



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE

FACULTAD DE CIENCIAS

115
zej

ESTUDIO DEL EFECTO DE REARREGLOS DEL
PLASMIDO SIMBIÓTICO DE Rhizobium etli SOBRE SU
TRANSFERENCIA



T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L Ó G O

P R E S E N T A
CLAUDIA ALEJANDRA MERGOLD VILLASEÑOR



CIUDAD UNIVERSITARIA,

1994

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron LA pasante(s) CLAUDIA ALEJANDRA MERGOLD VILLASEÑOR

con número de cuenta 8628601-1 con el Título:

"ESTUDIO DEL EFECTO DE REARREGLOS DEL PLASHIDO SIMBIOTICO DE

Rhizobium etli SOBRE SU TRANSFERENCIA"

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DOCTORA Directora de Tesis	SUSANA	BROM KLANNER	<i>Susana Brom</i>
BIOLOGO	ANTONIO EUSEBIO	LAZCANO-ARAUJO REYES	<i>A. Lazcano-Araujo</i>
DOCTOR	RENE DE JESUS	CARDENAS VAZQUEZ	<i>René de Jesús</i>
M. EN C. Suplente	VICTOR MANUEL	VALDES LOPEZ	<i>Victor Manuel</i>
DOCTORA Suplente	ALEJANDRA	MAINERO DEL PASO	<i>Alejandra Mainero</i>

ESTUDIO DEL EFECTO DE REARREGLOS
DEL PLASMIDO SIMBIOTICO DE
Rhizobium etli
SOBRE SU TRANSFERENCIA

AGRADECIMIENTOS

AL TODOPODEROSO DIOS

A MI MADRE Y MI PADRE

A MI QUERIDA MANITA

A MIS HERMANDOS

A MIS FAMILIARES

DE MANERA MUY ESPECIAL

A MIS PROFESORES

A MIS AMIGOS

A MARIA MEDINA

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FACULTAD DE CIENCIAS

A EL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE EFECTOS DEL ESTRÉS

A LA DIRECTORA DE MÓDULO DE LICENCIATURA

DRS. ANTONIO BRON BERNIERI

Y A LOS QUE CONTRIBUYERON DE ALGUNA FORMA EN LA ELABORACIÓN DE ESTA TESIS

A TODOS CON INFINITO AMOR ... MUCHÍSIMAS GRACIAS!!

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
CONJUGACION BACTERIANA.....	12
TAXONOMIA DE <i>Rhizobium</i>	14
GENERALIDADES SOBRE <i>Rhizobium</i>	16
EL GENOMA DE <i>Rhizobium etli</i>	19
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	28
METODOLOGIA.....	29
MATERIAL.....	29
METODO.....	30
• PROTOCOLOS DE SOLUCIONES.....	34
-MEDIOS DE CULTIVO.....	34
MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS DE PY.....	34
MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS DE LB.....	34
CLORURO DE CALCIO (0.7 M).....	35
-INOCULACION DE PLANTAS.....	35
STOCK FAHRAEUS (100 X) EN 1 LITRO.....	35
STOCK TRAZAS GIBSON (100 X) EN 1 LITRO.....	35
AGAR BLANDO (0.8%).....	36
-ECKHARDT VERTICAL.....	36

TRIS 5 X pH 8 (4 LITROS).....	36
TRIS 1 X.....	36
SOLUCION A (10 ml).....	37
SOLUCION B (100 ml).....	37
SOLUCION C (100 ml).....	37
SARCOSIL 0.1% TE (50/20) pH 8.....	37
FICOLL 20% EN TRIS BORATOS 1 X.....	38
-ECKHARDT HORIZONTAL.....	38
TEB 5 X (pH 8.2).....	38
TE (200 ml) pH 8.6.....	38
N-LAURIL SARCOSINA (SARCOSIL) 0.3% EN AGUA.....	38
FICOLL (WT 400,000) 20% EN TE.....	39
SOLUCION DE LISIS EN TE.....	39
LISOZIMA.....	39
SDS 10% EN AGUA.....	39
-DILUCIONES.....	40
MgSO ₄ 10 mM-TWEEN 0.01%.....	40
-ANTIBIOTICOS.....	40
• PROTOCOLOS DE EXPERIMENTOS IN VITRO.....	41
PROTOCOLO PARA OBTENER CULTIVOS EN LIQUIDO.....	41
PROTOCOLO DE CRUZAS.....	41
PROTOCOLO PARA OBTENER TRANSCONJUGANTES EN MEDIO DE CRECIMIENTO SELECTIVO (POR GOTTA).....	42

PROTOCOLO PARA OBTENER FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA.....	43
PROTOCOLO PARA PARCHAR COLONIAS.....	44
PROTOCOLO DE CORRIMIENTO DE GELES VERTICALES (ECKHARDT) PARA LA VISUALIZACION DE PLASMIDOS.....	44
PROTOCOLO DE VISUALIZACION DE PLASMIDOS EN GEL HORIZONTAL.....	46
PROTOCOLOS DE EXPERIMENTOS <i>IN PLANTA</i>	47
PROTOCOLO PARA ESTERILIZACION DE SEMILLAS.....	47
PROTOCOLO PARA INOCULAR SEMILLAS.....	48
PROTOCOLO PARA EXPRIMIR NODULOS.....	49
RESULTADOS.....	51
CRUZAS <i>IN VITRO</i>	51
CRUZAS <i>IN PLANTA</i>	57
DISCUSION.....	60
CRUZAS <i>IN VITRO</i>	61
CRUZAS <i>IN PLANTA</i>	68
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	72

RESUMEN

Algunos organismos procariontes del suelo son capaces de fijar nitrógeno atmosférico debido a la presencia del complejo enzimático de la nitrogenasa. Las bacterias Gram negativas del género *Rhizobium* interactúan con las raíces de plantas leguminosas induciendo una relación simbiótica. Durante la simbiosis, un nuevo órgano especializado es formado, el nódulo, que es el producto de la diferenciación bacteriana y de las células vegetales. En el nódulo se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno (reducción del nitrógeno atmosférico a amonio). Muchos determinantes genéticos de los simbiosis son responsables para este proceso de diferenciación.

El genoma de *Rhizobium* está organizado en dos diferentes tipos de replicones, el cromosoma y grandes plásmidos. Usualmente los genes involucrados en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno están localizados en un solo plásmido (pSym, 390 kb).

Una característica general del genoma de *Rhizobium* es la presencia de un gran número de secuencias reiteradas. *Rhizobium etli* cepa CFN42, es una bacteria, simbiote general del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), con seis plásmidos que tienen un tamaño que está entre el rango de 150 a 650 kb. El pSym contiene, aproximadamente, 10 familias de secuencias reiteradas de DNA de dos a tres elementos cada una. Una de estas familias incluye dos secuencias directamente orientadas de 120 kb, correspondiente al operón de la nitrogenasa. Se ha demostrado que la recombinación entre estos dos elementos repetidos puede guiar a la formación de diferentes tipos de arreglos genómicos, incluyendo amplificaciones y deleciones. El análisis obtenido de la hibridaciones del pSym con cada uno de los demás plásmidos, reveló que el pSym tiene secuencias repetidas presentes en los plásmidos f, b y a. El pa mostró la mayor cantidad de secuencias conservadas con el pSym (19 fragmentos BamHI con señales positivas de hibridación).

Los plásmidos conjugativos contribuyen al intercambio genético entre poblaciones bacterianas. Se conocen varios plásmidos autotrasferibles en *Rhizobium etli*. El pSym se autotransfiere a una baja frecuencia (10^{-8}). Otro plásmido de esta cepa (pa) es autotransferible, pero a una frecuencia muy alta (10^{-2} , 10^{-3}). La frecuencia de transferencia de los otros plásmidos (b, c, e y f) es menor a 10^{-8} (no detectable). Se sabe que la frecuencia de transferencia del pSym incrementa significativamente en

presencia del pa (100 veces). El mecanismo involucrado en este fenómeno puede ser el de donación o el cointegración.

En este trabajo se determinó el efecto ayudador del pa sobre la transferencia del pSym de cepas con diferentes tipos de rearrreglos en este plásmido (amplificaciones y deleciones), midiendo la frecuencia de transferencia del pSym en presencia y ausencia del pa. La metodología utilizada para lograr los objetivos planteados en este trabajo fue por medio de experimentos *in vitro* así como de experimentos *in planta*. Los primeros se realizaron a través de cruza bacterianas de cepas con características previamente establecidas, posteriormente con la obtención de transconjugantes y finalmente con la determinación de las frecuencias de transferencia del pSym transferido. Los segundos experimentos fueron realizados con otro tipo de cepas donadoras (con y sin pa), utilizando como medio de selección la formación de nódulos radicales en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), lo anterior con el fin de semejar las condiciones que se dan en la naturaleza. Los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro* (frecuencias de transferencia del pSym de las diferentes cepas usadas en presencia y ausencia del pa), fueron usados para la conformación de tablas comparativas de frecuencias de transferencia del pSym de las diferentes cepas utilizadas, incluyendo los datos observados directamente de los geles de agarosa para la visualización de plásmidos (marcados como porcentajes), los cuales sugieren en conjunto que: 1) el efecto ayudador del pa (aumento en la frecuencia de transferencia del pSym silvestre en presencia del pa) es ejercido para la transferencia del pSym silvestre, 2) que dicho efecto se ve afectado directamente en función al orden de amplificación o deleción presente en el pSym de la cepa donadora (mayor aumento en la frecuencia de transferencia del pSym amplificado y disminución de esta con el pSym deletado), y 3) que la transferencia del pSym por medio del efecto ayudador del pa permite la selección de numerosos rearrreglos (deleciones, desamplificaciones, cointegraciones, deleciones de alto orden). Por otra parte, los resultados obtenidos de los experimentos *in planta* y verificados por medio de la visualización en geles de agarosa de los plásmidos contenidos por estas cepas (donadoras y transconjugantes) mostraron, en general, un mayor número de plantas con nódulos cuando las cepas utilizadas contenían pa que cuando no lo contenían, lo que indica claramente que el efecto ayudador del pa para la transferencia del pSym se lleva a cabo *in planta*.

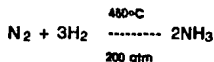
INTRODUCCION

Todos los seres vivos requieren de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo; aunque el nitrógeno molecular es relativamente abundante y constituye aproximadamente el 70% de la atmósfera, la molécula de nitrógeno es casi inerte químicamente (Romero, 1991). Ello se debe a que la molécula de nitrógeno atmosférico está unida por un triple enlace ($N \equiv N$) (Conn, 1978).

Sin embargo, algunos organismos son capaces de convertir esta vasta reserva de nitrógeno gaseoso a formas de nitrógeno combinado, como amoníaco. Se estima que para restaurar la fertilidad del suelo (pérdida anual de 25×10^6 toneladas de nitrógeno por cultivos y filtraciones en los suelos), se regresan 3×10^6 toneladas de fertilizantes y otro tanto se lleva a cabo cuando la lluvia hidrata a los óxidos de nitrógeno que se producen en la atmósfera durante las tormentas eléctricas y posteriormente se precipitan en el suelo como nitratos y nitritos, así como por efectos de la luz ultravioleta, procesos industriales, etc. (aproximadamente el



5% de la conversión de nitrógeno atmosférico a formas combinadas de este). Para el caso de los procesos industriales, se ve claramente un índice de dificultad, la cual puede representarse en el proceso Haber, que incluye la reacción del N_2 y del H_2 a temperaturas y presiones elevadas para formar NH_3 .



$\Delta H = -24 \text{ Kcal}$

donde ΔH es el cambio en el contenido calórico que se produce en la reacción (a \rightarrow b) a presión constante.

Pero la cantidad más importante (10X10⁶ toneladas, 95%) es recuperada por medio de la fijación del nitrógeno, efectuada por organismos biológicos procariontes, tanto de vida libre como en asociación con otros organismos (simbiosis) (Conn, 1978; Romero 1991).

La fijación del nitrógeno es, junto con la fotosíntesis y la respiración, un proceso fundamental. En realidad, forma parte de una serie de reacciones que se conocen con el nombre de ciclo del nitrógeno. El término fijación se define como la conversión del nitrógeno atmosférico en alguna forma combinada de este (Fig. 1) (Conn, 1978).

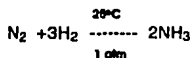
Muchos seres vivos requieren de una fuente de nitrógeno combinado, ya sea como amonio, nitrato o compuestos orgánicos. Muchos constituyentes de la célula viva contienen nitrógeno: proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas, porfirinas, alcaloides y vitaminas. Los átomos de nitrógeno de dichos compuestos pasan a las reservas de este elemento que se encuentra en la atmósfera, completando así, finalmente, los procesos de fijación y desnitrificación (Conn, 1978).

Algunos compuestos inorgánicos y orgánicos pueden considerarse como componentes del ciclo del nitrógeno; entre los primeros están: nitrógeno gaseoso, amoniaco, ión nitrato (NO_3^-), ión nitrito (NO_2^-) e hidroxilamina (NH_2OH). Así, el nitrógeno puede existir en forma totalmente oxidada (NO) o reducida (NH_3) (Conn, 1978).

A pesar de que el NH_3 es el primer producto de la fijación biológica del nitrógeno, no se acumula en los organismos que la llevan a cabo, pues se emplea en la

elaboración de componentes nitrogenados de sus tejidos (proteínas, pigmentos, ácidos nucleicos). El exceso de nitrógeno fijado se puede excretar al suelo o en el medio en el que se desarrolla este organismo como amoniaco, aminoácidos y péptidos. Así, el NH_3 se somete al proceso de nitrificación o para el uso de otras formas vivientes (bacterias o plantas) incapaces de fijar nitrógeno (Conn, 1978).

La fijación biológica contrasta marcadamente con la fijación química (proceso Haber):



Tanto los microorganismos no simbióticos de vida independiente, como ciertas bacterias que viven en simbiosis con plantas superiores, pueden llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno. Las primeras lo hacen exclusivamente para su propio uso (diazótrofos) y entre ellas se encuentran los organismos diazótrofos aerobios del suelo (*Azotobacter*) y anaerobios (*Clostridium*) las bacterias fotosintéticas (*Rhodospirillum*). Los sistemas simbióticos constan de bacterias (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, etc.) que pueden establecer relaciones mutualistas con las raíces de plantas, principalmente con miembros de la familia Leguminosae del tipo de la alfalfa, trébol, chícharo, frijol, y fijar nitrógeno durante esta asociación (fijadores simbióticos de nitrógeno). Dentro de los fijadores simbióticos de nitrógeno pueden citarse especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*. Sin embargo, las leguminosas no son las únicas plantas en las que pueden fijar simbióticamente el nitrógeno, pues también lo hacen

en numerosas especies de árboles, arbustos, herbáceas, etc. (Conn, 1978; Romero, 1991; Sprent, 1990).

Los representantes de estos géneros bacterianos, son capaces de interactuar con la planta (leguminosa), y de hecho introducirse en sus raíces, induciendo la formación de una estructura, formada por tejidos vegetales llamada nódulo. Los

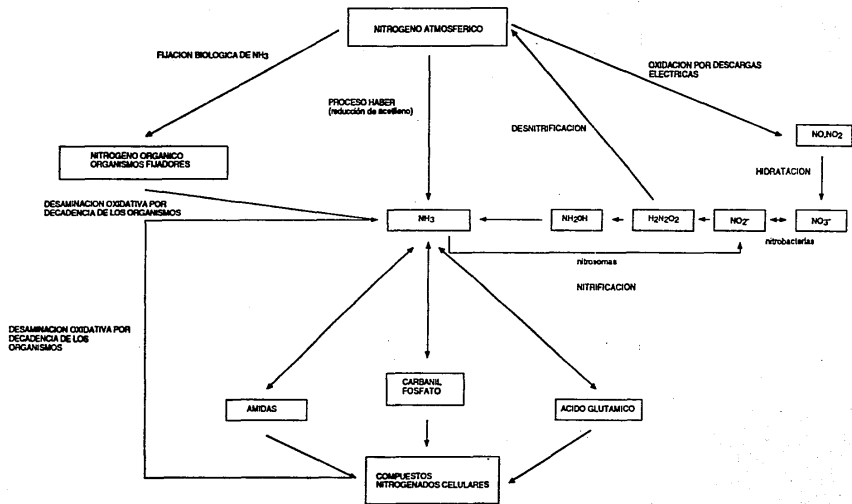


Fig. 1. Ciclo del nitrógeno (Conn, 1978).

nódulos que se constituyen en las raíces de las plantas son un aspecto esencial en la fijación simbiótica. Los nódulos se forman por acción conjunta de la planta huésped y la bacteria (siempre una especie particular de bacteria). Dentro de estos nódulos pueden encontrarse formas bacterianas en un nuevo estadio de diferenciación llamados bacteroides (Fig. 2). Durante este estadio, es cuando la bacteria es capaz de fijar nitrógeno y donarlo, al menos en parte, para satisfacer las necesidades de la planta. La planta, por su parte, coopera donando una serie de metabolitos necesarios para el funcionamiento del bacteroide (Romero, 1991).

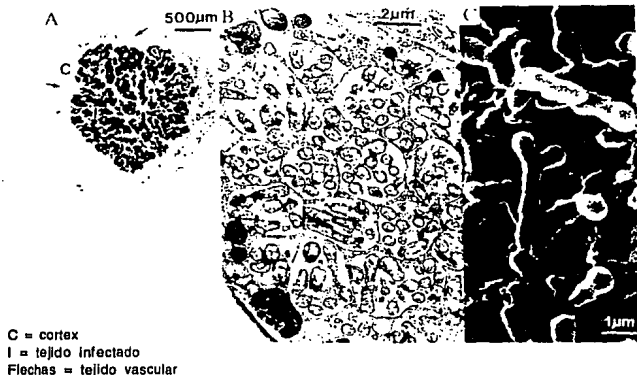


Fig 2. Algunas características clásicas de nódulos de leguminosas. A. Un corte transversal de un nódulo de *Phaseolus vulgaris* visto con un microscópio de luz, cortesía de J.M. Sutherland. B. Transmisión de un microscópio electrónico de una célula infectada de un nódulo de soja: note los bacteroides contenidos en membranas peribacteriales y numerosos organelos en el citoplasma hospedero. Los bacteroides son mas o menos de forma alargada, como varilla, contienen grandes gránulos de poli- β -hidroxibutirato- la ocurrencia de este polímero varia grandemente con la especie. C. Fotografía con microscópio electrónico de una célula infectada de *Vicia faba*, mostrando bacteroides ramificados: esta forma es típica de los nódulos de leguminosas de la Familia Viciae y Trifolieae. La membrana peribacteroidal se ha perdido durante la preparación del espécimen (Sprent, et al., 1990).

