



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización genómica parcial de *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica*”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I Ó L O G A**

P R E S E N T A :

**Tecilli Cabellos Avelar**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

Director de Tesis: Dr. Jesús Caballero Mellado

2004



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Caracterización genómica parcial de Burkholderia unamae  
y Burkholderia tropica"

realizado por Cabellos Avelar Tecilli

con número de cuenta 9502210-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jesús Caballero Mellado

Propietario Dr. Ismael Hernández Lucas

Propietario Dra. Gloria Soberón Chávez

Suplente Dr. Victor Manuel Valdés López

Suplente M. en C. Fernando Hernández Sánchez

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

Un proceso que está generando un enorme cambio...Algo que alberga a un organismo que se convertirá en un ser diferente...Una metamorfosis...

Makau.

Nada ha sido, nada será; todo es, todo vive y pertenece al presente.

Siddhartha. Hermann Hesse

Podemos entendernos unos a otros, pero comprendernos, sólo cada uno lo puede hacer consigo mismo.

Demian. Hermann Hesse.

## **Agradecimientos**

Antes que nada a la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas de esta gran Institución.

Al Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, U.N.A.M., por el apoyo económico que recibí mientras realizaba este trabajo.

Al Dr. Jesús Caballero Mellado por la oportunidad de trabajar en su línea de investigación.

A los revisores de esta tesis.

A todas y todos los compañeros y algunos amigos del laboratorio de Ecología Molecular y Microbiana del C.I.F.N., U.N.A.M.

## **Dedicatoria**

A la memoria de mi abuela María Guadalupe Leyva Maldonado, que siempre esta en mi corazón.

A mi abuelo Pablo Avelar Hernández, por su sabiduría.

A mi mamá María Francisca Avelar Leyva, por su incondicionalidad y tolerancia.

A mi hermana Anali Cabellos Avelar, por existir y compartir conmigo la vida.

A mi papá Angel Cabellos Quiróz, por la lección de vida.

A toda mi familia que radica en Calpulalpan, Tlaxcala. A mis tías Marcela, Angelina, Lucía, a mis tíos Sebastián y Pablo. A mis primas Estrella, Sandra, Marlene, Anabel, Anel, a mis primos Pablo, Sebastián, Azeem, Alfredo, Manuel Omar, para que nada los detenga en la vida.

A Alfonso Reyes Lugo, por la paciencia y compañía durante esta aventura y por los consejos que me ha dado.

A todos mis compañeros de escuela, a mis amigas y amigos que han estado presentes en los diferentes momentos de mi vida, a los que deje de frecuentar y a los que sigo viendo.

A todos mis maestros por enseñarme el camino hacia la Ciencia.

## Índice

Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
Objetivos.....	13
Material y Métodos.....	14
Resultados.....	22
Discusión.....	55
Conclusión.....	60
Literatura citada.....	62



## Resumen

Con base en los criterios de taxonomía bacteriana establecidos, fueron descritas recientemente dos nuevas especies fijadoras de nitrógeno del género *Burkholderia*, *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica*. Con objeto de ampliar la caracterización genómica de *B. unamae* y *B. tropica* se utilizó al gene *recA* para establecer sus relaciones filogenéticas con otras especies diazotróficas del género *Burkholderia*. En este estudio se logró un acercamiento al conocimiento sobre la estructura genómica de estas nuevas especies fijadoras de nitrógeno y se buscaron marcadores moleculares (genes *cbIA*, *esmR* e *IS1363*) asociados a la patogenicidad de las cepas epidémicas de *B. cenocepacia*.

Los resultados indican que el gene *recA* puede ser utilizado como una estrategia mas, junto con el gen 16S rRNA, para la identificación, diferenciación y agrupación de aislados diazotróficos pertenecientes al género *Burkholderia*.

