiles de plásmidos y observamos que al menos parte esta información genética se encuentra en las cepas analizadas y se localiza en plásmidos (figura 25-A, B, C, D, E Y F).



**FIGURA 25.** Presencia de secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a, b, c y d en cepas del *bv. phaseoli* de Tepoztlán, Morelos. A. Cepa 1273 (patrón de plásmidos I); B. Cepa 1018 (patrón de plásmidos II); C. cepa 1911 (patrón de plásmidos = III). D. Cepa 129 (patrón de plásmidos IV); E. Cepa 125 (patrón de plásmidos V); F. Cepa 1091 (patrón de plásmidos VI)

Carriles 1, 2, 3, 4 y 5, señalan el perfil electroforético de los plásmidos de las cepas y las hibridaciones correspondientes a los plásmidos pCE3-a, b, c y d respectivamente.

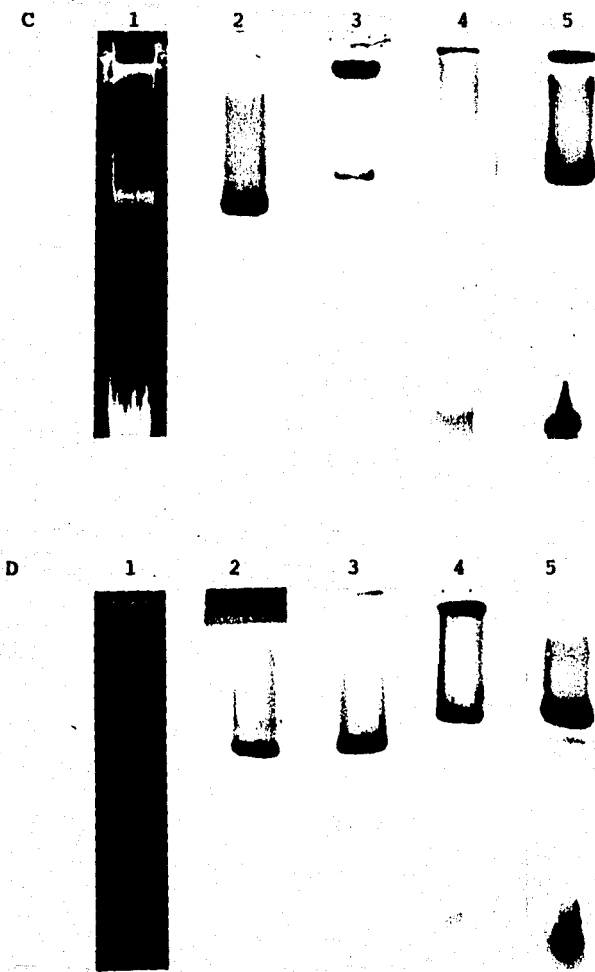


FIGURA 25. C y D

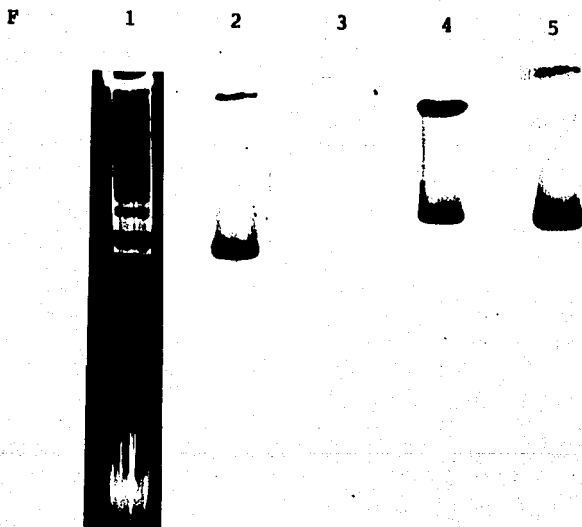
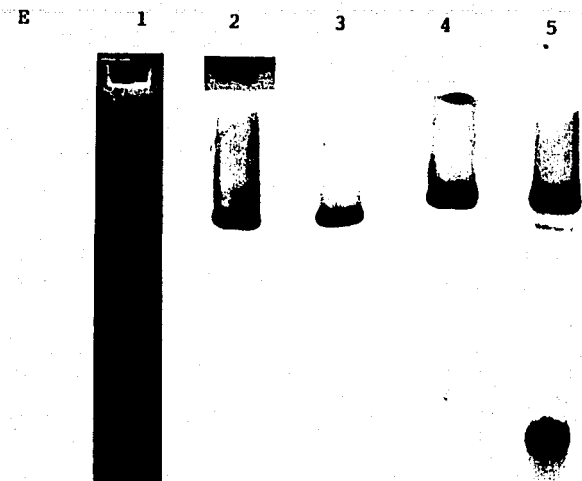


FIGURA 25 E y F.

## DISCUSION

Las especies bacterianas tienen dos maneras de generar variabilidad; una de ellas es interna a la línea evolutiva o clona y deriva fundamentalmente de los procesos de mutación y rearrreglos de su material genético por recombinación. Otra manera, es mediante la incorporación de genes por transferencia horizontal, bien sea por conjugación, transducción o transformación.

Durante muchos años, uno de los problemas de la taxonomía de las bacterias, ha sido la carencia de criterios adecuados para examinar su variabilidad. Enfoques derivados de la genética de poblaciones y enfoques filogenéticos, basados en la secuenciación de genes ribosomales, están siendo utilizados en la caracterización de las especies bacterianas (Selander, et. al., 1987; Woese, 1987). Sin embargo, aún carecemos de un concepto claro que defina los límites entre una especie bacteriana y otra.