Para la formación de un nódulo efectivo, donde se lleve a cabo la fijación de nitrógeno, ocurren los siguientes eventos:

Inicialmente las bacterias se adhieren a los pelos radicales (se ha sugerido que algunos polisacáridos de la superficie celular de la bacteria intervienen en este proceso de adhesión). Los rizobios inducen el enroscamiento de los pelos radiculares.

Posteriormente se forma una estructura tubular de origen vegetal llamada hilo de infección, que lleva a las bacterias a través de diversas capas celulares, hasta llegar a las células corticales, cuya proliferación ha sido inducida previamente; ahí, el hilo de infección se ramifica y las bacterias son vertidas al citoplasma y rodeadas de una membrana de origen vegetal. Finalmente, las bacterias se diferencian a bacteroides que fijan nitrógeno atmosférico a través de la nitrogenasa, interactuando metabólicamente con la planta (Fig. 3) (Robertson, 1985; Martínez, 1988; Brom, 1988).

La formación de nódulos en plantas leguminosas es un proceso altamente específico. Generalmente, la formación de nódulos en una leguminosa dada y la consecuente fijación del nitrógeno, solamente puede darse por interacción con el simbiote específico. Por ejemplo, *Phaseolus vulgaris* (trijol) es nodulado por *Rhizobium etli*, el chícharo (~~*Pisum sativum*~~) por *Rhizobium leguminosarum* y la soja (*Glycine max*) por *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, etc. Esta distinción no es, sin embargo, absoluta, ya que se han descrito ejemplos de especificidades cruzadas (Martínez, 1990; Romero, 1991; Roth, 1991).

Es obvio que el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno es muy complejo, por lo que podemos puntualizar lo siguiente:

1. Se requiere la expresión de una serie de genes (tanto de la planta como de la bacteria) para que se lleven a cabo los eventos iniciales en el proceso de nodulación.
2. Estos genes se regulan coordinadamente, y los comparten las diferentes bacterias que tienen el mismo mecanismo de infección.
3. Uno de estos genes establece la comunicación entre los simbioses ya que recibe la señal de la planta y la transmite a la bacteria, la cual responde induciendo a la expresión de los genes antes mencionados (punto 1).
4. La capacidad de una bacteria "x" de responder a la señal de una planta "y" determina la especificidad de la relación simbiótica.
5. La relación simbiótica pone en contacto diferentes superficies celulares, algunas de las moléculas que constituyen esta superficie determinan, de alguna manera, que siga adelante dicha relación simbiótica.
6. En el nódulo las bacterias se diferencian a bacteroides, que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico.
7. La actividad de nitrogenasa y la expresión de los genes que codifican para ella están altamente regulados, principalmente por nitrógeno, oxígeno y carbono, a través de los productos de una serie de genes, descritos en diferentes organismos fijadores de nitrógeno (Brom, 1988).

El proceso de fijación simbiótica de nitrógeno ha atraído gran interés en los últimos años debido a múltiples características. Primero, se ha estimado que este proceso simbiótico es una de las principales entradas del ciclo del nitrógeno, haciéndolo interesante desde el punto de vista ecológico; motivando estudios de ecología global del ciclo del nitrógeno, supervivencia del simbiote en diferentes

ambientes , así como de prevalencia y competencia entre diferentes cepas de *Rhizobium* (Romero, 1991; Souza, 1991).

Segundo, este proceso es interesante por la especificidad biológica de esta interacción y el intercambio de señales que ella implica, sobre todo por la emisión y descodificación de señales emitidas por organismos pertenecientes a dos reinos biológicos diferentes, por lo que es un área fértil en investigación.

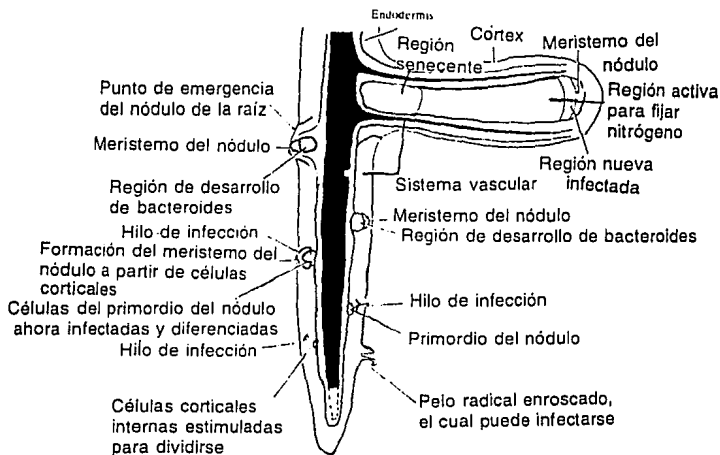


Fig. 3. Una secuencia típica de eventos que guían a la formación de un nódulo indeterminado, como el encontrado en leguminosas como los chícharos y tréboles. No está dibujado a la escala exacta. La emergencia de los nódulos varía (con la especie) de 1-3 mm de diámetro. Diferencias mayores son encontradas en algunos nódulos determinados (Sprent, et al.,1990).

Tercero, la fijación biológica de nitrógeno entraña la realización de dos procesos de diferenciación: el de la planta (de células radiculares en respuesta a señales

bacterianas) para producir un nódulo y el de la bacteria (forma estructural y funcionalmente diferente: bacteroide).

Cuarto, para el establecimiento de un nódulo funcionalmente activo, es necesaria la realización de importantes cambios metabólicos, tanto en la planta como en la bacteria; siendo un ejemplo de una verdadera cooperación metabólica. Algunos de estos cambios son: la detención de las vías bacterianas de asimilación de amonio (exportación hacia la planta), donación de fuentes de carbono por parte de la planta (demandas del bacteroide), creación de una barrera que permite el acceso regulado del oxígeno (evita la inactivación de la nitrogenasa), síntesis de leghemoglobina (proteína que provee el oxígeno de forma regulada), siendo la globina sintetizada por la planta y el grupo hemo por ambos simblontes.

Quinto, también ofrece interés particular para la enzimología, dadas las características de la nitrogenasa. Su complejidad estructural, ensamble con otras proteínas para su funcionamiento, uso de cofactores de hierro-molibdógeno y su mecanismo de reacción, así como el hallazgo de formas alternativas de nitrogenasa en organismos diazotrofos.

Por último, existe el interés biotecnológico, por ser la fijación biológica del nitrógeno una forma natural y no contaminante de satisfacer los requerimientos nitrogenados de algunos cultivos para consumo humano, aunque existe el problema de que algunas relaciones *Rhizobium* leguminosa pueden ser poco efectivas para la fijación. Lo anterior se ha usado para emprender modificaciones genéticas de ambos organismos. A largo plazo, se espera que la investigación básica de este proceso pueda conducir a estrategias que permitan a *Rhizobium* nodular y fijar nitrógeno en

otros huéspedes de importancia comercial, como maíz, trigo y arroz, que no son nodulados naturalmente. Y alternativamente, la posibilidad de introducir los genes necesarios para la fijación del nitrógeno en estas plantas. Este es, sin duda, el objetivo más ambicioso y más difícil de realizar (Romero, 1991).

CONJUGACION BACTERIANA.

Existen tres procesos generales por los cuales, diferentes microorganismos (bacterias, virus, fagos, etc.) son capaces de intercambiar su material genético.

Dichos procesos son: transformación, transducción y conjugación. La transformación o toma de ácido desoxirribonucleico (DNA) por bacterias vivas fue descrito por primera vez para *Streptococcus pneumoniae* por Griffith (1928). En el proceso de transformación, el DNA de ciertos organismos (*Neisseria*), sigue una secuencia de pasos, en los cuales sucede lo siguiente: DNA transformante + célula competente - unión de DNA a dicha célula - resistencia del DNA al efecto de las DNAasas - toma del DNA - Integración del material genético endógeno y expresión del mismo dentro de la célula huésped (Streips, 1991).

Por otra parte, el proceso de transducción es característico de los llamados bacteriófagos, los cuales inyectan su material genético en otras células (bacterias) y ahí (con circularización o integración directa en el genoma bacteriano) se replica, utilizando la maquinaria de la célula en donde puede mantenerse (fase lisogénica) o bien formar nuevos fagos lisando a la célula (fase lítica), y de estos algunos pueden ser fagos transductantes, los cuales llevan DNA de la bacteria infectada y con este

reinfectar a nuevas células. Así, este DNA reinyectado puede recombinar con el material genético de otras células que sean infectadas por dichos fagos.

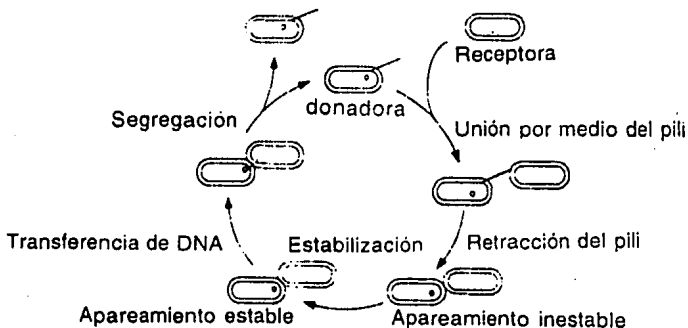


Fig. 4. Pasos en la transferencia del plásmido conjugativo F.

Finalmente, el proceso de conjugación, que se define como un modo de transferencia génica, específicamente de DNA, entre dos células bacterianas vivas que estén en contacto directo. Generalmente en bacterias Gram negativas la conjugación es un fenómeno en el que se involucra la transferencia de plásmidos de DNA de una célula donadora a una receptora (Fig. 4). El sistema de conjugación mediado por el factor F de *Escherichia coli*, es el prototipo descrito para las bacterias Gram negativas, en donde inicialmente deben existir dos tipos diferentes de bacterias: una donadora (F⁺) y una receptora o recipiente (F⁻). Las F⁺ son llamadas así porque contiene plásmidos (moléculas circulares de DNA) que en su material genético portan la información necesaria para autorreplicarse y

transferirse (genes *oriT* y *tra*), utilizando para ello una estructura llamada pili, que sirve para provocar el contacto directo entre las dos bacterias (F^+ y F^-). El siguiente paso en este proceso es la ruptura o mella de una de las cadenas del DNA del plásmido de la F^+ en el sitio denominado *oriT* y a su vez, la replicación de este (en círculo rodante) para su posterior transferencia a la F^- . El plásmido puede transferirse solo (autotransferencia) o con otros plásmidos, con el cromosoma o con fragmentos de algunos de estos (cotransferencia). La bacteria receptora (F^-) al adquirir esta información genética adicional se le llama transconjugante, debido a que le confiere las propiedades originales de la F^+ , convirtiéndose la F^- en F^+ (Watson, 1985; Ippen-Ihler, 1990, Porter, 1991).

TAXONOMIA DE *Rhizobium*.

El panorama para una taxonomía comprensiva de *Rhizobium* es muy complicado, dada la enorme diversidad genética en algunas especies. Ciertamente, la enorme diversidad intraespecífica puede ser explicada por el conocimiento del intercambio genético y las frecuencias de recombinación de bacterias del suelo, como *Rhizobium*, lo cual habrá de dar fuertes implicaciones en la validez y uso de la taxonomía (Martínez, 1990).

La familia bacterial Rhizobiaceae comprende diferentes géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*. En esta familia se incluyen bacterias capaces de interactuar con plantas, ya sea por simbiosis (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*), produciendo tumores radicales

(*Agrobacterium*) o hipertrófias foliares (*Phyllobacterium*). Esta familia está clasificada dentro de la división alfa de las bacterias purpúreas, son gram negativas (toman una tonalidad roja, del colorante zafranina, al someterse a una prueba de colorante de contraste) debido a que en su capa exterior está formada por abundantes lípidos; carecen de endosporas y tienen forma de varilla. Originalmente las bacterias del género *Rhizobium* estaban clasificadas en base a los huéspedes que podían infectar. Actualmente su taxonomía ha sido cambiada por varias líneas de evidencia, basadas en caracteres cromosomales, resultado de una taxonomía numérica, hibridación de DNA-DNA, obtención de secuencias del gen 16S rRNA, patrones de proteínas obtenidos por electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida, perfiles de resistencia a antibióticos, tipos serológicos, perfiles de plámidos y estructuras de exopolisacáridos (Castro, 1991; Segovia, 1993).

Las especies actualmente reconocidas están divididas en cuatro grupos:

GRUPO 1

Rhizobium meliloti

Rhizobium leguminosarum

biovariedad *trifolii*

biovariedad *viciae*

biovariedad *phaseoli*

Rhizobium fredii

GRUPO 2

Rhizobium loti

GRUPO 3

Rhizobium galegae

Bradyrhizobium especies

B. japonicum

GRUPO 4

Phyllobacterium

Las bacterias han sido clasificadas en base a las similitudes con su RNA ribosomal 16S. El término biovariedad es utilizado de dos formas conceptualmente diferentes en la familia Rhizobiaceae. En el género *Agrobacterium*, la biovariedad se refiere a una agrupación de bacterias genéticamente relacionadas, mientras que en *Rhizobium* se refiere al comportamiento simbiótico diferente que un grupo particular puede presentar (Martínez, 1990).

Segovia, et al. (1993) propusieron la reclasificación taxonómica para una serie de cepas que estaban incluidas dentro de la especie *R. leguminosarum phaseoli* como perteneciente a otra especie: *R. etlibv. phaseoli* basados en la secuencia nucleotídica de la región del gene 16S rRNA (Fig. 5). Con el nombre propuesto en esta reclasificación, es con la que me referiré en adelante.

GENERALIDADES SOBRE *Rhizobium*.

Rhizobium es un género de bacterias gram negativas, no esporiformes flageladas con forma de varilla, que miden aproximadamente de 1.5 a 3 μm de largo y 0.5 a 1.0 μm de ancho. Tales bacteria son quimioorganótrofas, ya que logran la transformación química de los compuestos orgánicos. Son aerobios facultativos.

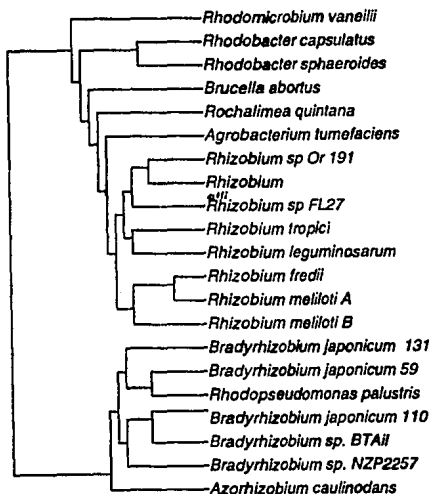


Fig. 5. Agrupación UPGMA derivada de la matriz de distancias Jukes-Cantor por la alineación de secuencias de fragmentos de DNA ribosomal 16S de *Rhizobium* spp. y bacterias relacionadas (Segovia, et al., 1993).

Generalmente forma colonias circulares, convexas, opacas y, usualmente, de 2 a 4 mm de diámetro después de 2 a 4 días cuando han sido crecidas en medio sólido de PY. Forman colonias de aspecto húmedo y translúcido cuando se crecen en medio YM. Son incapaces de crecer en medio Luria, en medio PY sin calcio o en presencia de carbenicilina, espectinomina, cloranfenicol o rifampicina. Son capaces de crecer en medio mínimo con malato como fuente de carbono, pero no con arginina, hipoxantina o sorbitol como fuente de carbono. La temperatura óptima de crecimiento de estas bacterias es de 25 a 30°C, con una temperatura máxima para su crecimiento de 35°C. Todas las cepas son resistentes al ácido nalidíxico (Segovia, 1993).

Algunas variedades de *Rhizobium* pueden producir metabolitos como: rizobiotoxinas (encontradas en *Bradyrhizobium*), hormonas y bacteriocinas (proteínas antibióticas activas contra células cercanas distintas). Por otra parte, *Rhizobium* tiene enzimas como las pectinasas, celulasas y hemicelulasas. En el nódulo se sintetizan enzimas específicas de esta estructura, tales como la nitrogenasa (transformadora de nitrógeno atmosférico a amonio) y el grupo proteico hemo de la leghemoglobina. La planta también sintetiza enzimas específicas de esta estructura llamadas nodulinas. Se conocen más de 20 nodulinas (Castro, 1991).

En el caso de las bacterias, se define como cepa a todas las bacterias caracterizadas por la homogeneidad en su constitución genética, tanto cromosomal como en el número y tamaño de sus plásmidos (Castro, 1991). Las cepas de *Rhizobium etli* son simbioses que nodulan y fijan nitrógeno, exclusivamente, en las raíces de *Phaseolus vulgaris*. En el nódulo, la bacteria se diferencia a bacteroide,

como resultado de un proceso de diferenciación de células de la bacteria y de la planta, y al hacerlo, su tamaño puede incrementar hasta 40 veces (esto, en el caso conocido de *Rhizobium etli*) para posteriormente iniciar el complejo proceso de fijar nitrógeno. La enzima responsable de esta fijación de nitrógeno es la nitrogenasa (Flores, 1987; Evans, 1991).

Rhizobium puede producir dos tipos de nódulos dependiendo de la planta con la que se encuentre en simbiosis: a) los redondos, de crecimiento determinado, característicos de las raíces del frijol y de la soya, no son perennes, ya que mueren cuando el cultivo está aproximadamente al 50% de su floración y b) los alargados, de crecimiento indeterminado, perennes, característicos en la alfalfa y el chícharo (conocidos vulgarmente como "manitas"), se mantienen activos y en crecimiento aún en la floración, por un tiempo ilimitado (Castro, 1991).

EL GENOMA DE *Rhizobium etli*.

El genoma de *Rhizobium* está organizado en dos diferentes tipos de replicones: el cromosoma y los plásmidos. Usualmente el número de plásmidos dentro de una cepa varía entre uno y diez (DNA extracromosomal), lo que puede llegar a representar hasta más del 40% del DNA total para algunas cepas bacterianas. Se han reportado megaplásmidos en *R. meliloti*, (dos de peso molecular alrededor de 1000 MDa), al igual que en algunas cepas de *B. japonicum*, mientras que otras cepas parecen carecer de ellos. Así, los pesos moleculares pueden variar en un rango que va desde los 90 hasta los 1500 MDa para diferentes cepas de *Rhizobium*.

Rhizobium etli cepa CFN42 contiene seis plásmidos: a, b (150 kb), c (270 kb), d (390 kb), e (500 kb) y f (600 kb). Se ha determinado que el plásmido d es el plásmido simbiótico (pSym) ya que contiene, dentro de su información genética, numerosos factores simbióticos, incluyendo los genes estructurales para la nitrógenasa y genes para la nodulación temprana (Flores, 1987). Sin embargo, los otros plásmidos también tienen su participación dentro de la simbiosis.