El genoma de *B. unamae* varía de 3-4 Mb en tanto que el genoma de *B. tropica* es mayor a los 4 Mb. *B. unamae* como *B. tropica* contienen al menos 2 replicones en los cuales aparentemente se encuentran localizados los genes 16S rRNA, en *B. unamae* en los replicones de 1300 kb y 630 kb y en *B. tropica* en los replicones de 1800 kb y 1700 kb, lo que sugiere que estos replicones corresponden a cromosomas. Los genes *nifHDK* en *B. unamae* parecen estar localizados en los replicones de 1300 kb, 1200 kb, 700 kb y 550 kb y en *B. tropica* en los replicones de menor tamaño (entre 630 kb y 130 kb). No obstante, la ubicación precisa de los genes *nifHDK* y genes *recA* debe ser confirmada por medio de otras metodologías.

Los marcadores moleculares *cbIA*, *esmR* e *IS1363*, relacionados con la virulencia de *B. cenocepacia*, no fueron encontrados en las cepas de *B. unamae* ni de *B. tropica* analizadas, lo cual sugiere la posibilidad de usar a estas especies en procesos agrobiotecnológicos.

## Introducción

---

La investigación sobre la diversidad de los microorganismos se ha incrementado en los últimos años. Este incremento se debe, por un lado, a que la biodiversidad microbiana es un recurso biotecnológico importante para el humano (Alkorta *et al.* 2003; Morris *et al.* 2002), y por otro, a que la metodología moderna de la biología molecular ha abierto una nueva era en la sistemática y taxonomía de los microorganismos (Bohannan y Hughes, 2003). El inventario actual de las especies bacterianas es incompleto, existiendo diversas opiniones acerca del conocimiento que se tiene sobre la biodiversidad. En algunos reportes se estima en 5,000 las especies bacterianas conocidas (Amann *et al.* 1994) y en otras se indica que se conocen solamente alrededor del uno por ciento del total de las especies de bacterias existentes (Torsvik *et al.* 1992). Lo antes referido refleja lo incompleto del inventario de las especies bacterianas, como las que se asocian con plantas y animales.

De las especies microbianas se sabe que solo una pequeña fracción causa enfermedades a organismos superiores como al humano o animales, y en la mayoría de los casos estos microorganismos están restringidos a crecer en y dentro de sus hospederos.

Para poder identificar, clasificar, nombrar y establecer las relaciones evolutivas de las especies microbianas y conocer sobre su biodiversidad, se ha utilizado como estrategia a la taxonomía polifásica, la cual requiere información fenotípica, genética y filogenética (Vandamme *et al.* 1996). Para la caracterización genética y filogenética se emplean técnicas de biología molecular, como la comparación de secuencias específicas de genes conservados en secuencia, estructura y función a través de la evolución, como por ejemplo el gen 16S rRNA (Pace, 1996; 1997) o el gen *recA* (Eisen, 1995). El gen 16S rRNA permite inferir las relaciones filogenéticas entre organismos cercanos y distantes. En la actualidad este gen es utilizado ampliamente por ser altamente conservado, por presentar regiones variables en la secuencia, por ser fácil de clonar y secuenciar aún de organismos no cultivados y de que existe una gran base de datos que contiene miles de secuencias de este gen (Eisen 1995). El

gene *recA* en cambio, promueve y participa en funciones celulares como en la recombinación homóloga (intercambio de regiones de ADN), en la reparación del ADN (tiene actividad co-proteasa en respuesta SOS al daño al ADN), e inducción de profágos (Eisen, 1995; Karlin y Brocchieri, 1996; Karlin *et al.* 1995).

Así, desde el punto de vista biotecnológico, el conocimiento de la biodiversidad es el punto de inicio para el descubrimiento de fenómenos biológicos explotables, por ejemplo, en el área de la producción de antibióticos y otros medicamentos, o en el uso de los microorganismos en la agricultura (Bull *et al.* 1992). Los ejemplos más estudiados ampliamente, dada su importancia para la agricultura, son las relaciones planta-bacteria, ya que la rizosfera (zona del suelo bajo la influencia de las raíces), el rizoplano (superficie de las raíces) y el interior de las plantas o ambiente endófito son hábitats favorables para la vida microbiana. Algunas de las relaciones planta-bacterias rizosféricas son benéficas para el crecimiento vegetal (Bloemberg y Lugtenberg 2001; Glick *et al.* 2003; Malik *et al.* 1997; Paredes-Cardona *et al.* 1988; People *et al.* 1995). Entre los mecanismos que favorecen el crecimiento de las plantas se encuentra la fijación biológica de nitrógeno (FBN), el control de fitopatógenos (Glick *et al.* 1997; Lugtenberg *et al.* 2002; O'Sullivan y O'Gara, 1992) y la actividad de las fitohormonas (Boddey y Dobereiner, 1995; Caballero-Mellado *et al.* 1992; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Dobbelaere *et al.* 2001; Okon y Labandera, 1994).