En eucariotes las especies se definen como aquellas poblaciones que son capaces de intercambiar su material genético - y el límite lo establece el aislamiento reproductivo (Mayr, 1985). En las bacterias no existe un concepto similar. Existen límites al intercambio de material genético entre diferentes bacterias, como son los sistemas de recombinación, de restricción y modificación de DNA, sistemas de reparación de "mismatch" y de incompatibilidad de plásmidos, pero estos no son suficientes puesto que pueden ser

superados al menos en condiciones de laboratorio. Por ejemplo, mutaciones en los genes mutL, mutS y mutH del sistema de reparación de "mismatch" pueden levantar la barrera de recombinación entre E. coli y S. tiphimurium, bacterias que divergieron hace aproximadamente 150 millones de años (Rayssiguier, et. al., 1989). Además, los híbridos formados en este tipo de cruza, recombinan a muy baja frecuencia con las cepas parentales, por lo cual pueden considerarse como nuevas especies, bajo el concepto de un aislamiento de tipo reproductivo (Rayssiguier, et. al., 1989).

La estructura genética de las poblaciones bacterianas es básicamente clonal, con poca recombinación entre las clonas. El descubrimiento de que algunos genes cromosomales de E. coli, han sido sujetos a recombinación foránea (Stolfztus, et. al. 1988; Dubosse, et. al., 1988), indica que sí hay eventos de transferencia genética en la historia evolutiva de la bacteria, pero aún se desconoce frecuencia de los mismos y el papel que juegan en la especiación de las bacterias.

Los plásmidos constituyen un compartimento genético catalogado como información accesoria (Reannney, 1978; Campbell, 1981). Bajo algunas circunstancias ambientales son determinantes para la sobrevivencia de la población que los tiene, pero de la mayoría de ellos se desconoce para que sirven. El papel que juegan los plásmidos en la conformación de la estructura genética de las poblaciones y en el flujo de genes entre especies bacterianas, se puede evaluar estudiando la relación estructural y funcional entre plásmidos y cromosoma, a nivel de la organización interna y a nivel de poblaciones. Preguntas acerca de la trans-

ferencia horizontal de genes, la coevolución plásmido-cromosoma y de la concepción de genoespecies bacterianas propuesta por Reaney (1978), se encuentran subyacentes a este enfoque.

En este trabajo hemos examinado los siguientes puntos en relación a algunos de los plásmidos presentes en una colección de cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli:

- I. Distribución de secuencias de plásmidos en diferentes genotipos cromosomales.
- II. Relación estructural entre distintos plásmidos.
- III. Diversidad de plásmidos en electroferotipos cercanos.

**I. DISTRIBUCION DE SECUENCIAS DE PLASMIDOS EN DIFERENTES GENOTIPOS CROMOSOMALES.** En este trabajo hemos buscado la presencia de secuencias homólogas a los plásmidos pCE3-a, pCE3- b, pCE3-c y pCE3-d, en una variedad de cepas pertenecientes a R. leguminosarum bv. phaseoli. La conclusión principal derivada de estos experimentos es que existen secuencias comunes a los plásmidos probados en un amplio rango de genotipos cromosomales. El número de secuencias compartidas y la extensión de la homología de las mismas es muy variable.

**I-A. Presencia del plásmido pCE3-d.** El plásmido mejor representado entre las cepas utilizadas es el pCE3-d, lo cual es de esperarse debido a que este contiene la mayoría de los genes que participan en el proceso simbiótico. A nivel de homología global es un plásmido bastante conservado, aunque hay un extenso polimorfismo

en el sitio de reconocimiento de EcoRI, la enzima de restricción utilizada en nuestros experimentos. Análisis de RFLP's, utilizando cósmidos derivados del pCE3-d en un conjunto de cepas del bv. phaseoli, también han revelado un alto polimorfismo en la secuencias de este plásmido (Dávila, et. al., 1988). Young y Wexler (1988), en su estudio de correlación de algunas regiones del pSim y del cromosoma de cepas del bv. viceae, encuentran que la divergencia observada en las secuencias del pSim es de 11.4 %, mientras que para el cromosoma es 5.7 %. Esto sugiere que hay una mayor variabilidad en las secuencias de plásmidos que en las de cromosoma. De nuestros resultados no es posible conocer el grado de divergencia de este plásmido, dada la complejidad de los patrones de hibridización. La secuencia nucleotídica de regiones que codifiquen para funciones propias del plásmido, como son orígenes de replicación y de conjugación (si hay), pueden ser mejores parámetros para medir la relación genética entre plásmidos homólogos en una población de bacterias.

Las secuencias del pCE3-d, se encuentran mejor representadas en cepas del bv. phaseoli tipo I (figuras 12, 13 y 14). Fuera de este agrupamiento, tiene poca representación, en número de secuencias y en homología global. Esto sugiere que hay un mismo tipo de plásmido simbiótico en cepas del bv. phaseoli tipo I.

**I-B. Presencia de los plásmidos pCE3-b, pCE3-c y pCE3-d.** Estos plásmidos exhiben la misma situación polimórfica que el pCE3-D. La conservación que tienen en las cepas analizadas es muy heterogénea. El pCE3-a, que se transfiere a una frecuencia de  $10^{-2}$  a



10-3, a la CFN-2001 (derivada de la CE3, curada del pCE3-a y del pCE3-d) y a A. tumefaciens GMI9023 (Brom, sin publicar) está ausente en algunas cepas o representado por unas cuantas bandas de hibridización (Bra5, Acu3, des109, CIAT 893 y CIAT 894). La cepa Nitragin 8251 es la que presenta una homología considerable en relación al pCE3-A. Con respecto a su genotipo cromosomal, esta cepa se relaciona con la CE3 a una distancia genética de 0.6. Este es el ejemplo más sugerente en relación a un posible evento de transferencia horizontal de un plásmido.