En estudios realizados para conocer la participación de los otros cinco plásmidos de *R. etli* por pérdida de función (usando cepas carentes de cada uno de los plásmidos = cepas curadas), Brom, et al. (1991) observaron que para que se lleve un proceso simbiótico exitoso, además del pSym es necesaria la presencia del pb, ya que contiene algunos genes involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos (LPS), por lo que se le ha denominado alternativamente pLPS. Además, las cepas curadas de los plásmidos b,c,f y una cepa con el plásmido e deletado (p Δ), mostraron ser menos competitivos con respecto a la cepa silvestre. Otro dato interesante fue que no se pudieron obtener cepas curadas del pe, sino solamente deletadas, lo que sugería que los genes contenidos en este plásmido contienen información genética esencial para la sobrevivencia de la bacteria. El pf, también contiene genes con una función fundamental, ya que su ausencia provocó una completa incapacidad para crecer en medio mínimo (función metabólica), al igual que el resto de los plásmidos, aunque no tan significativamente como para el pf (Fig. 6).

Hasta este momento, ninguno de los experimentos realizados por Brom, et al. (1991), revelaba la participación del pa. Sin embargo, en experimentos previos, Martínez, et al. (1987), al seleccionar transconjugantes de *Agrobacterium*

conteniendo el pSym de una cepa de *R. tropici* por planta, observó que algunas de ellas contenían además del pSym, un plásmido diferente de éste, lo cual fué explicado como herencia ligada de algunos plásmidos. Posteriormente, Brom (1988), al realizar el aislamiento y caracterización de transconjugantes de *Agrobacterium* con diferentes plásmidos simbióticos de *Rhizobium* capaces de nodular *Phaseolus*

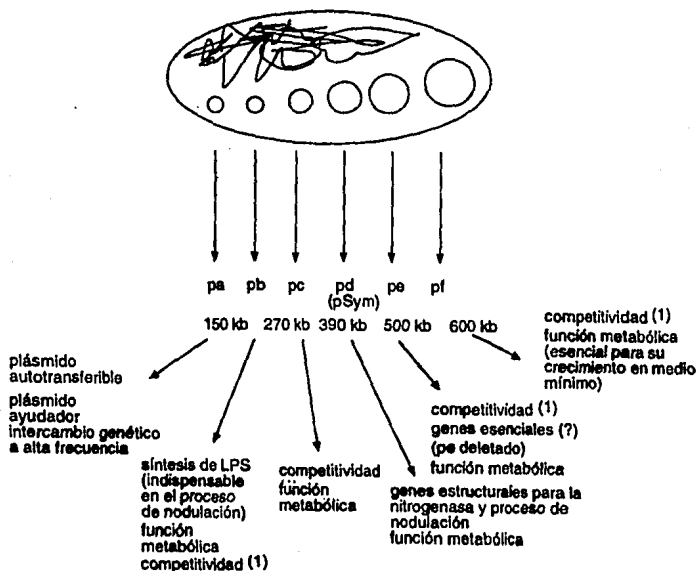


Fig. 6. Esquema de *Rhizobium etli* cepa CFN42 con sus dos replicones (cromosoma y plásmidos) y algunas de las características más relevantes de cada uno de sus plásmidos. (1) ocupación bacteroidal de nódulos con respecto a la CFN42 y cepas curadas de cada uno de los plásmidos.

vulgaris L., y utilizando plantas como medio de selección (Inducción de nódulos) encontró que algunas cepas transconjugantes de *Agrobacterium* con plásmidos de las cepas CIAT899 y CFN299, contenían, al igual que Martínez (1987) lo había señalado, un plásmido extra además del pSym. Finalmente, en experimentos realizados por Castro (1991) y Brom et al. (1993), demostraron la existencia de un plásmido diferente al pSym (el pSym tiene una frecuencia de transferencia de 10^{-8}), con capacidad de autotransferirse pero a una alta frecuencia (10^{-2} , 10^{-3}), éste es el pa. Al comparar las frecuencias de transferencia del plásmido simbiótico de la cepa CFN42, marcados con un elemento genético recientemente desarrollado (GDYN) (Fig. 7), que permite seleccionar células de *Rhizobium* por la resistencia que este les confiere a algunos antibióticos (espectinomicina/estreptomicina, kanamicina/gentamicina) (Romero, 1991), en presencia y ausencia de diferentes plásmidos autotransferibles, se encontró que estos plásmidos funcionan como "ayudadores" para la transferencia del plásmido simbiótico de la cepa CFN42, aumentándole su frecuencia entre 10 (cuando el pa pertenece a una cepa diferente y transfiere el pSymCFN42) y 100 veces (cuando el pa y el pSym pertenecen a la misma cepa CFN42). Como experimento evidencial en el que se pretendía conocer la complejidad estructural del pSym de *Rhizobium* obteniendo el mapa físico de este, Girard et al. (1991) encontraron la existencia de elementos reiterados de los plásmidos a, b y f, homólogos a secuencias presentes en el pSym, observando que el pa tiene una gran cantidad de secuencias conservadas con el pSym (11 fragmentos secuencias reiteradas del pSym con el pa) (Fig 8).

Se sabe que el genoma de *Rhizobium* contiene una gran cantidad de secuencias

reiteradas del DNA (Flores, 1987). Se determinó así la localización plasmídica y/o cromosomal de algunas secuencias reiteradas del genoma de una cepa de *Rhizobium*, haciendo experimentos de hibridación de DNA de transconjugantes que contenían cada uno de los diferentes plásmidos de esta cepa con detectores de las secuencias reiteradas. Dentro de éstas, se han encontrado operones completos, genes específicos, regiones regulatorias y secuencias de inserción. Para el genoma de *R. etli* se ha estimado la presencia de alrededor de 700 elementos reiterados, pertenecientes a 200 familias diferentes (Flores, 1987). En el pSym se han localizado 11 familias diferentes (Girard, 1991); una de estas familias corresponde a los genes de la nitrogenasa (Quinto, 1982; Quinto 1985), se ha propuesto que las secuencias repetidas del DNA pueden funcionar como puntos de recombinación para la producción de rearrreglos genómicos (Flores, 1987; Romero, 1991).

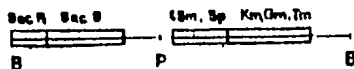


Fig. 7. Características relevantes del cassette GDYN de 5.7 kb. La localización aproximada de los genes para la resistencia a kanamicina/gentamicina y espectinomicina/estreptomina así como las secuencias sacR-sacB, son indicadas por cajas. Los determinantes de kanamicina/gentamicina también confieren resistencia a tobramicina (Tm), los sitios de restricción: B, BamHI; P, PstI.

Estudios del Departamento de Genética Molecular del C.I.F.N., han demostrado que el genoma de *Rhizobium etli* presenta rearrreglos genómicos con alta frecuencia.

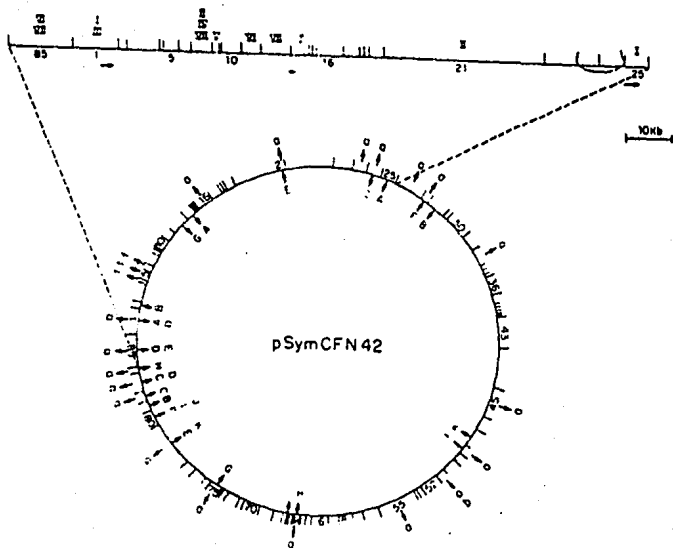


Fig. 8. Esquema integrativo del pSym. Las secuencias reiteradas en el pSym son mostradas con flechas internas. Las letras mayúsculas representan las 11 familias reiteradas. Las flechas externas indican los fragmentos que contienen secuencias que hibridizan con los siguientes repilones: p42a (a), p42b (b), p42f (f). La línea sobre el plásmido representa una región de 135 kb, mostrando la localización relativa de los fragmentos que hibridaron con las siguientes sondas: el fragmento interno homólogo de *nifH* (I), la secuencia interna *nifA* de *K. pneumoniae* (II), fragmentos intragénicos de *nodA*, *nodB* y *nodD* de *R. meliloti* (III al VI, respectivamente), y un oligonucleótido sintético para la caja *nod* (VII). Las flechas bajo las bandas 1 y 25 representan los repelidos directos del operon *nifHDK* y las flechas bajo la banda 13 muestran el gen invertido *nifH*, regiones regulatorias y secuencias de inserción. Para el genoma de *R. ellii* se ha estimado la presencia de alrededor de 700 elementos reiterados pertenecientes a 200 familias diferentes (Flores, 1987). En el pSym se han localizado 11 familias diferentes (Girard, 1991); una de estas familias corresponde a los genes de la nitrogenasa (Quinto, 1982; Quinto, 1985). Se ha propuesto que las secuencias repetidas del DNA pueden funcionar como puntos de recombinación para la producción de rearrreglos genómicos (Flores, 1987; Romero, 1991).

Dentro de éstos se han observado amplificaciones, deleciones, cointegraciones y pérdida de plásmidos (Flores, 1988; Brom, 1991; Romero, 1991). Estos rearrreglos pueden ocurrir tanto en cromosoma como en diferentes plásmidos (Eparvier, 1994). De los diferentes rearrreglos, hay evidencia de que algunos de ellos son "reversibles" (se resuelven o regresan a la estructura original del tipo silvestre) (Stepkowi, 1993), como es el caso, por ejemplo, de los cointegrados, en donde la unión de dos plásmidos debida, inicialmente a la presencia de secuencias homólogas (como lo son las secuencias reiteradas del operón *nifHDK* del pSym o las secuencias homólogas del pa con el pSym, etc.) puede llegar a resolverse, regenerando a los dos plásmidos iniciales.

Así, la proposición de los posibles mecanismos para explicar el efecto ayudador del plásmido autotransferible (pa) sobre la transferencia del pSym, fueron: 1) por cointegración, en donde las secuencias homólogas entre los dos plásmidos permiten la formación de un cointegrado, el cual se transfiere a alta frecuencia y se resuelve en la receptora, o 2) por donación, en donde la información necesaria para la transferencia y movilización del pSym (genes *tra-mob*) tengan un efecto a distancia (en "trans") con la transferencia del pSym o bien del pa con el pSym (Castro, 1991; Brom, 1993).

Recientemente y con la ayuda del elemento genético GDYN, se han podido seleccionar células de *Rhizobium* que presentan diferentes tipos de rearrreglos (Romero, 1991). Utilizando este elemento, se ha demostrado que los genes repetidos de la nitrogenasa presentes en el pSym, pueden participar como puntos de recombinación generando amplificaciones y deleciones de material genético con alta

frecuencia (Flores, 1987; Romero, 1991) (Fig. 9).

Con todo lo anterior, las características del genoma de *Rhizobium etli* que son particularmente relevantes para este proyecto son: 1) la presencia de un plásmido "ayudador" (pa) en la transferencia del pSym, 2) la presencia de secuencias reiteradas del DNA del pSym, 3) la presencia de secuencias homólogas entre el pa y el pSym y 4) la ocurrencia de rearrreglos genómicos (amplificaciones y deleciones) en el pSym.

Hasta el momento se desconoce si el efecto del pa sobre el pSym puede llevarse a cabo en la rizósfera de plantas de *P. vulgaris* L., utilizando como medio de selección positiva la producción de nódulos, así como el posible efecto del pa sobre cepas con algún tipo de rearrreglo genómico en su pSym (amplificaciones, deleciones, etc.).

Amplificación de alto orden

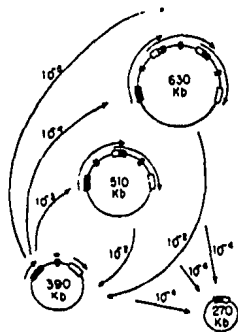


Fig. 9. Representación esquemática de los rearrreglos observados en el plásmido simbiótico de *R phaseoII* CFN42. Las flechas largas alrededor de los círculos indican la extensión de la unidad amplificada. Los números sobre las flechas son las frecuencias de los respectivos rearrreglos, redondeados a la potencia más cercana. (Romero, 1991).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS.

Las hipótesis que se pretenden explorar en este proyecto son:

- a) El pa produce su efecto ayudador para la transferencia del pSym *in planta*.
- b) Los rearrreglos genéticos en el pSym (amplificaciones o deleciones) afectan la frecuencia de transferencia de éste en presencia o ausencia del pa.

OBJETIVOS.

Como consecuencia de las hipótesis mencionadas, los objetivos son:

- Determinar la frecuencia de transferencia del pSym en presencia y ausencia del pa *in planta*.
- Conocer el efecto que producen los cuatro tipos de rearrreglos del pSym (duplicaciones, triplicaciones y octuplicaciones de la región perteneciente al operón *nifHDK*, así como la deleción en la región *nif-nif* conservando el elemento GDYN) de la cepa CFN42 de *Rhizobium etli* con respecto a su transferencia en presencia y ausencia del pa de la misma cepa.

METODOLOGIA

MATERIAL.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*.

Microcentrifuga Brinkmann 5415 para tubos Eppendorf.

Incubadora de agitación con ambiente controlado. New Brunswick Scientific. Edison, NJ., U.S.A.

Incubadora 30°C. Isotemp oven. Modelo 230 G. Serie 200. Fisher.

Balanza analítica. Sartorius 1212 MP.

EXPERIMENTOS *IN PLANTA*.

Cámara de crecimiento de plantas. Lab-line Instruments, Inc.

Centrifuga. Modelo TJ-8. Beckman.

Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 3A Perkin-Elmer.

METODO.

Para lograr los objetivos previamente mencionados, se esquematiza el siguiente protocolo general:

IN VITRO	IN PLANTA
Cepas con pSym: silvestre, deletado (120 kb), duplicado (120 kb), triplicado (240 kb) y octuplicado; marcados genéticamente con GDYN	Esterilización de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Cruzas bacterianas	Germínación y crecimiento en matracas con medio de crecimiento libre de nitrógeno como fuente nutritiva.
Obtención de transconjugantes en medio selectivo	Inoculación de las plantas con solución bacteriana
Determinación de las frecuencias de transferencia - Interpretación	Observar nodulación
Análisis por perfil de plásmidos (Eckhardt)	Contar nódulos
	Exprimir nódulos

Dentro de este proyecto se manejaron las cepas bacterianas que en la tabla 1 se muestran.

Para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto se propusieron las siguientes cruza bacterianas y medios de crecimiento selectivo para cada una:

pd(silvestre + pa)

medio selectivo

1) CFNX5 X GMI9023

LBrif100sp75 (kan15)

2) CFNX5 X 2001

PYrif50sp50

PYrif50kan15

3) 2001/pdCFNX5 X GMI9023

LBrif100sp100

pd(amplificado + pa)

4) CFNX28(X2) X GMI9023

LBrif100sp100 (kan50)

5) CFNX28(X3) X GMI9023

LBrif100sp100 (kan50)

6) CFNX39(X8) X GMI9023

LBrif100sp100 (kan100)

7) CFNX26 X 2001

PYrif100sp100

2001/pdCFNX26

8) CFNX28 X 2001

PYrif100sp100

2001/pdCFNX26

9) CFNX39 X 2001

PYrif100sp100

2001/pdCFNX39

- 10) 2001/pdCFNX26 X GMI9023 LBrif100sp100 (kan50)
11) 2001/pdCFNX28 X GMI9023 LBrif100sp100 (kan50)
12) 2001/pdCFNX39 X GMI9023 LBrif100sp100 (kan100)

(pdΔ + pa)

- 13) CFNX2(pdΔGDYN) X GMI9023 LBrif100sp100
14) CFNX2(pdΔGDYN) X 2001 PYrif100sp100
2001/pdΔ2
15) 2001/pdΔ2 X GMI9023 LBrif100sp100

(pdΔ, como receptora) + pa

- 16) CFNX5 X CE-3 PYcm25sp75 (str+)
17) CFNX5 X 2001 PYrif75sp75 (str+)

(pdΔ, como receptora) - pa

- 18) 2001/pdCFNX5 X 3-53 PYcm25sp75 (str+)
19) 2001/pdCFNX5 X CE-3 PYcm25sp75 (str+)
20) 2001/pdCFNX5 X 1-95-1 PYcm25sp75 (str+)

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
CE-3	<i>Phytolacca</i> sub CFN42 (44 x 36 x 36) (Cm^R)	Flores 1987
CFN15	CFN42 con pSymbiotic (C114, 14-10 ¹¹ Ca ¹¹ Sp ¹¹ Sp ¹¹)	Romero 1991
CFN126	CFN15 pSymbiotic (suplenteado) (32 x 14 x 50) (Cm^R)	Romero 1991
CFN128	CFN15 pSymbiotic (suplenteado) (32 x 14 x 50) (Cm^R)	Romero 1991
CFN136	CFN15 pSymbiotic (suplenteado) (32 x 14 x 100) (Cm^R)	Romero 1991
CFN137	CFN15 pSymbiotic (suplenteado) (32 x 14 x 100) (Cm^R)	Romero 1991
3001	CFN42 p β gal ⁺ (R^R)	Colección del CIFN
GAMB02	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (sin plasmidos) (LB R ⁺)	Rosenberg 1968
3-53	CFN42 p β gal ⁺ (Cm^R)	Colección del CIFN
1-95-1	CFN42 p β gal ⁺ (Cm^R)	Colección del CIFN
2881 p α CFN15	de pSymbiotic (C114) (14 x 10 ¹¹ Ca ¹¹ Sp ¹¹ Sp ¹¹)	Este trabajo
2881 p α CFN12	CFN12 con pSymbiotic (suplenteado) (32 x 14 x 50) (Cm^R)	Este trabajo
2881 p α CFN126	CFN126 p β gal ⁺ (R^R) (Cm^R)	Este trabajo
2881 p α CFN128	CFN128 p β gal ⁺ (R^R) (Cm^R)	Este trabajo
2881 p α CFN136	CFN136 p β gal ⁺ (R^R) (Cm^R)	Este trabajo
2881 p α CFN137	CFN137 p β gal ⁺ (R^R) (Cm^R)	Este trabajo
GAMB02 p α CFN15	<i>Agrobacterium</i> con p α CFN15 (LB R ⁺) (14 x 10 ¹¹ Ca ¹¹ Sp ¹¹ Sp ¹¹)	Colección del CIFN
GAMB02 p α CFN12	<i>Agrobacterium</i> con p α CFN12 (LB R ⁺) (32 x 14 x 50) (Cm^R)	Este trabajo
GAMB02 p α CFN126	<i>Agrobacterium</i> con pSymbiotic (32 x 14 x 50) (Cm^R)	Este trabajo
GAMB02 p α CFN128	<i>Agrobacterium</i> con pSymbiotic (32 x 14 x 50) (Cm^R)	Este trabajo
GAMB02 p α CFN136	<i>Agrobacterium</i> con pSymbiotic (32 x 14 x 100) (Cm^R)	Este trabajo
8-11	CFN42 p β gal ⁺	Colección del CIFN
10-20-8	CFN42 p β gal ⁺	Colección del CIFN
2001 p β gal ⁺ 11	CFN42 p β gal ⁺ (R^R)	Este trabajo
2001 p β gal ⁺ 10-20-8	CFN42 p β gal ⁺ (R^R)	Este trabajo

Tabla 1. Cepas bacteriales usadas en este estudio.