El pCE3-b es el plásmido mejor representado en las cepas analizadas, con una buena conservación en el número de sus secuencias. El pCE3-C, por otra parte, es el menos representado, falta o hay pocas secuencias de él en 9 de 17 cepas analizadas. Sin embargo esta presente en cepas no muy relacionadas cromosomalmente como en la Bra5 y Bra 6 (distancia genética en relación a la CE3 es igual a 0.7).

Con respecto a estos plásmidos podemos concluir que sus secuencias son prevalentes en las cepas analizadas.

**I-C. DISTRIBUCION DE SECUENCIAS DE PLASMIDOS EN RELACION AL GENOTIPO.** Pocos estudios hasta la fecha han intentado definir la distribución de plásmidos en diferentes genotipos cromosomales. Hartl, et. al. (1986), señala que no hay una relación significativa entre la presencia de plásmidos mayores de 25 kb y cuatro genotipos de E. coli, caracterizados por sus antígenos de superficie, es decir se distribuyen independientemente del genotipo. Plásmidos menores de 25 kb, son más abundantes en algunos de estos genotipos

y en otros ausentes. Sin embargo, en estos trabajos solo se usa como marcador de la identidad del plásmido, la migración electroforética, y se sabe que existe una mayor diversidad en genotipos dentro de los grupos caracterizados por serotipos (Selander, et. al., 1987). Esto limita las conclusiones alcanzadas.

Los datos presentados a lo largo de este trabajo, indican que las secuencias de los plásmidos pCE3-a, pCE3-b, pCE3-c y pCE3-d, se distribuyen independientemente del genotipo cromosomal al cual pertenezca la cepa (figura 23). Las secuencias de estos plásmidos se encuentran predominantemente en cepas del bv. phaseoli, pero también se encuentran en cepas del bv. viceae y bv. trifolii, y en R. meliloti. El plásmido pCE3-b es el mejor representado en todo el rango de cepas analizadas.

Los datos de hibridización de los plásmidos, no pueden ser correlacionados con los patrones de divergencia cromosomal, pues no son traducibles en términos de similaridad y divergencia. La correlación ofrecida en este trabajo, es solo una aproximación. Un análisis cuantitativo de la homología global o de la secuencia nucleotídica de algunos genes de los plásmidos puede ayudarnos a establecer una mejor correlación entre plásmidos y cromosoma.

Esta distribución de secuencias de plásmidos puede ser resultado de eventos de transferencia horizontal y divergencia por mutación y recombinación. Aunque hay evidencia de transferencia horizontal en poblaciones naturales de Rhizobium, esta no es concluyente (Schofield, et. al., 1987; Young and Wexler, 1988; Broughton, et. al., 1987). En enterobacterias la dispersión de los genes de resistencia a los antibióticos ha sido explicada por

transferencia horizontal de plásmidos (Watanabe, 1964; Datta and Hughes, 1983; O'Brien, et. al., 1985). Esto no quiere decir que los plásmidos de Rhizobium se comporten de la misma manera, puesto que su hábitat natural es diferente, al de las bacterias entéricas.

Por otra parte, aún no se explica cómo los plásmidos son mantenidos en una población en ausencia de selección. Una posibilidad es que la tasa de pérdida de los plásmidos se encuentre en equilibrio con su tasa de transferencia (Levin, et. al., 1981). Modelos teóricos, que simulan las condiciones naturales en que viven las bacterias, señalan que la tasa de transferencia de plásmidos es muy baja (Levin, 1986). Además, se conoce que los plásmidos son heredados con un alto grado de estabilidad. Se estima que bacterias libres de plásmidos se originan a una frecuencia de 10<sup>-6</sup> (Nordstrom and Austin, 1989). En los plásmidos hay varios sistemas que aseguran su segregación estable, algunos son dependientes del número de copias y de la resolución de oligómeros por recombinación sitio específica, otros son dependientes de la presencia de locus específicos (par, hok/sok). Sistemas "killer", como el codificado por hok/sok del plásmido R1, son ejemplos interesantes de como un plásmido es mantenido en una población bacteriana. La función "killer" asegura que sólo las células que tengan el plásmido sobrevivan en la población, mientras que las que no lo tienen son eliminadas (Gerdes, et. al. 1985).

Dado que no se conoce la función de la mayoría de los plásmidos, tampoco parece obvio si algún tipo de selección natural actúa sobre ellos. Las cepas de Rhizobium, generalmente provienen

de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las leguminosas. La planta tiene un papel al seleccionar aquellas poblaciones que sean competitivas en relación a la nodulación. Este tipo de selección, recae fundamentalmente sobre el plásmido simbiótico, aunque no se puede descartar que otros determinantes genéticos se localizen en otros plásmidos o en el cromosoma (Martínez and Rosenblueth, 1990; Brom, sin publicar). Respecto a la prevalencia de secuencias de los plásmidos pCE3-a, b y c, en distintos genotipos del bv. phaseoli, no es posible decir que tengan una intervención directa en la simbiosis. La selección impuesta por la planta sobre el pSim de estas cepas, puede tener como consecuencia el arrastre de otros plásmidos, sin que necesariamente estos tengan que ver con la simbiosis.

**II. RELACION ESTRUCTURAL ENTRE DISTINTOS PLASMIDOS.** Los experimentos de localización de las secuencias homólogas a los plásmidos a, b, c y d de la CE3, indican que generalmente son contenidas en un plásmido de peso molecular variable. Esta observación es particularmente válida para las secuencias homólogas al pCE3-b y pCE3-c. Sin embargo, también es posible que las secuencias homólogas se localizen en dos, o en tres plásmidos (como es el caso de la Vic 1, bv. viceae). De estos casos el mejor documentado es el de la relación entre pCE3-a y pCE3-d. Se conoce que en la CE3, el plásmido a y el plásmido d, tienen secuencias repetidas compartidas (Flores, et. al., 1987; Girard, et. al. sin publicar). Es posible que en las demás cepas se mantenga una relación similar, mediada por secuencias repetidas. Otra posibilidad para explicar este

patrón de organización, es que en algunas cepas estos plásmidos se mantengan como cointegrados, y en otras como dos replicones independientes. Secuencias repetidas en ambos plásmidos pueden mediar este tipo de eventos. Sin embargo, no tenemos experimentos directos en este sentido.