La metodología para la realización de este proyecto se señala con una secuencia de protocolos, los cuales aparecen a continuación.

PROTOSCOLOS DE SOLUCIONES.

MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO DE CULTIVO SOLIDO DE PY.

Peptona de caseína.....2.5 gr
Extracto de levadura.....1.5 gr
Agar bacteriológico.....7.5 gr

MEDIO DE CULTIVO SOLIDO DE LB.

Peptona de caseína.....5.0 gr
Extracto de levadura.....2.5 gr
NaCl.....5.0 gr
Agar bacteriológico.....7.5 gr

Esterilizar en autoclave.

NOTA: Para medios líquidos, tanto de LB como de PY, sólo se prescinde del agar bacteriológico.

Estas cantidades son las correspondientes para la preparación de 500 ml de medio de cultivo.

Cloruro de calcio (0.7 M)

CaCl_27.77 g

Agua.....100 ml

Esterilizar en autoclave.

Agregar 1 ml por cada 100 ml de medio PY.

INOCULACION DE PLANTAS

STOCK FAHRAEUS (100X) EN 1 LITRO.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$15.0 gr

KH_2PO_410.0 gr

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$10.0 gr

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$12.0 gr

Citrato de hierro.....0.5 gr

STOCK TRAZAS GIBSON (100X) EN 1 LITRO.

H_3BO_32.86 gr

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$2.03 gr

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.22gr

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0.80 gr

$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0.80 gr

AGAR BLANDO (0.8%)

Agar.....1.8 g

Agua con soluciones nutritivas (stock Fahraeus y trazas Gibson).....200 ml

Agregar 10 ml de cada una de las soluciones del stock Fahraeus y 1 ml de trazas Gibson por cada litro de agua.

Esterilizar en autoclave.

ECKHARDT VERTICAL

TRIS 5X pH 8 (4 LITROS).

Tris base.....216 gr

Acido bórico.....110 gr

EDTA 0.5 M.....80 ml.....186.1 gr/l de agua y titular con NaOH a pH 8.

TRIS 1X.

Tris 5X.....400 ml

Agua destilada.....1600 ml

SOLUCION A (10 ml).

Lisozima.....13.0 mg

RNAasa.....3.5 μ l

Azul de bromofenol.....5.0 mg

Ficoll 20%.....2.0 gr

Tris 1X.....10 ml

SOLUCION B (100 ml).

SDS 02% en Tris 1X.....0.2 gr

Ficoll 400,000 10%.....1.0 gr

Tris 1X.....100 ml

SOLUCION C (100 ml).

SDS 02% en Tris 1X.....0.2 gr

Ficoll 400,000 5%.....5.0 gr

Tris 1X.....100 ml

SARCOSIL 0.1% TE (50/20) pH 8

Tris 1X pH 8.....250 ml...Trizma base 30.28 gr con 200 ml de
agua, ajustar con HCl (10-15 ml) y alonar

Sarcosil (0.1%).....0.25 gr

FICOLL 20% EN TRIS BORATOS 1X.

Ficoll.....10 gr

Tris boratos 1X.....50 ml

ECKHARDT HORIZONTAL

TEB 5X (pH 8.2)

Tris 89 mM.....54 g

Na₂EDTA 2.5 mM.....4.65 g

Acido bórico 89 mM.....27.5 g

Agua.....1000 ml

TE (200 ml, pH 8.6)

Tris 10 mM.....0.24 g

Na₂EDTA.....0.074 g

N-lauril sarcosina (sarcosil) 0.3% en agua.

sarcosil.....0.3 g

agua.....100 ml

Conservar a 4°C.

Ficoll (WT 400,000) 20% en TE

Ficoll.....2 g

Agua.....10 ml

Alicuotar en 1 ml y conservar a -20°C.

Solución de lisis en TE

RNAasa A.....0.4 µg

TE.....1 ml

Lisozima.....40 µl

Hervir durante 10 min a 95°C.

Alicuotar en 230 ml y conservar a -20°C.

Lisozima

Lisozima.....1 µg

Agua.....100 ml

SDS 10% en agua

SDS.....1 g

Agua.....10 ml

Agregar una pequeña cantidad de xilen cianol.

DILUCIONES

MgSO₄ 10 mM-Tween 0.01%

Sulfato de magnesio.....0.2465 g

Tween 40.....10 µl

ANTIBIOTICOS (solución stock)

Cloranfenicol (cm).....30 mg/ml

Espectinomicina (sp).....25 mg/ml

Estreptomycin (str).....25 mg/ml

Kanamycin (kan).....15 mg/ml

Rifampicin (rif).....25 mg/ml

PROTOSCOLOS DE EXPERIMENTOS IN VITRO.

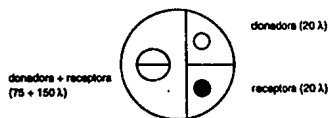
PROTOSCOLO PARA OBTENER CULTIVOS EN LIQUIDO.

1. En una campana de medio estéril colocar 2.5 ml de PY ó LB líquido en tubos de ensayo.
2. Con un asa de siembra previamente esterilizada a la flama y posteriormente enfriada, tomar una asada de la caja de petri con la cepa a crecer.
3. Tomar un tubo de ensayo (previamente llenado con PY o LB) y destaparlo frente al mechero.
4. Introducir cuidadosamente el asa en el tubo de ensayo.
5. Agitar el asa de siembra hasta que la asada tomada quede suspendida en el medio de cultivo líquido.
6. Acercar la boca del tubo al mechero y tapar.
7. Agitar la mezcla hasta que quede homogénea (sin grumos).
8. Realizar todo el protocolo anterior con cuantas cepas a crecer sean necesarias.
9. Poner un tubo sin asada (testigo = PY o LB).
10. Dejar los tubos en agitación a 30°C por 12 horas (aproximadamente).

PROTOSCOLO DE CRUZAS.

1. Crear un cultivo en líquido de cada cepa.

2. En una campana con medio estéril, tomar una caja de petri con medio sólido (PY o LB) y marcar con un plumón tres áreas.
3. Tomar 20 μ l de cada una de las cepas crecidas y ponerlas en una de las áreas previamente marcada para ella (20 μ l, donadora; 20 μ l, receptora).
4. Tomar 150 y 75 μ l de las cepas problema y colocarlas juntas en la tercer área marcada (150 μ l, receptora; 75 μ l, donadora).
5. Dejar secar.
6. Hacer una caja duplicado de esta.
7. Incubar a 30°C por 24 hr.



PROTOCOLO PARA OBTENER TRANSCONJUGANTES EN MEDIO DE CRECIMIENTO SELECTIVO (POR GOTTA).

1. Del crecimiento obtenido en las cajas de cruza, se hace un raspado y resuspensión en 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM-tween 0.01% (solución concentrada).
2. Después de resuspender y agitar hasta homogenizar, se procede a hacer las

diluciones correspondientes (0.1 ml de la solución concentrada en 0.9 ml de $MgSO_4$ -tween; de 10^{-1} hasta 10^{-8}).

3. Poner de estas diluciones (dependiendo de la selección buscada: donadoras - 10^{-6} , 10^{-7} -, receptoras - 10^{-7} , 10^{-8} - o transconjugantes - 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} -) 10 y 20 μ l en cajas de petri con medio de crecimiento sólido selectivo (con antibiótico) con su duplicado (experimento por gota).

4. Dejar secar.

5. Poner aparte (en las mismas cajas de selección) una asada de cada una de las cepas (receptora, donadora y transconjugante), las cuales servirán de testigos.

5. Incubar a 30° C durante tres días.

PROTOCOLO PARA OBTENER FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA.

1. Contar las colonias crecidas en los diferentes medios de selección y a diferentes diluciones utilizando un contador de colonias.

2. Escribir el número de colonias de las cepas receptora, donadora y transconjugante por separado.

3. Obtener la cantidad promedio (caja con su duplicado).

4. Calcular la cantidad de bacterias/ ml/ 10^0 .

5. Obtener el promedio de la cantidad mencionada en el punto anterior.

6. Con los promedios de cada una de las cepas (receptora, donadora y

tranconjugante), obtener el resultado del cociente transconjugante/donadora, que es la frecuencia de transferencia para esa cruz.

PROTOCOLO PARA PARCHAR COLONIAS.

1. De las colonias previamente contadas, en una campana con medio estéril realizar parchado (para purificar y hacer Eckardts).
2. En una caja de petri con el medio selectivo de alguna de las cepas seleccionadas y colocadas sobre una guía con números (del 1 al 100) tomar con un pallito una colonia aislada y pasarla a la caja en el número uno.
3. Continuar hasta llenar toda la caja.
4. Incubar a 30° C, durante tres días.
5. Después de este tiempo, se escogieran algunas de ellas para hacer cultivos en líquido.
6. Realizar el protocolo para la técnica de Eckhardt (horizontales o verticales).

PROTOCOLO DE CORRIMIENTO DE GELES VERTICALES (ECKHARDT) PARA LA VISUALIZACION DE PLASMIDOS.

1. Hacer solución Tris-Boratos 5X.
2. Hacer dilución a 1X.

3. **Hacer una solución de agarosa 0.7% con tris 1X.**
4. **Enfriar un poco y agregar cuidadosamente entre los cristales para hacer el gel.**
5. **Limpiar con mucho cuidado cada uno de los carriles del gel elaborado y enjuagar perfectamente con tris 1X.**
6. **De los cultivos en líquido de las colonias parchadas, agregar (dependiendo de el crecimiento), hasta 1 ml en tubos de microcentrifuga (ependorf).**
7. **Centrifugar durante 2 min a 14000 rpm y eliminar sobrenadante con una jeringa.**
8. **Agregar 0.5 ml de sarcosil.**
9. **Resuspender cada uno de los tubos con un palillo y homogenizar.**
10. **Centrifugar 2 min a 14000 rpm**
11. **Eliminar sobrenadante con jeringa y meter a -24° C 10 min.**
12. **Agregar 40 µl de solución A en cada uno de los carriles del gel y revolver suavemente hasta homogenizar.**
13. **Sacar el botón de los tubos y agregar a los carriles con solución A (cuidando de no hacer burbujas).**
14. **Agregarles 40 µl de solución B y homogenizar suavemente.**
15. **Agregar 100 µl de solución C.**
16. **Sellar con agarosa fundida todos los carriles.**
17. **Colocar el gel dentro de una unidad de corrimiento de geles verticales con tris 1X como buffer.**
18. **Pre correr 1h a 8 mA (equivalente a 30 volts).**
19. **Correr 4h a 40 mA (equivalente a 170 volts).**

20. Sacar gel y teflir con bromuro de etidio por 10 min.
21. Lavar el gel y observar en una caja de luz u.v.
22. Fotografiar.
23. Interpretar bandas.

PROTOCOLO DE VISUALIZACION DE PLASMIDOS EN GEL HORIZONTAL

1. Fundir agarosa al 0.75% en TEB 1X (0.75 % gr de agarosa en 100 ml de TEB 1X).
2. Agregar la agarosa en una cámara horizontal de electroforesis equilibrada y colocar los peines.
3. Preparar dos series de tubos Eppendorf.
4. Leer la D.O. de los cultivos en líquido previamente preparados (12 horas antes) en el espectrofotómetro a 620 nm. Para una D.O. de 0.3, tomar 1 ml del cultivo.
5. Centrifugar durante 3 min a 1300 rpm.
6. Extraer el sobrenadante (con jeringa) y colocar los tubos en hielo.
7. Sacar los peines del gel.
8. Agregar TEB 1X hasta que toque el gel, sin cubrir los pozos.
9. Agregar a cada pozo 25 μ l de SDS 10%-xilen cianol.
10. Precorrer el gel a 100 V durante 30 min con el polo negativo al contrario.
11. En la segunda serie de tubos, agregar 1 ml de N-lauril sarcosina 0.3% frío.
12. Resuspender el botón, usando pipetman, en 500 μ l de agua fría y agregarlo

suavemente al tubo que tiene N-lauril sarcosina 0.3%.

13. Centrifugar durante 3 min a 1300 rpm.
14. Extraer sobrenadante (con jeringa).
15. Resuspender el botón en 40 μ l de ficoll 20% en TE frío con una pipetman.
16. Colocar la cámara horizontal de electroforésis en el cuarto frío y equilibrarla.
17. Agregar TEB 1X a la cámara hasta cubrir el gel.
18. Agregar 40 μ l de lisozima a la solución de lisis.
19. Agregar 10 μ l de solución de lisis a cada muestra.
20. Tomar 25 μ l de cada muestra y ponerla en el pozo correspondiente.
21. Precorrer el gel a 40 V durante 30 min.
22. Correr a 100 V durante 24 horas.

PROTOSCOLOS DE EXPERIMENTOS *IN PLANTA*.

PROTOSCOLO PARA ESTERILIZACION DE SEMILLAS.

1. Escoger tres veces más semillas de las que se van a utilizar.
2. En una campana estéril, lavar las semillas durante 5 min en etanol al 80%.
3. Decantar y lavar con agua estéril 2-3 veces.
4. Agregar cloralex (hipoclorito de sodio con el 6% de cloro libre) al 20% durante 15 min.
5. Lavar abundantemente con agua estéril, hasta eliminar el cloralex.

6. Con pinzas esterilizadas a la flama, seleccionar las mejores semillas y colocar 3-4 semillas en cajas de petri con agar al 0.8%.
7. Las cajas se envuelven en papel aluminio y se colocan en la incubadora a 30°C.
8. Después de 2 días, pasarias a matraces Erlen-Meyer con agar blando (al 0.8%) y medio nutritivo Fahraeus y trazas Gibson.

PROTOCOLO PARA INOCULAR SEMILLAS.

1. Como experimento paralelo *in vivo* de los cultivos en líquido de las cepas anteriores, centrifugar a 3000 rpm durante 10 min.
2. Eliminar sobrenadante.
3. Agregar 1 ml de agua destilada, homogenizar, volver a centrifugar a 3000 rpm por 8 min.
4. Eliminar sobrenadante y agregar 3 ml de agua destilada.
5. Tomar 1 ml y hacer una dilución 10-1 para leer al espectrofotómetro.
6. De la lectura obtenida a una longitud de onda (λ) de 600 nm, hacer las correlaciones con el número de células correspondientes y los posteriores cálculos de transformación a células/ml, comparandolas con las de una curva de relación D.O.-No. células, previamente obtenida.
7. Ya en medio estéril, de las semillas germinadas 3 días en la oscuridad en agar al 0.8% pasarias a matraces Erlen-Meyer con agar blando (0.8%) y medio nutritivo,

tratando de enterrar la raíz hacia abajo en el agar.

8. De la dilución anteriormente leída, realizar una dilución en donde hallan 10^8 células/ml.

9. Tomar 0.1 ml y agregarlo en la región cercana al nacimiento radical de la semilla transplantada, sin tocarla.

10. Tapar con frasquitos estériles.

11. Incubar a 30°C por 2-3 días.

12. Incubar a 27°C por 10 días.

13. Realizar experimento de confirmación *in vitro* con diferentes diluciones (de 10^8 hasta 10^{-6}) en medio sólido PY y PYr 15° .

14. Incubar a 30°C por 3 días.

15. Obtener el número de células por ml de la solución inicial (10^8) y correlacionarlo con el número previamente obtenido para la inoculación de las semillas con la lectura de densidad óptica en el espectrofotómetro (10^8 células/ml).

16. Proseguir con el protocolo para exprimir nódulos.

PROTOCOLO PARA EXPRIMIR NODULOS.

1. En una cámara con medio estéril, sacar las plantas del agar blando con medio nutritivo.

2. Con unas pinzas flameadas quitar los nódulos y ponerlos en una caja de petri con agua estéril.

3. Pasar los nódulos con las pinzas, a otra caja de petri con una solución de cloralex al 20% durante 3 min.
4. Pasar nuevamente cada uno de los nódulos a otra caja con agua estéril y enjuagarlos 3 veces.
5. En cajas con PY poner una gota del agua con la que se enjuagó por última vez.
6. Poner un nódulo sobre la caja con PY, flamear las pinzas, enfriar, exprimir el nódulo y estriar sobre toda la caja con un asa de siembra previamente flameada.
7. Dejar que seque.
8. Incubar a 30°C por 2-3 días.
9. Estriar las colonias aisladas en medio selectivo sólido (PYr⁵⁰).
10. Realizar protocolo para visualización de plásmidos (Eckhardt).

RESULTADOS

CRUZAS IN VITRO.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2. En ella se señalan: el número de cruza, la cruza realizada, la frecuencia de transferencia promedio del pSym correspondiente a esa cruza, el porcentaje de transconjugantes que heredaron distintas combinaciones de plásmidos (visualizados en geles de agarosa tipo Eckhardt), entre paréntesis el número de transconjugantes analizados por Eckhardt (número de carriles analizados) y finalmente una sección, señalada como datos adicionales, con una pequeña conclusión sobre el resultado obtenido para cada una de las cruza realizadas. Esta tabla tiene la característica de agrupar a todas las cruza realizadas, las cuales pueden analizarse y compararse en conjunto o por bloques (ver más adelante). En el caso de los porcentajes de combinaciones de plásmidos heredados en las cepas transconjugantes, hay que tener en cuenta que dichos porcentajes fueron obtenidos tomando como 100% al número de carriles analizados por Eckhardt y el número de combinaciones presentes (plásmidos visualizados en las transconjugantes). En general, los datos adicionales se refieren a la interpretación de las frecuencias de transferencia del pSym (silvestre, amplificado o deletado) con o sin el pa, así como la de los datos obtenidos a partir de la visualización de plásmidos heredados por las transconjugantes, teniendo como referencia a las cepas parentales para determinar el tipo de rearreglo plasmídico presentado por la cruza realizada (ver adelante).

Por otra parte, se incluyen gráficas de cada una de las cruza realizadas. En cada una de las gráficas se muestran los porcentajes de plásmidos heredados por las

Tabla 2. Análisis de las diferentes cruza realizadas, todas numeradas y mostrando la frecuencia de transferencia promedio, porcentajes de plásmidos contenidos en las transconjugantes y datos adicionales para cada una

#	CRUZAS	FRECUENCIA PROMEDIO	COMBINACIONES DE PLASMIDOS PORCENTAJES	# CARRILES	DATOS ADICIONALES
1	CFNX5 X GMI9023	1.85X10 ⁻⁶	pSym CFNX5: 57% pa+pSym CFNX5: 29% pe+pSym CFNX5: 14%	(10)	Frecuencia de transferencia normal, presentando algunos tipos de rearrreglos Probablemente la disminución en la frecuencia de transferencia sea debida a: 1) la ausencia de los demás plásmidos, 2) al medio selectivo o 3) a la presencia del pSym deletado. Sin embargo, el pSym presente en las transconjugantes es, para todos los casos, el silvestre.
2	CFNX5 X 2001	1.4X10 ⁻⁶	pSym CFNX5: 62.5% pa+pSym: 25% pSym ΔΔ o pa: 12.5%	(16)	
3	CFNX5 X 3-53	1.8X10 ⁻⁷	pSym: 100%	(8)	
4	CFNX5 X CE-3	4.6X10 ⁻⁸	pSymCFNX5: 100%	(8)	Frecuencia de transferencia baja, posiblemente debida a la presencia del pSym en la cepa receptora (dificultad para desplazarlo).
5	2001/pdCFNX5XGMI9023	7.8X10 ⁻⁷ < 1X10 ⁻⁸	pSym CFNX5 100%	(10)	Frecuencia de transferencia determinada por la ausencia del pa
6	2001/pdCFNX5 X 1-95-1	< 9.4X10 ⁻⁸			Baja frecuencia de transferencia debida a la diferencia en el pool plasmídico, con la producción de copas con baja viabilidad, dado que no fue posible obtener transconjugantes.
7	2001/pdCFNX5 X 3.53	< 9.5X10 ⁻⁸			Baja frecuencia de transferencia. No pudieron obtenerse transconjugantes.
8	2001/pdCFNX5 X CE-3	< 3.6X10 ⁻⁸			No pudieron obtenerse transconjugantes.
9	CFNX26 X GMI9023	2.1X10 ⁻⁶	pSym desamplificado: 87.5% pSymΔ: 12.5%	(8)	Aumento en la frecuencia de transferencia probablemente debida por la secuencias amplificadas
10	CFNX28 X GMI9023	2.4X10 ⁻⁶	pSym desamplificado: 73.7% pSym 2X: 15.8% pe-pSym: 10.5%	(19)	Aumento en la frecuencia de transferencia probablemente debida por la secuencias amplificadas
11	CFNX39 X GMI9023	7.5X10 ⁻⁶	pSym desamplificado: 63.6% pSym- 2X-3X: 27.3% pSym CFNX39: 9.1%	(8)	En las tres cruza anteriores se observa un claro aumento en la frecuencia de transferencia de estos (apoyo a la hipótesis de cointegración).

#	CRUZAS	FRECUENCIA PROMEDIO	PORCENTAJES	DATOS ADICIONALES
12	CFNX26 X 2001	1.43X10 ⁻⁶	pa+pSym: 72.5% pSym CFNX26: 27.5%	(12)
13	CFNX28 X 2001	2X10 ⁻⁶	pSym CFNX28: 50% pa+pSym: 38% pa-pSym: 12%	(8)
14	CFNX39 X 2001	7.47X10 ⁻⁶	pSym-CFNX5: 77.8% pa-pSym-CFNX5+pa: 11.1% pa+pSym-CFNX5: 11.1%	(9) Resultados similares a los anteriores: a mayor amplificación mayor frecuencia de transferencia
15	2001/pdX26 X GM19023	6.5X10 ⁻⁴ a) 1.32X10 ⁻⁶ b)	pSym-CFNX5: 66.6% pSym-CFNX5+ pa-pSym-CFNX5: 33.3%	(6,b) La cruce a) corresponde, probablemente a un rearreglo del tipo cointegración de un pSym y un pa, lo que quizás determina la alta frecuencia de transferencia. La cruce b) muestra un comportamiento "normal", pero con pa.
16	2001/pdX28 X GM19023	5X10 ⁻⁷	pSym CFNX28: 25% pSym-CFNX5: 50% pSym-CFNX26: 25%	(4) La baja frecuencia de transferencia puede deberse a la ausencia del pa.
17	2001/pdX39 X GM19023	1.8X10 ⁻⁵	pSym-CFNX5: 22.2% pSym-CFNX26(pa-pSym-CFNX5)+pSym-CFNX5: 11.1% pSym-CFNX26+pa-pSym-CFNX5: 11.1% pa-pSym-CFNX5: 22.2% pSym-CFNX5+pa-pSym: 11.1% pSym-CFNX5+pSym-CFNX26+pa-pSym-CFNX5: 11.1% pSym-CFNX26: 11.1%	(9) El aumento en la frecuencia de transferencia puede interpretarse en base a los datos obtenidos con los porcentajes provenientes de Eckhardt's, observándose claramente el gran número de eventos recombinacionales, sobre todo cuando se tiene un elevado número de copias de una secuencia reiterada.
18	CFNX2 X GM19023	1.04X10 ⁻⁶	pa-pSym: 33.3% pa-pSym+pSym: 44.4% pSym: 22.2%	(9) Los eventos recombinacionales se siguen presentando. La frecuencia de transferencia está afectada (disminuida).
19	CFNX2 X 2001	2.34X10 ⁻⁷	pSym: 100%	(25) La disminución en la frecuencia de transferencia sugiere que la información genética deletada del plásmido original es importante (menor número de "sitios calientes" para la transferencia).
20	2001/pd2 X GM19023	3.8X10 ⁻⁴	pSym: 100%	(10) Frecuencia de transferencia aumentada posiblemente debida a rearreglos previos entre los plásmidos a y d.

transconjugantes de cada una de las cruzas realizadas y los plásmidos presentes en las transconjugantes de dicha cruz (señalados en gráfica de barras y de pastel), así como las fotografías tomadas a los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (tipo Eckhardt), con los cuales se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 2. Todas las fotografías muestran un carril que corresponde, en la mayoría de los casos, a la cepa parental CFNX5 (correspondiente al carril A), los demás carriles (B, C, D, etc.) pertenecen a las transconjugantes con las diferentes combinaciones de plásmidos heredados. Finalmente, para hacer una correlación entre las fotografías de los geles y la gráfica de barra, se colocaron como subíndices del tipo de combinación plasmídica o rearrreglo que se observa en ellas las letras mayúsculas (A, B, C, etc.) que corresponden a las bandas observadas en los geles. Dado que no pudieron obtenerse transconjugantes de las cruzas 6, 7 y 8, sólo se muestran 17 gráficas en total y no 20 como se esperaba. La numeración de dichas gráficas es progresivo con el de las de las figuras mostradas en la parte introductoria.

Para el análisis más sencillo de los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro*, estos han sido divididos en tres bloques: el primero, que comprende las cruzas 1-8; el segundo, que incluye de la 9-17 y el tercer bloque, con las cruzas 18-20.

En el primer bloque de cruzas (cruzas 1 a 8) se analizó la frecuencia de transferencia del pSym silvestre (cepa CFNX5).

En las cruzas 1 y 2, la cepa donadora contenía pa además de pSym, mientras que las cepas receptoras carecían de estos dos (pa y pSym) (Figuras 10 y 11). Los resultados muestran una frecuencia de transferencia de aproximadamente 10⁻⁶,

concordante con datos previamente obtenidos (Tabla 2).

En las transconjugantes se observa la co-transferencia de los plásmidos pa y pSym, ya sea como cointegrados o separados, en un alto porcentaje (68%). También se observó la generación de un nuevo tipo de réarreglo, posiblemente correspondiente al pa deletado.

En las cruzas 3 y 4, se utilizó la misma donadora, que contiene el pSym silvestre y pa y las cepas receptoras que contienen secuencias del Sym, ya sea deletado (cruza 3) o completo (cruza 4). En ambos casos se observó una disminución en la frecuencia de transferencia que puede ser atribuida a la presencia del pSym (silvestre o deletado) en la cepa receptora y una consecuente dificultad para desplazarlo (Tabla 2). Entre las transconjugantes obtenidas se observó siempre la transferencia del plásmidos pSym silvestre (Fig. 12 y 13), determinado así por el marcador seleccionado (kan^R).

En las cruzas 5-8, se determinaron las frecuencias de transferencia del pSym silvestre en ausencia del pa, teniendo receptoras carentes del pSym silvestre (cruzas 5 y 6), en las que presentaba una delección (cruza 7) o bien en las que estaba completo (cruza 8). En todos los casos se observó una menor frecuencia de transferencia a la que pudiera ser detectada (Tabla 2), consecuencia debida a la ausencia del pa. En las cruzas 6 a 8, las frecuencias de transferencia, fueron inclusive menores a las de selección de derivadas de la cepa donadora, resistentes al antibiótico (cm) usado para la selección (Figuras no mostradas, correspondientes a las 6, 7 y 8).

En el segundo bloque de cruzas (cruzas 9 a 17), se determinó la frecuencia de transferencia del pSym, con una duplicación de una región de 120 kb (CFNX26), con una triplicación (CFNX28) o una amplificación de ocho veces (CFNX39) de esta región en presencia o ausencia del pa y utilizando como receptoras a cepas carentes del pSym. Podemos observar que en presencia del pa hay una tendencia gradual de aumento en la frecuencia de transferencia del pSym, directamente correlacionada con el grado de amplificación del pSym (cruzas 9 a 14) (Tablas 2 y 3 y Figuras 15 a 20).

Como se observa, las frecuencias de transferencia varían un poco en función de la cepa receptora (menor con la 2001 que con la GMI9023), aunque sigue siendo notoria la tendencia en el incremento de la frecuencia de transferencia del pSym debido a las amplificaciones presentes en éste. Esto está correlacionado directamente con un aumento en el número de secuencias homólogas entre los plásmidos.

Quisiera hacer notar que el grado de amplificación no se mantiene en las transconjugantes, ya que se observan diferentes tipos de rearrreglos, como son las desamplificaciones, las cointegraciones y las deleciones (Tablas 2 y 4; Figuras 15 a 23).

CRUZA	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA	AUMENTO CON RESPECTO A LA CFNX5 (X 10 ⁻⁶)	AUMENTO CON RESPECTO A LA CFNX5 (Núm veces)
CFNX5XGMI9023	1.8X10 ⁻⁶	-	-
CFNX28XGMI9023	2.11X10 ⁻⁶	0.31	1.17
CFNX28XGMI9023	2.44X10 ⁻⁶	0.64	1.35
CFNX39XGMI9023	7.66X10 ⁻⁶	5.66	4.25
CFNX5X2001	1.4X10 ⁻⁶	-	-
CFNX28X2001	1.43X10 ⁻⁶	0.03	1.02
CFNX28X2001	2.00X10 ⁻⁶	0.60	1.42
CFNX39X2001	5.96X10 ⁻⁶	4.56	4.25

TABLA 3. Aumento en los valores de frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico en cruzas de cepas con diferentes tipos de amplificaciones.

REARREGLO	CARACTERISTICAS	CRUZAS
DESAMPLIFICACIONES	pSym proveniente de cepas amplificadas 2X, 3X y 8X, con tamaños menores a los de la amplificación inicial (=pSymCFNX5).	9, 10, 11, 14, 15, 16, 17
COINTEGRACIONES	Generalmente entre pa y pSym desamplificado, deletado o silvestre.	1, 10, 13, 14, 16, 17, 18
DELECCIONES	Generalmente del pSym proveniente de las cepas con algún tipo de amplificación (2X, 3X u 8X) y de tamaño menor al de la CFNX5 (=pSymCFNX2).	9, 16, 17
DELECCIONES DE ALTO ORDEN	Encontradas únicamente en las tranconjugantes obtenidas de la craza CFNX5 X 2001 y con tamaños menores al del pa.	2

Tabla 4. Tipos de rearrreglos en plásmidos obtenidos de tranconjugantes.

En las cruzas 15-17, se intentó determinar la frecuencia de transferencia

de los pSym con distintos grados de amplificación en ausencia del pa (Tabla 2). Entre las transconjugantes de las distintas cruzas se observaron algunas con pa, además de una serie de distintos tipos de rearrreglos (desde desamplificaciones, cointegraciones, deleciones y mezclas de ellas) (Fig. 21 a 23). Estos resultados nos indican que las donadoras sí tenían pa, a pesar de que se suponía que carecían de él, aunque en una proporción muy baja, por lo que no fué visto en el momento de analizar el patrón de plásmidos.

Finalmente en el tercer bloque (cruzas 18-20), se estudio la frecuencia de transferencia de cepas con un pSym deletado de la región de 120 kb, en presencia (cruzas 18 y 19) y ausencia (cruza 20) del pa. Podemos observar que la frecuencia de transferencia de este pSym en presencia del pa, es menor que la del pSym silvestre (Tabla 2). Cuando se utilizó como donadora la cepa con pSym deletado sin pa (cruza 20), se observó una frecuencia de transferencia muy elevada; aunque en el análisis de plásmidos de las transconjugantes, se observaba un sólo plásmido, de tamaño correspondiente al del pSym deletado (Tablas 2 y 5; Fig. 24 a 26).

CRUZA	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA	DISMINUCION CON RESPECTO A LA CFNX5 (X 10 ⁻⁶)	DISMINUCION CON RESPECTO A LA CFNX5 (Núm. veces)
CFNX5XGM19023	1.8X10 ⁻⁶	-	-
CFNX2XGM19023	1.04X10 ⁻⁶	0.76	0.43
CFNX5X2001	1.4X10 ⁻⁶	-	-
CFNX2X2001	0.234X1 ⁻⁶	1.17	0.84

TABLA 5. Disminución en los valores de frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico deletado en cruza de cepas con diferentes características.

CRUZAS *IN PLANTA*.

El objetivo de estos experimentos era el de determinar la influencia de la presencia del *pa* sobre la capacidad de transferencia del pSym en la rizosfera, detectando a las transconjugantes por su capacidad para producir nódulos.

Los resultados obtenidos en los experimentos *in planta* se resumen en la tabla 6, en la cual se señalan: los experimentos realizados (1, 2, 3a y 3b) indicando con subíndices el número de plantas inoculadas, la proporción en que fueron mezcladas las cepas donadoras (D) y receptora (R) (10^7 o 10^6 células), para cada una de las cruzas (10-20-B + 2001 y 8-11 + 2001) se señala cual es la cepa donadora y cual es la cepa receptora, las características principales de plásmidos presentes o ausentes (plásmidos necesarios para la nodulación y la presencia o ausencia del *pa*), el total de nódulos obtenidos (número de transconjugantes que heredaron el pSym) con características *rif^R* al momento de incubar el contenido de dichos nódulos, el número de nódulos por matraz y una estimación de la frecuencia de transferencia del pSym, para la cual, se supuso que cada nódulo provenía de una transconjugante (un nódulo:una transconjugante), por lo tanto, dicha estimación da el siguiente cociente:

$$\text{frecuencia} = \frac{\text{número de nódulos}}{\text{células donadoras}}$$

donde el número de células donadoras es el producto de la proporción (10^6 o 10^7

células) por el número de plantas inoculadas (6-12 plantas). Se incluyen los resultados obtenidos de las plantas inoculadas con cada una de las cepas como parte de los controles, tanto negativos (no producen nódulos) como positivos (sólo la CE-3, produce nódulos).

Las plantas se inocularon con mezclas de células (cepas 8-11 + 2001 y 10-20-8 + 2001) en proporción 1:1 poniendo 100 μ l de Inóculo con 10^7 células de cada cepa (experimentos 1,2 y 3b) o 10^6 células (experimento 3a), e incubando las plantas por 15-21 días. Las cepas 10-20-8, 8-11 y 2001 son incapaces de inducir la formación de nódulos, por la falta del pb (10-20-8 y 8-11) o pd (2001), resultado confirmado por los controles negativos y positivos (tabla 6), por lo tanto los nódulos obtenidos al inocular con mezclas de estas bacterias deben estar formados por transconjugantes de 2001 que heredaron el pSym de la cepa que lo portaba (fotos no mostradas). Así, los resultados señalados en la tabla 6 muestran que el mayor número de nódulos se presentó cuando la cepa donadora llevaba el pa además del pSym, no así para la que carecía del pa, esto nos indica que el pSym se transfiere bajo estas condiciones y que el efecto del pa sobre el pSym se observa también *in planta*. Si suponemos que cada nódulo está formado por una transconjugante, podemos hacer un cálculo aproximado de la frecuencia de transferencia del pSym en estas condiciones (tabla 6). Como puede observarse, las frecuencias de transferencia en presencia del pa siempre son mayores que cuando este plásmido no está, lo que confirma una vez más el efecto ayudador del pa para la transferencia del pSym y además que este proceso puede llevarse a cabo utilizando plantas como

medio de selección de transconjugantes (capacidad para producir de nódulos). Teniendo presente lo anterior (un nódulo:una transconjugante) y así como el número de nódulos por matraz obtenidos del control positivo (cepa CE-3), estos últimos pueden ser tomados como el 100%. Los resultados porcentuales obtenidos de esta forma, tanto de la cruza 10-20-8 + 2001 como de la 8-11 + 2001, se tiene lo siguiente:

experimento 1 13% (10-20-8+2001) vs. 0% (8-11+2001)
experimento 2 16% (10-20-8+2001) vs. 12% (8-11+2001)
experimento 3a 35% (10-20-8+2001) vs. 0% (8-11+2001)
experimento 3b 89% (10-20-8+2001) vs. 18% (8-11+2001)

lo anteriormente expuesto indica y a la vez refuerza , al igual que los resultados obtenidos a partir de las frecuencias de transferencia del pSym, un mayor porcentaje, siempre, para las transconjugantes (2001 que heredaron, por lo menos, el pSym de la cepa donadora) obtenidas a partir de la cruza de la cepa que posee el pa y el pd mostrando diferencias que van del 2 al 71%; así pues, vemos reflejado una vez más el efecto ayudador que el pa tiene para la transferencia del pSym *in planta*.

Por otra parte, en el análisis de plásmidos de las cepas transconjugantes (datos no mostrados) de ambas cruza, al parecer siempre pasa el pSym con (igual a la cepa silvestre) o sin el pa, e incluso, en algunos de los geles analizados con las transconjugantes de la cruza 10-20-8 + 2001, parecía haberse transferido el pSym con el pa en forma de cointegrado, como se mencionó en la parte de experimentos *in vitro*.