Algunas cepas no presentan hibridización en ninguno de los plásmidos, únicamente en la zona del DNA cromosomal roto y en la entrada del carril del gel. Esto sugiere que las secuencias presentes en el genoma de estas cepas, es cromosomal o bien se localizan en un plásmido de peso molecular muy elevado que no es recuperado en nuestros geles. Hibridizaciones de los plásmidos contra digestiones totales del DNA de estas cepas confirma la existencia de regiones de homología. El significado de estos datos no es preciso todavía, pero se vuelven relevantes al considerar la estructura clonal de las poblaciones de Rhizobium, pues implica que es posible romper la clonalidad del cromosoma, con secuencias de DNA que tienen otra historia evolutiva. Por otra parte, es posible que se trate de plásmidos integrativos. En algunas bacterias fitopatógenicas, como Pseudomonas, Corynebacterium y Clavibacter (Coplin, 1989), se ha reportado la presencia de plásmidos integrativos. En Pseudomonas, un plásmido de 150 kb se inserta en el cromosoma, mediante secuencias repetidas específicas. La excisión de este plásmido, es imprecisa y da como resultado plásmidos deletados o bien plásmidos con fragmentos de DNA cromosomal (Curiale and Mills, 1982).

**III. DIVERSIDAD DE PLÁSMIDOS EN ELECTROFEROTIPOS CERCANOS.** De los experimentos ilustrados en las figuras 24 y 25, y en la tabla 4, concluimos que hay variación en el perfil electroforético de plásmidos, dentro de un electroferotipo (ET) similar. Además, diferentes ET's pueden tener un mismo perfil de plásmidos. Esto sugiere que, aún cuando por electroforesis de alelos de enzimas cromosomales pueda revelarse una gran parte de la variabilidad genética de las poblaciones, es posible encontrar más variación, en este caso en los plásmidos. También conocemos, que al menos parte de la información genética de los plásmidos pCE3-a, b, c y d, está presente en estas cepas. La variación en los perfiles de plásmidos puede deberse a rearrreglos internos del material genético de los plásmidos, o bien a la adición, por transferencia horizontal, o curación de los mismos.

## CONCLUSIONES

En resumen podemos concluir lo siguiente:

i) Las secuencias de los plásmidos pCE3-a, b, c y d, son prevalentes en cepas R. leguminosarum, principalmente en el bv. phaseoli tipo I, sin importar la distancia genética que relacione a estas cepas.

ii) Las secuencias homólogas se localizan extracromosomalmente generalmente en un plásmido, y a veces, en dos plásmidos.

iii) Desde el punto de vista taxonómico, podemos sugerir que al menos las cepas del bv. phaseoli tipo I, comparten un conjunto común de secuencias de plásmidos, y que poseen un solo tipo de plásmido simbiótico. Anteriormente, Jouanin, et. al. (1981) llegaron a una conclusión similar para R. meliloti, sólo que su análisis contempla número limitado de cepas. Nuestro trabajo es más extenso en este respecto.

iv) Los datos presentados en este trabajo van de acuerdo a la idea de genoespecies propuesta por Reaney (1981), en lo que se refiere a que diversos genotipos pueden compartir una poza común de plásmidos. Los patrones de distribución de secuencias que nosotros observamos, pueden ser generados por transferencia

horizontal de plásmidos, pérdida de los mismos, y divergencia por mutación y rearrreglos genéticos. Estos mecanismos pueden llevarse a cabo de una manera independiente al cromosoma. Si esto es así, se puede postular que el genoma de las bacterias está dividido en unidades evolutivas independientes.



## MATERIAL Y METODOS

**Cepas bacterianas.** En la tabla 2 se presenta la lista de las cepas utilizadas en este trabajo

**Plásmidos utilizados.** Los plásmidos utilizados en este trabajo son el pCE3-a, pCE3-b, pCE3-c y pCE3-d. Son mantenidos individualmente en la cepa de A. tumefaciens GMI9023, y provienen de la cepa del bv. phaseoli tipo I CE3 (CFN42 strp) (Flores, et. al., 1987).

**Medios y condiciones de cultivo.** Las cepas de Rhizobium fueron crecidas en PY (peptona de caseína 0.5%, extracto de levadura 0.3%, cloruro de calcio 7 mM) a una temperatura de 30°C con agitación a 250 rpm. Cuando se requirió medio sólido se le adicionó al medio anterior 1.5% de agar.

**Purificación de DNA total.** A partir de cultivos líquidos de 50 ml incubados toda la noche en las condiciones señaladas, se colectan las células por centrifugación a 6 000 rpm y las pastillas se resuspenden en 10 ml de TE 50/20 (Tris 50 mM EDTA 20 mM). Se centrifuga nuevamente y la pastilla se resuspende en 4 ml de TE 50/20. Se adicionan 0.5 ml de Pronasa (Calbiochem Inc.) a 5 mg/ml en TE 10/1 y 0.5 ml de SDS 10%. Se mezclan por inversión y se incuban 60 minutos a 37°C. La mezcla es pasada tres veces por una jeringa de 10 ml. Se extrae dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24/ 24/ 1). Se extrae dos veces con cloroformo absoluto. Se precipitan los ácidos nucleicos agregando 1/25 del volumen total de NaCl 5 M y 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se deja precipitar dos horas a -20°C y se centrifuga 15 minutos a 7 000 rpm. La pastilla se resuspende en 5 ml de TE 50/20 y se le agrega RNAasa a una concentración final de 0.2 mg/ ml. Se incuba a 37 °C por una hora. Se extrae dos veces con un volumen igual de fenol cloroformo-alcohol isoamílico y dos veces con cloroformo. Se precipita con 1/ 25 del volumen de NaCl 5M y 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifuga para obtener la pastilla de DNA, 15 minutos a 7 000 rpm . La pastilla se seca al vacío en una evaporadora Savant y se resuspende en 0.2 ml de TE 10/ 1.

**Digestiones de DNA total.** En este trabajo utilizamos la endonucleasa EcoRI, que es activa a 37° C y en condiciones de alta sal (Buffer de reacción: NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl2 10 mM). A una concentración de DNA determinada se le agrega el buffer de reacción, la enzima a 3 u/mg de DNA y se incuba toda la noche.

**Electroforesis en geles de agarosa.** Se utilizaron geles de agarosa al 1% y al 0.7% para cámaras de electroforesis verticales (Biorad). La cantidad de DNA aplicada en cada carril fue de 5mg/ml resuspendido en una solución de ficoll 400 000 al 20% y 0.01% de azul de bromofenol. Las corridas se hicieron a 80 V por 8 horas. Los buffers de corrida fueron Tris-Boratos (Tris-base 0.89 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) y Tris-Acetatos ( Tris 0.04 M, EDTA 0.001 M).

**Detección de Plásmidos.** Esto se llevó a cabo empleando la técnica de Eckhardt (1978), que parte de un cultivo líquido a una densidad óptica de 150 a 200 kletts. Se centrifuga 1 ml de cultivo y la pastilla es lavada con sarcocyl al 0.1%. Se descarta el sobrenadante y la pastilla se congela 10 minutos a -20°C. Después la pastilla se resuspende en una solución que contiene lisozima (70 000 mg/ml, RNAasa 0.3 mg/ml y ficoll 400 000 al 20%, en Tris Boratos. La mezcla se coloca en un gel de agarosa al 0.7% de 3 mm. Allí se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Después se le agregan 40 ml de una solución de SDS 0.2% y ficoll 400 000 (10%) en Tris Boratos y se mezcla cuidadosamente hasta homogenizar bien. Por último se le agregan 100 ml de una solución de SDS 0.2% y ficoll 400 000 (5%). No se mezcla. Hecho esto, el gel se sella con agarosa al 0.7% y somete a una corrida de 1 hora a 8 mA y 4 horas a 40 mA constantes. Posteriormente el gel se tiñe con bromuro de etidio (5 mg/ml) y se visualiza con luz UV.

**Purificación de plásmidos.** Se llevo a cabo de acuerdo al método de Hirsh (1979). Consiste en crecer las cepas en un cultivo líquido (PA: peptona de caseína 0.4 %, cloruro de magnesio 0.01 M). de 1000 ml, toda la noche con agitación de 250 rpm a 30°C, hasta una densidad óptica de 0.6. Se reparte el cultivo en botellas Beckman de 250 ml y se centrifugan a 7 000 rpm por 10 minutos. Las células se lavan con 100 ml de TE 50/20 pH 8. Se centrifugan nuevamente y la pastilla resultante se resuspende en 80 ml de TE 50 /20 pH 8. Se agregan 10 ml de Pronasa 2 mg/ ml predigerida una hora a 37°C, más 10 ml de SDS al 10%. Se mezcla y se incuba una hora a 37°C. El lisado se ajusta a una pH de 12.4 por adición cuidadosa de NaOH 3M. Se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 8.5 por adición de Tris-HCl 2 M pH 7. Se agrega NaCl 5 M a una concentración final de 1 M y se incuba en hielo 4 horas. Después se centrifuga a 10 000 rpm, se descarta la pastilla y al sobrenadante se le agrega PEG 50% a una concentración final del 10%. Se incuba 4 horas en hielo y se centrifuga nuevamente a 10 000 rpm. El sobrenadante es desechado y la pastilla se resuspende en 2.5 ml de TE 50/ 20. En este paso se puede tomar

una alícuota y correr en un gel para su visualización. El plásmido obtenido está listo para el último paso de purificación por gradientes de cloruro de cesio.

**Preparación de gradientes de cloruro de cesio.** La muestra de plásmido se lleva a un volumen de 4.3 ml con TE 50/20 pH 8. A esta solución se le agregan 4.3 g de Cloruro de Cesio y 430 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se calibra la solución en una balanza analítica, tomando 100 ml para una densidad de 1.58 g/ml. La muestra se coloca en tubos de polipropileno (Beckman) y se centrifuga en un rotor VTi65 a 43 000 rpm durante 17 horas. La banda del plásmido se visualiza por luz UV y se extrae por punción en el tubo con una jeringa de 1 ml. A la muestra obtenida se le extrae el bromuro de etidio que contiene, con un volumen igual de alcohol isomílico las veces que sea necesario, y se pone a dializar toda la noche en TE 10/1. Finalmente, el DNA de plásmido se precipita con NaCl 5 M (1/25) y 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto frío.

**Transferencia de DNA de un gel a membranas de nitrocelulosa.** Esto se hizo de acuerdo a Southern (1975). El gel se trata una vez con HCl 0.25 M en agitación 10 minutos, 2 veces con NaOH 0.5M NaCl 1.5M por 20 minutos y 2 veces de 20 minutos con Tris HCl 0.5M NaCl 1.5 M pH 7.4. Estos tratamientos se hace a 4°C. Después, el gel se coloca sobre un papel Whatman 3MM que hace puente con una solución de SSC 6X (SSC 1X: citrato de Sodio 0.015 M, NaCl 0.15 M, pH 7.0). Sobre el gel se coloca una membrana de nitrocelulosa previamente hervida en agua estéril por 10 minutos y lavada en SSC 6 X, 5 minutos. Encima de la membrana se coloca otro papel Whatman 3MM y sobre este se colocan suficientes toallas absorbentes. Finalmente se coloca un peso sobre las toallas. La transferencia se lleva a cabo a 4°C durante 12 horas. Al sacar la transferencia se enjuaga la membrana de nitrocelulosa en SSC 6X y se saca al vacío a 80°C durante 2 horas. Alternativamente, algunos de los geles fueron transferidos en "sandwich", para obtener dos membranas de nitrocelulosa con DNA de una sola electroforesis, siguiendo un procedimiento similar, solo que el gel, ya tratado, se coloca entre dos membranas de nitrocelulosa y una cantidad suficiente de toallas absorbentes a cada lado.