EXPERIMENTO	RELACION (8) (D:R)	CRUZAS						CONTROLES			CE-3 (7) nod/mal
		D		R		D R		10-20-8 (3)	8-11 (3)	2001 (R)	
		10-20-8 + 2001 (pa pd)	10-20-8 + 2001 (pd)	8-11 + 2001 (pd)	8-11 + 2001 (pd)	lot nod	nod/mal F	nod/mal (4)	nod/mal	nod/mal	
1 (7)	10 ⁷ :10 ⁷	8	2.67	1.3x10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	-
2 (8)	10 ⁷ :10 ⁷	33	3.37	2.7x10 ⁻⁷	35	3	2.5x10 ⁻⁷	0	0	0	-
3a (9)	10 ⁶ :10 ⁶	74	7.4	7.4x10 ⁻⁶	-	-	-	0	0	0	-
3b	10 ⁷ :10 ⁷	187	18.7	1.8x10 ⁻⁶	37	3.7	3.7x10 ⁻⁷	0	0	0	36.5

Tabla 6. Resultados obtenidos para cada uno de los experimentos realizados in planta.

(1) Nódulos con colonias *nif^R* formados por transconjugantes. (2) Control positivo. Nódulos con colonias crecidas en PY. (3) Control negativo. (4) Nódulos por matriz. (5) Estimación de la frecuencia de transferencia del pSym. (6) En 100 μ l. (7) Para la cruce 10-20-8 + 2001 se usaron 6 plantas y para la cruce 8-11 + 2001 se usaron 8 plantas. (8) En ambas cruces se usaron 12 plantas. (9) El número de plantas usadas en los dos experimentos fué de 10.

DISCUSSION

Los objetivos generales que motivaron la realización de este trabajo fueron: primero, conocer el efecto que producían los diferentes tipos de rearreglos (amplificaciones o deleciones) en la frecuencia de transferencia del pSym de la cepa CFN42 de *R. etli* en presencia y ausencia del pa, para el cual se obtuvieron resultados que indicaron el efecto positivo (aumento en las frecuencias de transferencia) cuando se trataba de amplificaciones en el pSym o bien el efecto negativo (disminución en las frecuencias de transferencia) cuando se trataba de deleciones en este plásmido, además que se confirmó el efecto ayudador del pa puesto que en ausencia de éste, dicho efecto no se lleva a cabo (frecuencias muy bajas). Para el segundo objetivo general, que fué el de saber si el efecto ayudador del pa para la transferencia del pSym se llevaba a cabo *in planta* fué confirmado con los experimentos realizados para ello.

CRUZAS *IN VITRO*.

Algo que se ha venido viendo durante la realización de todas y cada una de las cruza, es la gran variedad de rearreglos, no solo del pSym, sino además del pa así como del pa con el pSym (tabla 4), y sobre todo con una amplia gama, en cuanto a número de rearreglos, generalmente en función al número de copias presentes en la región nifHDK (120 kb) en el pSym de la cepa donadora, siendo la de mayor número de rearreglos la cepa CFNX39 (octuplicada), lo que indica la gran versatilidad que algunos plásmidos tienen, poniendo en evidencia toda una gama de fenómenos

recombinacionales producidos, en este caso, entre el pa y el pSym. Cabe referir la generación de un nuevo tipo de rearrreglo: **delección de alto orden (cruza 2)**, que posiblemente corresponde a una **delección no del pSym sino del pa**. Todo lo anterior nos habla de las posibles formas con las que se logra la diversidad, no solo plasmídica sino genómica, en general, la cual debe generarse de forma natural entre las cepas que comparten una vida saprofitica (en el suelo) al transferirse diferente información genética proveniente de plásmidos de otras cepas bacterianas. No hay que perder de vista que las frecuencias de transferencia mostradas en los resultados obtenidos para cada cruce, en realidad pertenecen a los eventos recombinacionales que se producen de forma más frecuente, en este caso, señalados con porcentajes (tabla 2).

Del primer bloque (cruzas 1 a 8), para las cruces iniciales (cruzas 1 y 2) los resultados obtenidos fueron los que se esperaban: con el efecto ayudador del pa sobre la transferencia del pSym (10-8). De estos, aunque los mayores porcentajes pertenecieron a la transferencia del pSymCFNX5 (57% para la cruce 1 y 62.5% para la 2), también hubo otros tipos de rearrreglos (cointegrados pa-pSym y delecciones), lo que sugiere un mecanismo de recombinación producido, entre otras cosas, por la presencia de las abundantes secuencias homólogas referidas por Girard, et al. (1991) que el pSym tiene con el pa. Ahora bien, falta determinar la naturaleza real de dichos rearrreglos, como son: conocer si la cointegración del pa es del plásmido completo o solo de una parte de él, determinar si la cotransferencia del pSym con el pa (formando cointegrados o por separado) produce algún rearrreglo previo del cual no se tiene evidencia a simple vista, saber cual es el mecanismo exacto con el que se

producen todos estos tipos de rearrreglos (cointegración), cuales genes-proteínas participan para ello, determinar que región del pa se deleta para la producción de las deleciones de alto orden, saber si esta región es la que con mayor frecuencia se deleta o no y por consiguiente, cuales son las secuencias o regiones que se conservan, etc. Al menos para esta última parte, Brom (comunicación personal) ha obtenido recientemente, de forma análoga, un plásmido caracterizado por la presencia de una deleción de alto orden, con un tamaño aproximado a 90 kb al que ha denominado pA, otra característica es que posee secuencias homólogas no solo del pa sino además del pf, perteneciente a una derivada de la cepa CFN42. Incluso, la generación de un tipo de rearrreglo nuevo mientras se realizaba este trabajo (deleción de alto orden), no descarta la posibilidad de que tenga, además de una deleción del pa, una cointegración-deleción con el pf, puesto que éste no se observa en las fotos para el análisis del perfil de plásmidos.

En las cruzas 3-4, en donde se quería saber la frecuencia de transferencia del pSym a una cepa donadora con el pSym completo (4) o sólo con parte de él (3); la disminución en la frecuencia de transferencia para ambos casos se atribuye directamente a la presencia del pSym (completo o no) en la cepa receptora, con una consecuente dificultad para el desplazamiento de éste.

De las cruzas 5-8, cuyo objetivo era conocer las frecuencias de transferencia del pSym de una cepa carente del pa, en donadoras con una poza plasmídica y características del pSym diferentes (completo, cruzada 8; deletado, cruzada 7 o ausente, cruza 5-6), siempre se obtuvo una frecuencia de transferencia menor a la que

puédiera ser vista (< 10-8) o bien, muy baja (cruza 5), debido, en primer lugar a que la cepa donadora al no poseer pa, carece del efecto ayudador de este plásmido; en segundo lugar, al conjunto plasmídico que las cepas receptoras contienen y que ello les proporciona no solo un genotipo diferente, sino también un fenotipo distinto al de la cepa silvestre y que se ve reflejado con la disminución en la frecuencia de transferencia. Por ejemplo, la cepa 3-53 (usada como receptora) que carece del pb y por ello está afectada en la producción de LPS (lipopolisacáridos) y subsecuentemente en la composición de su pared celular, esto pudiera ser una característica importante en la bacteria para que no se lleve a cabo un evento conjugacional normal. En el caso de la 1-95-1, tal vez no sólo la posesión del pb y pe deletado, sino de la falta de los otros plásmidos sea un determinante negativo para la transferencia de material genético por medio de la conjugación. En la cepa CE-3, como se señaló en la cruz 4, el efecto que genera la posesión de un pSym en la cepa receptora, se refleja, aún con el pa, en una baja frecuencia de transferencia, más aún sin éste, sobre todo por la dificultad que implica desplazar al antiguo pSym. Finalmente, y de forma aparentemente contradictoria con las anteriores, la cepa GMI9023 de la especie *Agrobacterium tumefaciens* cuando es usada como receptora, siendo una cepa totalmente carente de plásmidos y que por ello debería producir un comportamiento similar al de los anteriores (baja frecuencia de transferencia del pSym), no lo dá, quizás porque se trata de una especie diferente a *Rhizobium* aunque taxonómicamente son especies cercanas y además comparten el mismo microambiente (rhizosfera); quizás también, la información genética contenida en el cromosoma de esta cepa provoca un efecto positivo en el pSym a través del efecto

que el pa tiene sobre este para su transferencia por medio de la conjugación y que por ello ésta cepa funciona perfectamente como receptora y posterior transconjugante. No hay que descartar como un tercer lugar, al posible efecto que provocó en la bacteria la utilización del antibiótico cloranfenicol como medio de selección de mutantes resistentes (sin las resistencias que confiere el GDYN, usado en otras cepas), para posteriormente obtener transconjugantes; sin embargo, dicho efecto no puede ser cuantificado porque no se obtuvieron mutantes resistentes a otros antibióticos para poder hacer la comparación con éste.

Para el segundo bloque de cruza (9-17), la determinación de las frecuencias de transferencia de cepas con el pSym amplificado (duplicado, triplicado u octuplicado) hacia cepas carentes de pSym, se observó una tendencia gradual en el aumento de las frecuencias de transferencia con respecto a la cepa silvestre (CFNX5), que aunque con pequeñas variaciones entre las cruza 9-11 y 12-15, todas estuvieron en el orden de 10^{-6} , el aumento en las frecuencias de transferencia siempre fué muy evidente (tabla 3) y generalmente correlacionado con el grado de amplificación del pSym en la cepa donadora. Así esto puede correlacionarse, directamente, con el aumento en el número de secuencias homólogas entre los plásmidos a y d, lo que resulta como un apoyo más al mecanismo de cointegración, aunque no del todo en rechazo al de donación, propuestos para la transferencia del pSym con las funciones ayudadoras del pa, ya que la cotransferencia del pa y pSym por separado también fué observada, sin embargo no podemos saber si los plásmidos transferidos hallan pasado formando un cointegrado y resolviéndose después en la cepa receptora.

Algo que surgió de manera notoria, como ya se mencionó, fué que el grado de amplificación no se mantuvo en las transconjugantes, observándose los numerosos rearrreglos obtenidos para las transconjugantes de cada una de las cruzas con las cepas amplificadas, los cuales, según el tipo de amplificación presente en el pSym tendían a ir en aumento: menor número de rearrreglos para las duplicadas (2 tipos) y mayor número de rearrreglos para las octuplicadas (3-8 tipos). De entre los diferentes rearrreglos observados (cointegrados, desamplificaciones y deleciones), es claro que en muchos de ellos, si no en su mayoría, se presentó una tendencia a la desamplificación por deleción de fragmentos de diferentes tamaños, produciendo bacterias con plásmidos de diferentes tamaños (desde la amplificación original hasta deleciones de tamaños aproximados a la de la cepa CFNX2), pero lo más sorprendente fué observar que a pesar de ello seguían manteniendo la capacidad de soportar altas concentraciones de antibiótico (kan⁵⁰ o kan¹⁰⁰) con respecto a la CFNX5 (kan¹⁵), lo que sugiere como una posibilidad la deleción de grandes regiones del pSym, pero no del cassette GDYN, probablemente producido por una doble recombinación, tal vez sitio específica, con la deleción de un fragmento. Una segunda posibilidad es que en el momento en el que se produce la deleción se incluya dentro de este fragmento al GDYN, pero que de alguna forma esta nuevo tipo de rearrreglo halla "creado" un nuevo marco de lectura para llevar a cabo y de forma conveniente, una "nueva" vía de degradación de antibióticos lo suficientemente eficiente como para permitirle a la bacteria sobrevivir a dichas condiciones. Una tercera posibilidad, combinada con la segunda, es que la formación del cointegrado pa-pSym *per se* proporcione algún tipo de información (¿?) para así proporcionarle la resistencia necesaria para la

concentración específica del antibiótico usado, especialmente de kanamicina. Y una cuarta posibilidad es que las características de la cepa receptora junto con las adquiridas (información del pSym y/o pa) sean suficientes como para soportar en forma de transconjugante estas concentraciones de antibiótico.

Por otra parte, como pudo observarse en los diferentes perfiles de plásmidos, el hecho de conservar plásmidos (resueltos) de diferentes tamaños pudo implicar, desde el principio, un posible impedimento para llevar a cabo el efecto ayudador del pa de la bacteria donadora en la transferencia de un pSym amplificado de forma eficaz (por su gran tamaño), ya que claramente se ve la tendencia a la desamplificación hasta órdenes similares a los de la cepa silvestre (CFNX5), todo ello sugerido en base a los porcentajes obtenidos en los resultados, al menos para las cruces 9-11, ya que en las mismas cruces pero con la 2001 como receptora o donadora (12-17), con excepción de la 14-15, no tuvieron esa tendencia "orientada" a la desamplificación observada en altos porcentajes hacia tamaños similares a los de la cepa silvestre, sino a una verdadera mezcla de rearreglos, como fueron la formación de cointegrados (previamente desamplificados) con la cotransferencia del pSym también desamplificado hasta órdenes aproximados a los de la CFNX5 (tabla 2 y gráficas).

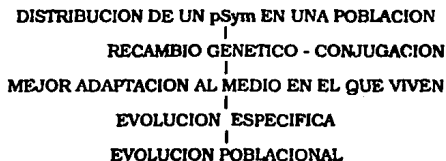
Específicamente para las cruces 15-17, las frecuencias de transferencia obtenidas no fueron las esperadas, puesto que los resultados sugieren que las donadoras sí contenían, si no todo el pa, al menos una pequeña fracción de él, ya que cuando se hizo el análisis del perfil de plásmidos para escoger a las posibles donadoras de estas cruces, no se veía ninguna diferencia con respecto a las

características buscadas; sin embargo, los resultados no mostraron la presencia del pa; por lo que, incluso, es una forma de explicar el gran número de rearreglos entre estos plásmidos. Otra posibilidad que surge es que la amplificación *per se* produzca un aumento en la frecuencia de transferencia del pSym y de rearreglos de éste plásmido que den tamaños similares al cointegrado pa-pSym, ya que pa (sólo) no se encontró (cruza 16), a diferencia de las cruzas 15 y 17 (con amplificación y pa); lo cual implica, al menos para el caso de la cruz 16, la necesidad de la presencia del pa (efecto ayudador) para dar lugar al aumento en la frecuencia de transferencia del pSym.

Finalmente, para el tercer bloque de cruzas (cruzas 18 a 20), la obtención de las frecuencias de transferencia indicaron, como era esperado, una disminución con respecto a la cepa silvestre (tabla 5), que aunque para la cruz 18 la disminución fué mínima (aproximadamente 0.4 veces), para la cruz 19 ésta fué un poco más evidente (0.8 veces menos), lo que puede ser explicado como la pérdida de una zona importante incluida en la región deletada (120 kb) de la cepa CFNX2 dando como resultado una disminución en el número de secuencias homólogas con el pa para llevar a cabo la cointegración con el pSym (región de mayor homología con el pa) y por lo tanto su posterior transferencia. Por otra parte, la frecuencia de transferencia obtenida en la cruz 20 indica que posiblemente la cepa donadora había tenido algún tipo de rearreglo y llevaba parte del pa (aunque no era evidente a simple vista) y por ello se obtuvieron frecuencias en la transferencia muy altas para este pSym deletado "rearreglado" (muy similares a las frecuencias de transferencia del pa).

CRUZAS IN PLANTA

El objetivo de estos experimentos era el de conocer si la transferencia del pSym podía llevarse a cabo bajo la influencia del pa o bien sin esta, a partir de la obtención de transconjugantes seleccionados por la propia planta (formación de nódulos), lo que fué confirmado, ya que las plantas inoculadas con cepas carentes del pa presentaron un menor número de nódulos (obtenido en porcentajes) con respecto a las plantas inoculadas con cepas que poseían el pa, lo que sugiere que la planta es un modelo favorecedor para que se lleven a cabo fenómenos conjugacionales. Lo anterior traducido a frecuencias de transferencia del pSym en presencia y ausencia del pa indica que el pSym se transfiere en la rizosfera a frecuencias mayores cuando está presente el pa (2.4×10^{-6} , en promedio), que cuando no lo está (0.26×10^{-6} , en promedio); esto nos habla de la distribución del pSym en una población dada. Con lo anteriormente señalado, puede especularse que dicha distribución y por las nuevas características presentes determinadas por el intercambio genético (a través de la conjugación) den lugar a la evolución, primero de poblaciones enteras y luego de especies:



Por otra parte, algunos datos (no mostrados) indicaban en la visualización de plásmidos a algunos pSym's de tamaños mayores al de la cepa silvestre, lo que sugiere que la transferencia *in planta* también es un sistema que es capaz de dar lugar a la formación de rearrreglos (colintegraciones) y combinaciones de plásmidos transferidos (pSym solo o con el pa).

Así, estos experimentos dan la pauta a concluir que la transferencia y rearrreglos de material genético plasmídico, en este caso del pSym y del pa, pueden llevarse a cabo en la naturaleza.

CONCLUSIONES

1. El pa ejerce un efecto ayudador para la transferencia del pSym de la cepa CFN42 DE *Rhizobium etli*.
2. El efecto ayudador del pa se ve afectado por el grado de amplificación o deleción del pSym.
3. Cuando el pSym contiene secuencias amplificadas, las frecuencias de transferencia aumentan proporcionalmente al incremento de éstas en presencia del pa.
4. Cuando el pSym contiene secuencias deletadas, las frecuencias de transferencia disminuyen en relación a la cepa silvestre aún en presencia del pa (región de alta homología entre el pa y el pSym), lo que sugiere la existencia de sitios de reconocimiento preferenciales para la acción del pa.
5. La búsqueda de transconjugantes con pSym's amplificados (resistentes a altas concentraciones de antibióticos) permiten la selección de otros eventos que confieren las características seleccionadas (rearreglos entre pa y pSym).
6. Este trabajo apoya la hipótesis del mecanismo de transferencia por cointegración, aunque no descarta totalmente el del mecanismo de donación para la transferencia

del pSym.

7. La frecuencia de transferencia del pSym también puede verse afectada por las características de la cepa receptora.

8. En plantas, la transferencia del pSym en presencia del pa se lleva a cabo con mayor frecuencia (efecto ayudador) que en ausencia de éste (medio natural), de manera homóloga que como se observó *in vitro*.

REFERENCIAS

BROM-KLANNER, S. 1988. Análisis de plásmidos simbióticos en *Rhizobium phaseoli*. Tesis para obtener el grado de doctor en Investigación Biomédica Básica. (C.I.F.N.-U.N.A.M., Cuernavaca, Morelos). 1-60.

BROM, S. A. García de los Santos, M.L. Girard, G. Dávila, R. Palacios and D. Romero. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. J. Bacteriol. 173(3):1344-1346.

BROM, S., A. García de los Santos, T. Strepkowski, M. Flores, G. Dávila and R. Palacios. 1991. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* required for optimal symbiotic performance. J. Bacteriol. 174:16. 5183-5189.

BROM, S., A. García de los Santos, M. Flores, T. Strepkowski, G. Dávila D. Romero and R. Palacios. 1993. Several *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids participate in competition for nodule formation on *Phaseolus vulgaris* roots. En: Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 600.

BROM, S., D. Romero and F. Castro. 1993. Endogenous self-transmissible *Rhizobium* plasmids promote the transfer of a symbiotic plasmid. En: Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 601.