**Marcaje de moléculas de DNA con  $\alpha^{32}$ CTP.** Esto se realizó por el método de Rigby et. al. (1977). 200 ng del DNA a marcar se incuban con una mezcla de deoxiribonucleótidos fríos, deoxiCTP 32 y la enzima DNA polimerasa I. La reacción se incubaba por 2 horas a 14°C. La marca incorporada se separa de la marca libre mediante una columna de Sephadex G-75, y se cuenta en un detector de radiaciones gama.

**Hibridización.** Las hibridizaciones fueron hechas bajo condiciones estrictas de homología en buffer fosfatos a 65°C. La mezcla de prehibridización consiste de 1 ml de Denhardt 100 X (ficoll 5 g, polivinilpiridolina 5g y seroalbúmina bovina 5g en agua estéril), 2.5 ml de SSC 20X, buffer fosfatos pH 7.5 (fosfato monobásico de sodio 0.5 M y fosfato dibásico de sodio 0.5M) y DNA de timo de ternera como acarreador, a 50 mg/ ml, previamente desnaturalizado. Se incuba 2 horas a 65°C. Posteriormente se tira el líquido de la prehibridización y se agrega el detector marcado radiactivamente en una solución similar a la anterior solo que a la mitad de volumen. La hibridización se incuba a 65°C por 12 horas.

Los filtros de nitrocelulosa hibridizados se lavan, para quitar el exceso de marca radiactiva, una vez 15 minutos a temperatura ambiente con 2X SSC 0.15 de SDS, y lavados de 15 minutos a 55°C con 0.1X SSC 0.1% de SDS, las veces necesarias hasta eliminar la marca no incorporada. Finalmente se lavan en 0.1X SSC por 15 minutos a 55°C. Los filtros se secan a 65°C y se exponen en películas de rayos X por 3 días o una semana.

## LITERATURA CITADA

Allen, O. N. and Allen, E. K., 1981. The Leguminosae: a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. University of Wisconsin Press, Madison, U. S. A.

Beltrán, P., Musser, J. M., Helmut III, R., Farmer, J. J., Frerichs, W. M., Watchsmutn, I. K., McWhorter, A. C., Well, J. G., Cravioto, A. and R. K. Selander, 1988. Toward a population genetics analysis of Salmonella: genetic diversity and relationships among strains of serotypes of S. choleraesuis, S. derby, S. dublin, S. enteritis, S. heidelberg, S. infantis, S. newport and S. typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 7753-7757.

Beynon, J. L. and D. P. Josey, 1980. Demonstration in a natural population of Rhizobium phaseoli using variation in intrinsic antibiotic resistance. J. Gen. Microbiol. 118: 437-442.

Brewin, N. M., Beringer, J. E. and A. W. B. Johnston, 1980. Plasmid mediated transfer of host range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 120: 413-420.

Broughton, W. J., Samrey, U. and J. Stanley, 1987. Ecological genetics of Rhizobium meliloti: symbiotic plasmid transfer in the Medicago sativa rhizosphere. FEMS Microbiol. Lett. 40: 251-255.

Campbell, A., 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 35: 55-83.

Chen, W. X., Yan, G. H. and J. L. Li, 1988. Numerical taxonomy study of fast-growing rhizobia and a proposal that Rhizobium freddi be assigned to Sinorhizobium gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 392-397.

Coplin, D. L., 1989. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 27: 187-212.

Crow, V. L., Jarvis, B. W. D. and R. M. Greenwood, 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of Rhizobium. Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 152-172.

Curiale, M. S. and D. Mills, 1982. Integration and partial excision of a cryptic plasmid in Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. J. Bacteriol. 152: 797-802.

Currier, T. C. and E. W. Nester, 1976. Evidence for diverse types

of large plasmids in tumor-inducing strains of Agrobacterium. J. Bacteriol. 126: 157-165.

Datta, N. and Hughes, V. M., 1983. Plasmids of the same Inc groups in enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. Nature 306: 616-617.

Dávila, G., Brom, S., Flores, M., Girard, M. L., González, V., Louzada, M., Martínez, J., Martínez, E., Palacios, R., Piñero, D., Romero, D. and A. M. Valdés, 1988. The symbiotic genome of Rhizobium phaseoli, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, R. Palacios and D. P. S. Verma (eds). APS Press, Minnesota, U. S. A.

Demezas, D. H., Watson, J. M., Reardon, T. B. and A. H. Gibson, 1988. A molecular approach to Rhizobium ecology, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, R. Palacios and D. P. S. Verma (eds.). APS Press, Minnesota, U. S. A.

Denny, T. D., Gilmour, M. and R. K. Selander, 1988. Genetic diversity and relationships of two phatovars of Pseudomonas syringae. J. Gene. Microbiol. 134: 1949-1960.

Drummond, M. H. and M. D. Chilton, 1978. Tumor-inducing (Ti) plasmids of Agrobacterium share extensive regions of DNA homology. J. Bacteriol. 136: 1178-1183.

Dubosse, R. F., Dikhuizen, D. and D. Hartl, 1988. Genetic exchange among isolates of bacteria: recombination within the phoA gene locus of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 7036-7040.