CASTRO, C.F. 1991. Distribución de plásmidos autotransferibles en cepas de *Rhizobium* y su participación en la transferencia del plásmido simbiótico. Tesis profesional para obtener el título de Ingeniero Agrícola. Facultad de Agricultura y Ganadería. U.A.G. México. 84 pp.

CONN, E.E. and P.K. Stumpf. 1978. Bioquímica fundamental. 3a. edición. Ed. Limusa. México. 473-487.

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

EPARVIER, A. and D. Romero. 1994. Rearreglos genéticos en *Rhizobium* Será presentado al 1st European Nitrogen Fixation Conference, Szeged, Hungary, August 29th-September 2nd, 1994.

EVANS-ROTH, L. and G. Stacey. 1991. *Rhizobium* legume symbiosis. En: Microbial cell-cell interactions. Martin Dworkin (ed.). American Society for Microbiology, Washington, DC. 255-291.

FAHRAEUS, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. J. Gen. Microbiol. 16:374-381.

FLORES, M. S. Brom, T. Strepkoski, M.L. Girard, G. Dávila, D. Romero and R. Palacios. 1993. *In vivo* cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 61.

GRIFFITH, F. 1928. The significance of pneumococcal types. J. Hyg. (London). 27: 113-159.

IPPEN-IHLER, K. and S. Maneewannakul. 1991. Conjugation among enteric bacteria: mating systems dependent on expression of pili. En: Microbial cell-cell interactions. Martin Dworkin (ed.). American Society for Microbiology, Washington, DC. 35-69.

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

MARTINEZ, E., D. Romero and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. Critical Reviews in Plant Science. 9(11):59-93.

PALACIOS, R., S. Brom, G. Dávila, M. Flores, M.L. Girard, D. Romero and T. Strepkowski. 1993. Gene amplification in *Rhizobium*. En: Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 581-585.

PORTER, R.D. 1991. Conjugation. En: Modern microbial Genetics. Wiley-Liss, Inc. 157-189.

QUINTO, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón & R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature. 299(588):724-726.

QUINTO, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M.A. Ceballos, M.A. Pardo, R. Azpiroz, M.L. Girard, E. Calva, and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 1170-1174.

RODRIGUEZ, C. and D. Romero. 1993. Rearrangements in the symbiotic plasmid: a common characteristic among isolates of *Rhizobium leguminosarum phaseoli*. En: Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 849.

ROMERO, D., P.W. Singleton, L. Segovia, E. Morett, B.B. Bohlool, R. Palacios y G. Dávila. 1988. Effect of Naturally Occurring *nif* reiterations on Symbiotic Effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. Applied and Environmental Microbiology 54(3): 848-850.

ROMERO-CAMARENA, D.R. 1991. Mecanismos moleculares involucrados en la dinámica de familias reiteradas de DNA en el genoma de *Rhizobium phaseolus* tesis para obtener el grado de Doctor en I.B.B. C.I.F.N. UACPyP del CCH. U.N.A.M. México.1-23.

ROMERO, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M.L. Girad, R. Palacios and G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. 173(8): 2435-2441.

ROMERO, D. 1993. A Genomic Rearrangement that generates a self-transmissible symbiotic plasmid in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. En: Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer academic Publishers, The Netherlands. pp 647.

ROSENBERG, C. and T. Hugnet. 1984. The pATC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. Mol. Gen. Genet. 196:533-536.

SCOTT, K.F., J.E. Hughes, P.M. Gresshoff, J.E. Beringer, B.G. Rolfe and J. Shine. 1982. Molecular cloning of *Rhizobium trifolii* genes involved in symbiotic nitrogen fixation. J. Mol. Appl. Gen. 1:315-326.

SEGOVIA, L., J.P.W. Young and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassificación of american *Rhizobium leguminosarum* phaseoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. nov. International, Journal of Systematic Bacteriology. 43:3. 374-377.

SOBERON-CHAVEZ, G. R. Nájera, H. Olvera and L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. J. Bacteriol. 167:487.

SPRENT, J.I. and P. Sprent. 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Hall. Great Britain at the University Press, Cambridge. 256 pp.

STREIPS, U.N. 1991. Transformation. En: Modern microbial Genetics. Wiley-Liss, Inc. 191-216.

STEPKOWSKI, T., M. Flores, S. Brom, D. Romero and R. Palacios. 1993. Amplification and deletion events in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843. En: Palacios, R., J. Mora y W.E. Newton (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer academic Publishers, The Netherlands. pp. 654.

WHEATCROFT, et al. 1990. Mol. Plant Microbe Inter. 3(1):9-17.

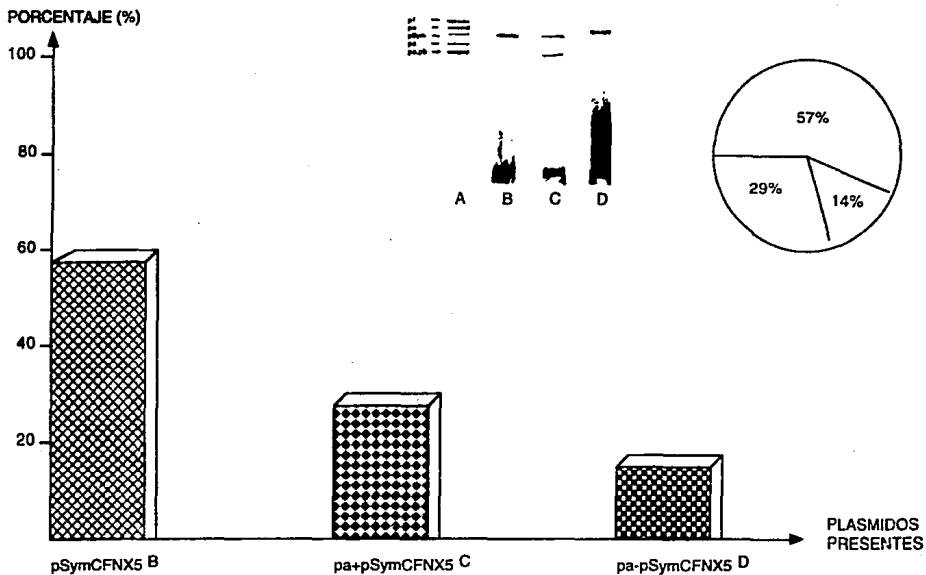


Fig. 10. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruce CFNX5 X GMI9023 A. CFNX5. B. GMI9023/pdCFNX5. C. GMI9023/pa+pdCFNX5 (separados). D. GMI9023/pa-pdCFNX5 (formando cointegrados). Los subíndices corresponden a las bandas obtenidas en el gel para la visualización de plásmidos.

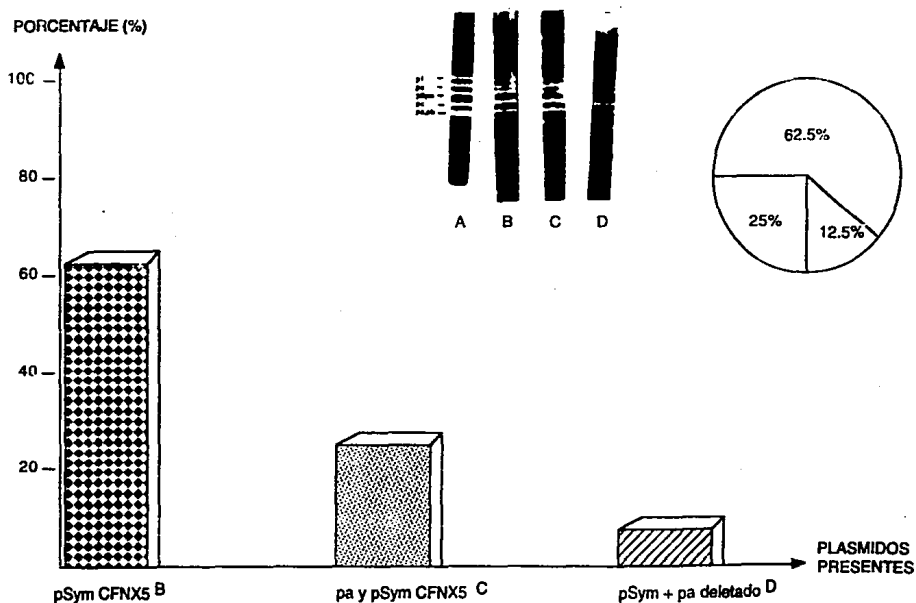


Fig. 11. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruz *CFNX5X2001*. A. *CFNX5*. B. y C. *2001/pdCFNX5*. D. *2001/paΔ + pdCFNX5* (separados). Los subíndices corresponden a las bandas obtenidas en el gel para la visualización de plásmidos.

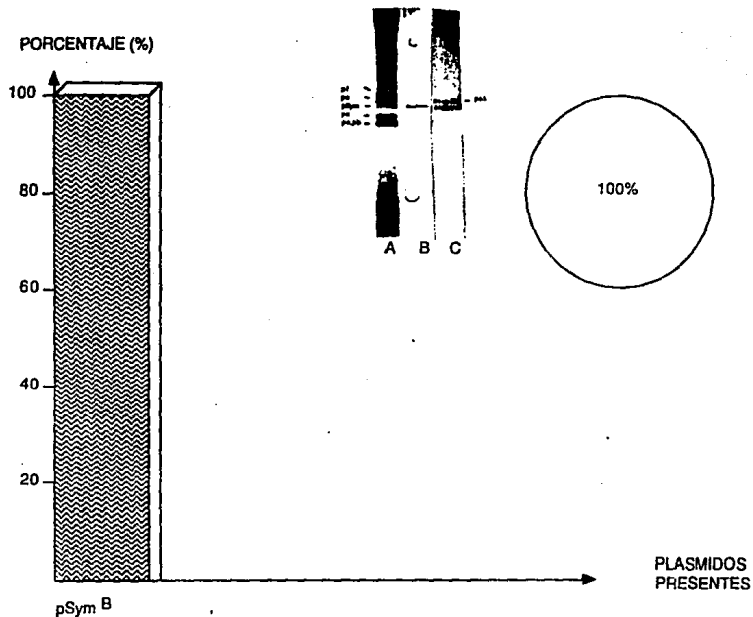


Fig. 12. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruce CFNX5 X 3-53. A. CFNX5. B. 3-53/pdCFNX5. C. 3-53. El subíndice corresponde al gel con la banda obtenida para la visualización de plásmidos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

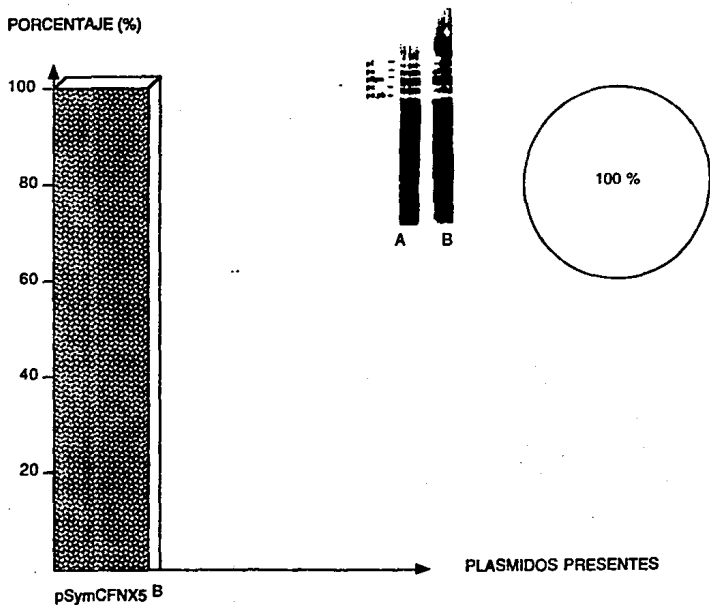


Fig. 13. Gráfica de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruce CFNX5XCE-3. A. CFNX5. B.CE-3/pdCFNX5. El subíndice corresponde al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

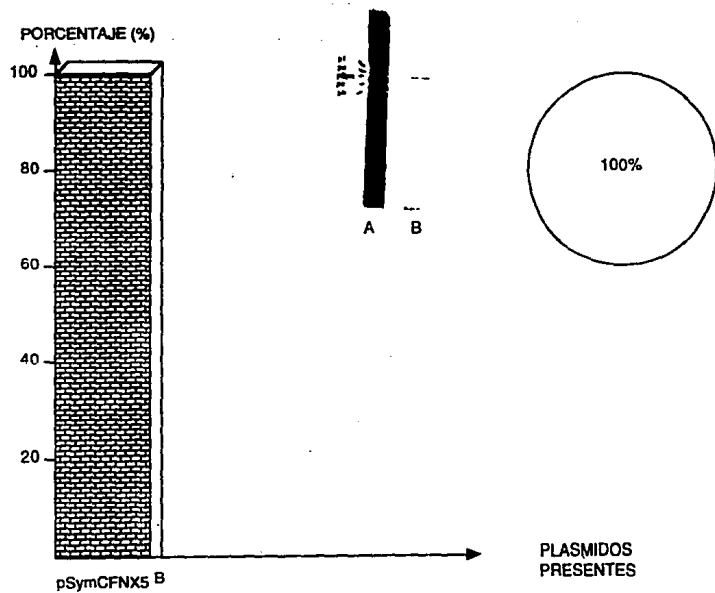


Fig. 14. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transjugantes de la cruce 2001/pdCFNX5 X GMI9023. A. 2001/pdCFNX5. B. GMI9023/pdCFNX5. Los subíndices corresponden a las bandas obtenidas en el gel para la visualización de plásmidos.

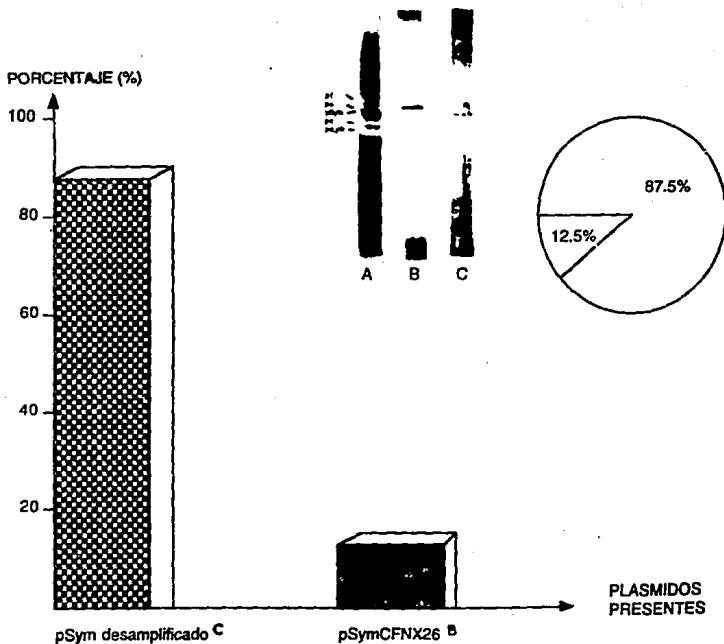


Fig. 15. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes para las transconjugantes de la cruz CFNX26XGMI9023. A. CFNX26 B. GMI9023/pdCFNX26. C. GMI9023/pdCFNX26 desamplificado. Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenida para la visualización de plásmidos.

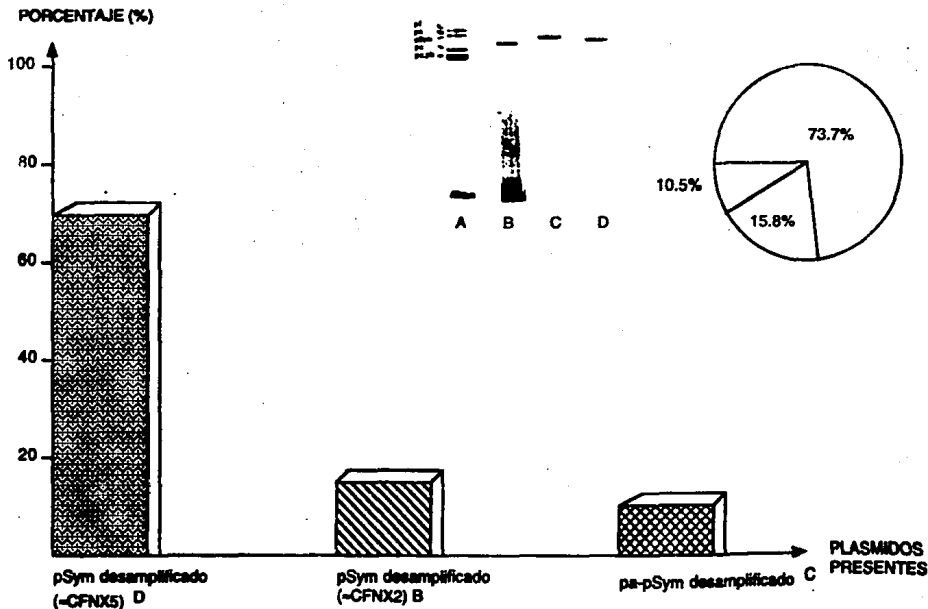


FIG. 16. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruz CFNX28XGM9023. A. CFNX28. B. GM9023/pdCFNX28 desamplificado (-CFNX2). C. GM9023/pa-pdCFNX28 desamplificado (-CFNX5) o pSym desamplificado (-CFNX28). D. GM9023/pdCFNX28 desamplificado (-CFNX5). Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

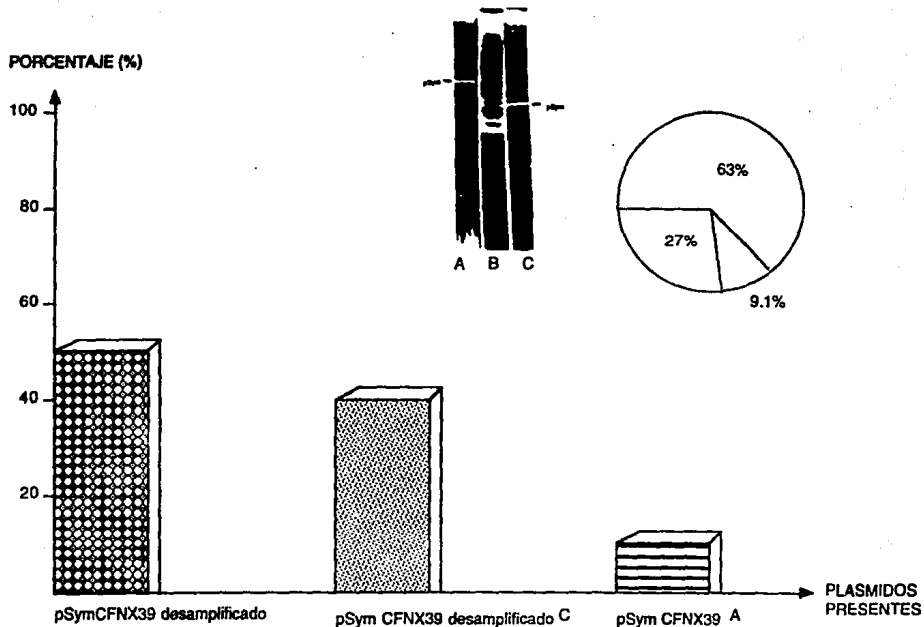


FIG. 17. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes para las transconjugantes de la cruce CFNX39XGMI9023. A. GMI9023/pdCFNX39. B. CFNX39. C. GMI9023/pdCFNX39 desamplificado (=CFNX26). Los subíndices corresponden al gel las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos

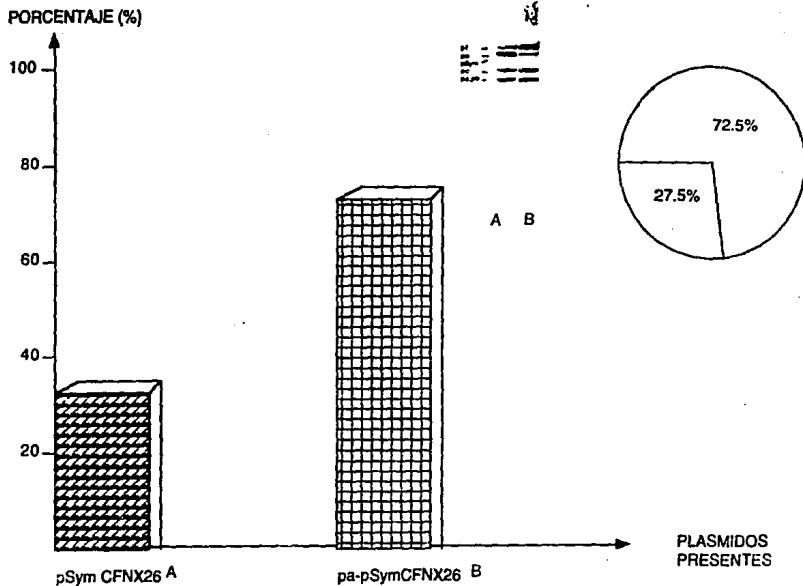


FIG. 18. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes para las transconjugantes de la cruce CFNX26X2001. A. 2001/prCFNX2 B.2001/pa - pdCFNX26. Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

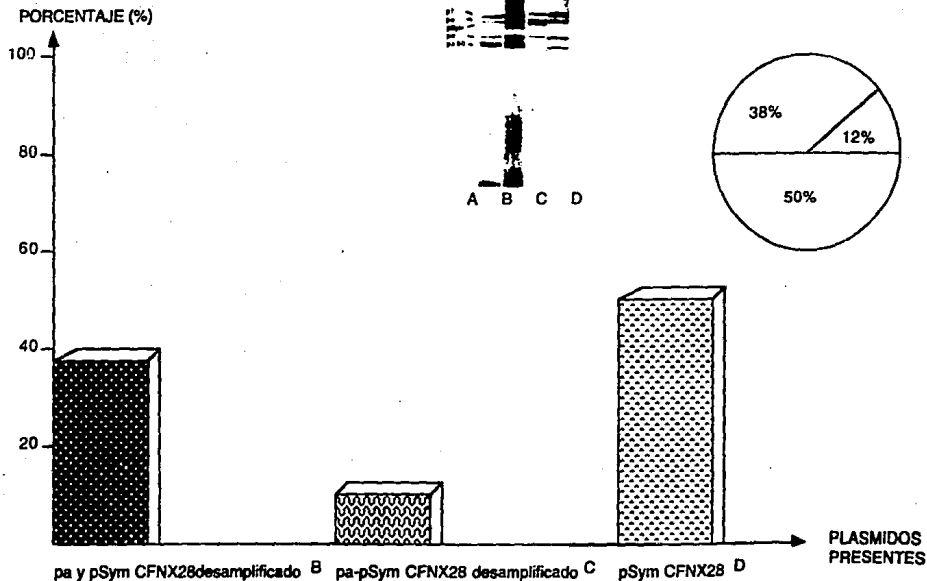


Fig. 19. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes para las transconjugantes de la cruce CFNX28x2001. A. CFNX28. B. 2001/pa + pdCFNX28 desamplificado (-CFNX5). C. 2001/pa-pdCFNX28 desamplificado (-CFNX26) o pSymCFNX28 desamplificado (-CFNX26) . D. 2001/pdCFNX28. Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

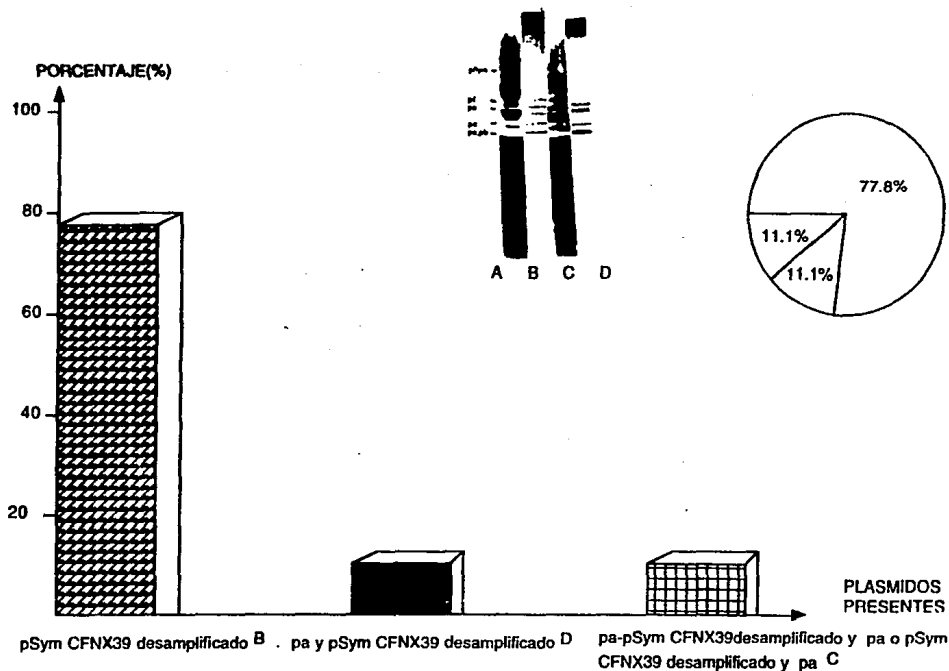


Fig. 20. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruce CFNX39X2001. A. CFNX39. B. 2001/pdCFNX39 desamplificado (-CFNX5). C y D. 2001/pa + pdCFNX39 desamplificado (-CFNX5). Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

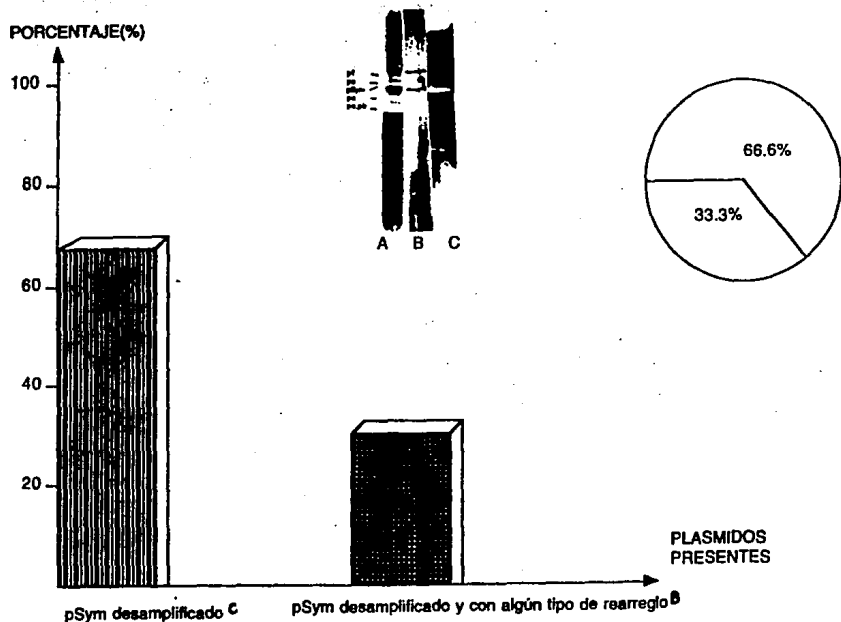


FIG. 21. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruce 2001/pdX26XGMI9023 A. CFNX26. B C.GMI9023/pdCFNX26 desamplificado (~CFNX5). Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

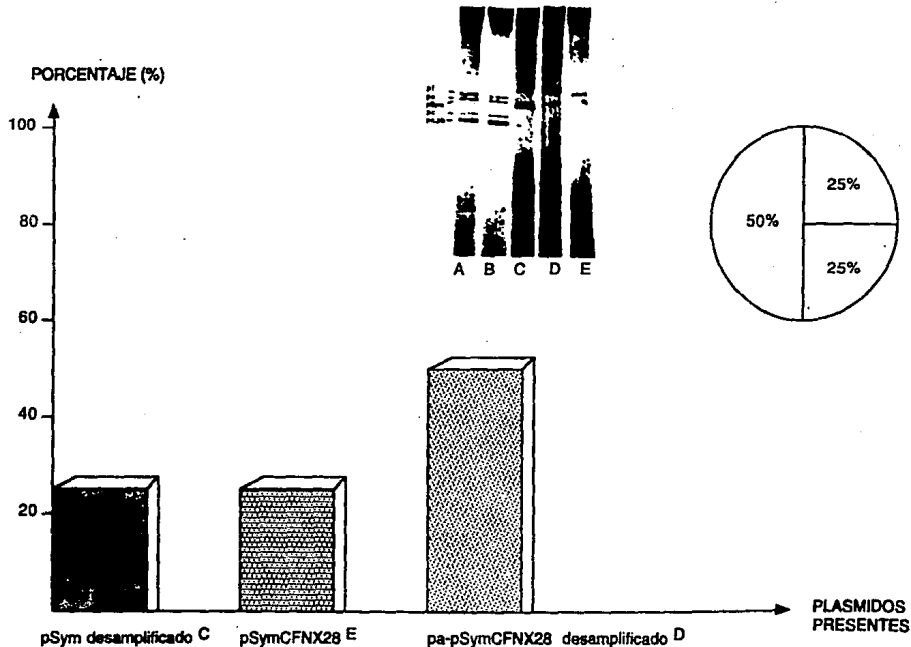


Fig. 22. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruz 2001/pdX28XGM19023 A. y B.CFNX28. C. GM19023/pdCFNX28 desamplificado (-CFNX5) sin pa. D. GM19023/pa-pdCFNX28 + pdCFNX26. E. GM19023/pdCFNX28 desamplificado (-CFNX26) o CFNX28. Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

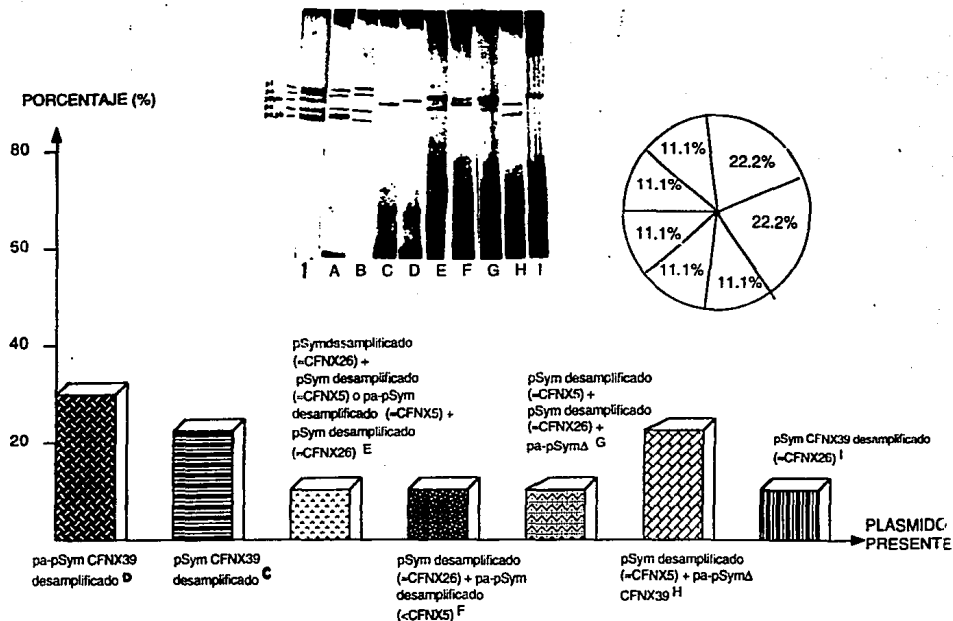


Fig. 23. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruz 2001/pdX39XGMI9023. A. CFNX39. B. 2001. C. GMI9023/pdCFNX39 desamplificado (=CFNX5). D. GMI9023/pa-pdCFNX39 desamplificado (=CFNX5) o pdCFNX39 desamplificado (=CFNX26). E. Donación de pd desamplificado (=CFNX2) y pd desamplificado (=CFNX5) + pa o =CFNX26 o CFNX28. F. GMI9023/pdCFNX39 desamplificado (=CFNX26) + pa-pdCFNX39 desamplificado (=CFNX5). G. GMI9023/pdCFNX39 desamplificado (=CFNX5) + pd=CFNX26 + pa pdCFNX39Δ. H. GMI9023/pdCFNX39 desamplificado (=CFNX5) + pa-pdCFNX39 desamplificado. I. GMI9023/pdCFNX39 desamplificado (=CFNX26). Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos. 1. CFNX5.

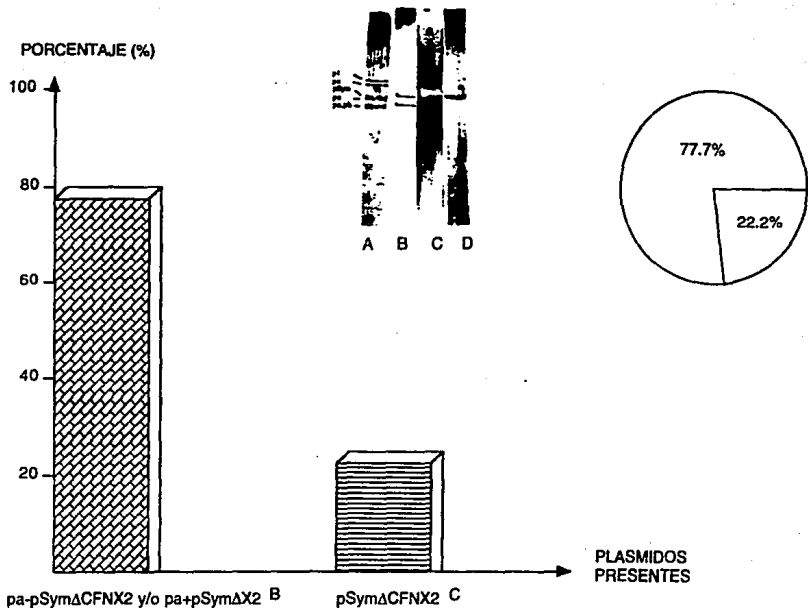


Fig. 24. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de las cruces CFNX2XGMI9023 A. CFNX2. B. GMI9023/pa + pdCFNX2. C. GMI9023/pa-pdCFNX2 (formando cointegrado). D. GMI9023/pdΔCFNX2. Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

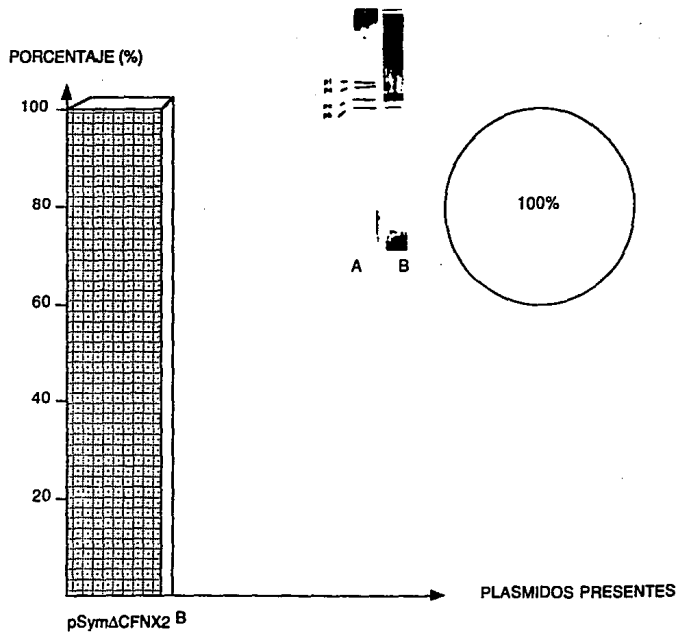


Fig. 25. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruce CFNX2X2001 A. 2001. B.2001/pdCFNX2. Los subíndices corresponden al gel con las bandas obtenidas para la visualización de plásmidos.

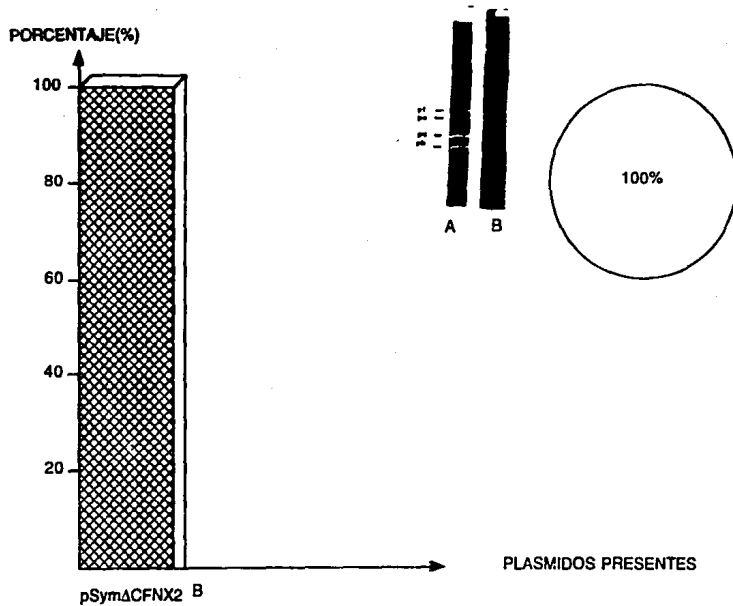


Fig. 26. Gráfica de porcentajes de plásmidos presentes en las transconjugantes de la cruz 2001/pdΔX2XGMI9023. A. 2001. B. GM19023/pdCFNX2. El subíndice corresponde al gel con la banda obtenida para la visualización de plásmidos.