Eardly, B. D., Hannaway, D. B. and P. J. Bottomley, 1985. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants (Phaseolus vulgaris (L) Savi. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1422-1426.

Eardly, B. D. L., Materon, L. A., Smith, N. H., Johnson, D. A., Rumbaugh, M. D. and R. K. Selander, 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium Rhizobium meliloti. Appl. Environ. Microbiol. 56: 187-194.

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

Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G. and R. Palacios, 1987. Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium. J. Bacteriol. 169: 5782-5788.

Flores, M., González, V., Pardo, M. A., Leija, A., Martínez, E.,

- Romero, D., Dávila, G., Piñero, D. and R. Palacios, 1988. Genomic instability in Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 170: 1191-1196.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsens, K. R., Chen, K. N. and C. R. Woese, 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science 209: 457: 463.
- Gardes, M., Bousquet, J. and M. Lalonde, 1987. Isozyme variation among forty Frankia strains. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1596-1603.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B. and S. Molin, 1985. Unique type of plasmid maintenance functions: postsegregational killing of plasmid free cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3116-3120.
- Gibbins, A. M. and K. F. Gregory, 1972. Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by three methods of Nucleic acid hybridization. J. Bacteriol. 111: 129-141.
- Graham, P. H., 1964. The application of computer techniques to the taxonomy of root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol. 35: 511-517.
- Hartl, D., Medhora, M., Green, L. and D. E. Dykhuizen, 1986. The evolution of DNA sequences in Escherichia coli. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 312: 191: 204.
- Haugland, R. and D. P. S. Verma, 1981. Interspecific plasmid genomic DNA sequences and localization of nif genes in effective and ineffective strains of Rhizobium meliloti. J. Mol. Appl. Genet. 1: 205-217.
- Hirsh, P. R., M. van Montagu, A. W. B. Johnston, N. J. Brewin and J. Schell, 1980. Physical identification of bacterocinogenic nodulation plasmid and other plasmids in strains of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 120: 403-407.
- Hoykaas, P. J. J., van Brussel, A. N. N., den Dulk-Ras, H., Slotgeren, G. M. S. and R. A. Schilpercoort, 1981. Sym-plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and in Agrobacterium. Nature 291: 351-353.
- Jarvis, B. D. W., Ward, L. J. H. and E. A. Slade, 1989. Expression by soil bacteria of nodulation genes from Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1426-1434.
- Jouanin, L., De la Judie, P., Basetoux, S. and T. Huguet, 1981. DNA sequence homology in Rhizobium meliloti plasmids. Mol. Gen. Genet. 182: 189- 195.
- Jordan, D. C., 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938, pp. 234-

254. In R. Krieg and J. G. Holt (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, U. S. A.

Johnston, A. W. B. and J. E. Beringer, 1978. Chromosomal recombination between Rhizobium species. *Nature* 267: 611-612.

Johnston, A. W. B., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. U., Setchell, S. M., Hirsh, P. R. and J. E. Beringer, 1978. High frequency transfer of nodulating capabilities between strains and species of Rhizobium. *Nature* 276: 634-636.

Keyser, H. H., Bohlool, B. B., Hu, T. S. and D. F. Weber, 1982. Fast-growing Rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science* 215: 1631-1632.

Levin, B. R., 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of Escherichia coli. *Genetics* 99: 1-23.

Levin, B. R., 1986. The maintenance of plasmids and transposons in natural populations of bacteria. In *Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression* (S. B. Levy and R. P. Novick, eds), pp. 57-70. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Lewin, A., Rosenberg, C., Meyer, K., Wong, C. K., Nelson, L., Manen, J. F., Stanley, J., Dowling, D. N., Denarie, J. and W. J. Broughton, 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host-range Rhizobium sp. selected using widely compatible legume Vigna unguiculata. *Plant Mol. Biol.* 8: 447-454.

Lindstrom, K., 1989. Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 365-367.

Long, S., 1989. Rhizobium genetics. *Ann. Rev. Genet.* 23: 483-506.

Mayr, E., 1988. *Toward a new philosophy of biology*, chapter IV pp. 313-333. The Belknap Press, Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, U. S. A.

Martínez, E. and Palacios, R., 1984. Is it necessary to improve nitrogen fixation of bean in agricultural fields in México?, in *Advances in Nitrogen Fixation Research*, p. 60. C. Veeger and E. Newton (eds). The Hague and Wageningen, Nijhoff, Junk and Pudoc, Neetherlands.

Martínez, E., Pardo, M. A., Palacios, R. and M. A. Cevallos, 1985. Reiteration of nitrogen fixing sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1779-1786.

Martínez, E., Palacios, R. and F. Sánchez, 1987. Nitrogen-fixing



nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 169: 2828-2834.

Martínez, E., Pardo, M. A., Martins, F., Piñero, D., Graham, P., Franco, A., R. Palacios and L. Segovia, 1990. Genetic relatedness and taxonomic considerations of Rhizobium strains that nodulate Phaseolus vulgaris (L.). 8th. International Congress on Nitrogen Fixation, Knoxville, Tennessee, U. S. A.

Martínez, E. and M. Rosenblueth, 1990. Increased bean (P. vulgaris L.) nodulation competitiveness of genetically modified Rhizobium strains. (Aceptado en Appl. Environ. Microbiol.).

Milkman, R. and Stolftus, A., 1988. Molecular evolution of the Escherichia coli chromosome, II. Clonal segments. Genetics 120: 359-366.

Miranda, C. S., 1967. Origen de Phaseolus vulgaris L. Agrociencia 1: 99-109.

Moffet, M. D. and R. Colwell, 1968. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae. J. Gen. Microbiol. 51: 245-266.

Musser, J. M., Bemis, D. A., Ishikawa, H. and R. K. Selander, 1988. Clonal diversity and host distribution in Haemophilus influenza. J. Bacteriol. 169: 525-537.

Nei, M. and W. H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 5269-5273.

Nordstrom, K. and S. J. Austin, 1989. Mechanism that contribute to stable segregation of plasmids. Ann. Rev. Genet. 23: 37-69.

Ochman, H. and Wilson, 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in a cellular genomes. J. Mol. Evol. 26: 74-86.

O'Brien, T. F., del Pilar Pla, M., Mayer, K. H., Kishi, H., Gilleece, R., Syvanen, M. and J. D. Hopkins, 1985. Intercontinental spread of a new antibiotic resistance genes on an epidemic plasmid. Science 230: 87-88.

Piñero, D., Martínez, E. and R. K. Selander, 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2825-2832.

Prakash, R. K., Schilperoort, R. A. and M. P. Nuti, 1981. Large plasmids of fast growing rhizobia: homology studies and localization of structural nitrogen fixation (nif) genes. J. Bacteriol. 145: 1129-1130.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado,

- T., Soberón, G. and R. Palacios, 1982.** Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. *Nature* 299: 724-726.
- Rayssiguier, Ch., Thaler, D. S. and M. Radman, 1989.** The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch repair mutants. *Nature* 342: 396-401.
- Reaney, D. C., 1978.** Coupled evolution: adaptative interactions among the genomes of plasmids, viruses and cells. In *Aspects of Gene Action and Evolution* (International Review of Cytology, Supplement 8, G. H. Bourne, J. F. Danielli and K. W. Jeon, eds.) pp. 1-68. Academic Press, New York.
- Roberts, G. P., Leps, W. T., Silver, L. E. and W. J. Brill, 1980.** Use of two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis to identify and clasiffy Rhizobium strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 414-422.
- Rolfe, B. G. and P. M. Gresshoff, 1988.** Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 297-319.
- Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Rhodes, C. and P. Berg, 1976.** Labeling deoxyribonucleic acid to a high specific activity *in vitro* by nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- Selander, R. K., McKinney, R. M., Whittam, T. S., Bibb, W. F., Brenner, D. J., Nolte, F. S. and P. E. Pattinson, 1985.** Genetic structure of populations of Legionella pneumophila. *J. Bacteriol.* 163: 1021-1037.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. and T. H. Whittam, 1986.** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873-884.
- Selander, R. K., Caugant, D. A. and T. S. Whittam, 1987.** Genetic structure and variation in natural populations of Escherichia coli, in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, *Cellular and Molecular Biology*. J. L. Ingraham et. al. (eds), ASM Publications, Washington, D. C., U. S. A.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R. and E. Martínez-Romero, 1990.** Genetic structure of a soil population of symbiotic and non-symbiotic Rhizobium leguminosarum isolates (enviado a publicación)
- Schofield, P. R., Gibson, A. H., Dudman, W. F. and J. M. Watson, 1987.** Evidence for genetic exchanges and recombination of Rhizobium symbiotic plasmids in soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 414-422.
- Southern, E. M., 1975.** Detection of specific sequences among DNA

fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

**Souza, V., 1990.** Genética y Ecología de Poblaciones en Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a Phaseolus vulgaris y a P. coccineus silvestre y cultivado, en Morelos, México. Tesis de Doctorado en Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.

**Stanley, J., Brown, G. G. and D. P. S. Verma, 1985.** Slow-growing Rhizobium japonicum comprises two highly divergent symbiotic types. J. Bacteriol. 163: 148-152.

**Stolfztus, A., Leslie, J. F. and R. Milkman, 1988.** Molecular evolution of Escherichia coli chromosome I: Analysis of structure and natural variation in a previously uncharacterized region between trp and tonB. Genetics 120: 345-348.

**Soberón-Chávez, G., Nájera, R., Olivera, H. and Segovia, L., 1986.** Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol. 167: 487-491.

**Soberón-Chávez, G. and R. Nájera, 1989.** Isolation from soil of R. leguminosarum lacking symbiotic information. Can. J. Microbiol. 35: 464-468.

**Thomashow, M. F., Knauf, V. C. and E. W. Nester, 1981.** Relationships between the limited and wide host range octopine-type Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol. 146: 484-493.

**Valdés, A. M., 1990.** Estimación filogenética de transferencia horizontal de genes en bacterias. Tesis Profesional. Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Universidad Nacional Autónoma de México.

**Watanabe, T., 1963.** Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27: 87.

**Watson, J. M. and P. R. Schofield, 1985.** Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in Rhizobium trifolii. Mol. Gen. Genet. 199: 279-289.

**White, F. F. and Nester, E. W., 1980.** Relationships of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. J. Bacteriol. 144: 710-720.

**Woese, C., 1987.** Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.

**Young, J. P. W., 1985.** Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at same site. J. Gen. Microbiol. 131: 2399-2408.

Young, J. P. W., Demetriou, L. and R. G. Apts, 1987. Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in Rhizobium leguminosarum from plants and soil in a pea crop. J. Gen. Microbiol. 53: 397-402.

Young, J.P.W. and Wexler, 1988. Sym Plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 134: 2731-2739.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, bajo la dirección de la Dra. Esperanza Martínez.

Los Dres. Daniel Piñero, Rafael Palacios y Guillermo Dávila formaron el Comité Tutorial con el que se discutieron partes fundamentales del proyecto.

La Dra. Carmen Gómez, como miembro del Jurado, ha contribuido con su crítica a mejorar la presentación de esta tesis.

Lorenzo Segovia, David Romero, Jaime Martínez y Marco A. Pardo, estimularon y ayudaron a resolver muchos de los problemas presentados durante el desarrollo del proyecto.

Oswaldo López realizó la purificación de los plásmidos utilizados en este trabajo. Alejo Pichardo realizó el trabajo de fotografía durante todo el proyecto.

El CONACYT otorgó una beca para la realización de estos estudios.

A todos ellos les agradezco su interés y participación.