El descubrimiento de las bacterias endófitas ha despertado gran interés debido a que entre éstas se encuentran algunas que son capaces de fijar  $N_2$  y de producir fitohormonas (Fuentes-Ramírez *et al.* 1993; Kirchhof *et al.* 1997; Reinhold-Hurek y Hurek 1998; Verma *et al.* 2001). La existencia endófitas de algunos diazótrofos no indica que la FBN o alguna otra actividad bacteriana se lleve a cabo en los tejidos internos de las plantas. Esta situación podría conducir a la sustitución, al menos parcial, de los fertilizantes minerales, reduciéndose de esta manera los costos de producción de alimentos, así como los problemas que acompañan su uso, por ejemplo, la contaminación de los mantos freáticos y de los cuerpos de agua (Mulder *et al.* 1977; Roy *et al.* 2002; Sainju *et al.* 2003), o la inhibición de las poblaciones de especies fijadoras de  $N_2$  (Kolb y Martin, 1988; Tan *et al.* 2003) como

*Glucanacetobacter diazotrophicus* y de los rizobias nodulantes del frijol (Caballero-Mellado y Martínez-Romero, 1999; Dos Reis Junior *et al.* 2000; Fuentes-Ramírez *et al.* 1999).

La FBN es el proceso enzimático que llevan a cabo ciertas eubacterias y arqueas para reducir el  $N_2$  a amonio. El amonio es incorporado al protoplasma celular de las plantas, formando parte de los aminoácidos, de los ácidos nucleicos y de otras moléculas. El complejo enzimático que regula la reducción del  $N_2$  a amonio es la nitrogenasa, codificada por los genes *nifHDK*. El *nifH* conforma el componente I y el gene *nifDK* al componente II (Martínez-Romero y Phillips, 2000). Así, los microorganismos son esenciales para garantizar que las diferentes fases de los ciclos biogeoquímicos, como la FBN, se lleven a cabo (Barea, 1998).

## Antecedentes

---

En las últimas cuatro décadas, a nivel mundial, la mitad de los incrementos logrados en los cultivos de interés agrícola han sido obtenidos con la aplicación de fertilizantes nitrogenados debido a lo escaso de este nutriente en los suelos agrícolas (Graham *et al.* 1988) y a la alta demanda requerida por los cultivos. Diversas estrategias se han propuesto para extender la fijación biológica de N<sub>2</sub> hacia los cereales (Boddey y Dobereiner 1995; Christiansen-Weniger 1998; Dixon *et al.* 1997), sin embargo, para su aplicación se requiere de estudios a muy largo plazo. Una de las estrategias que presenta mejores posibilidades para ser aplicadas, al menos a corto plazo, es el uso de los diazótrofos asociados naturalmente con las plantas.

El desarrollo de la fijación de N<sub>2</sub> en cultivos diferentes a las leguminosas podría ser considerado, por un lado, de alto valor económico ya que los costos de la fertilización son muy elevados, y por otro, de gran beneficio para el ser humano debido a los problemas de contaminación ambiental que causa el uso de éstos (Mulder *et al.* 1977; Roy *et al.* 2002; Sainju *et al.* 2003).

Exceptuando algunas especies bacterianas que se han aislado de la rizosfera del maíz (Boddey y Dobereiner, 1988; Caballero-Mellado y Valdés, 1983; Di Cello *et al.* 1997), así como de los tejidos internos de esta planta (McInroy y Kloepper, 1995; Palus *et al.* 1996), el conocimiento sobre la microflora asociada al maíz es muy escaso y prácticamente nulo el conocimiento de las especies fijadoras de N<sub>2</sub> endófitas del maíz. El análisis de las poblaciones fijadoras de nitrógeno asociadas al maíz y al cafeto, mediante estrategias de taxonomía clásica y molecular, revelaron que en la rizosfera, rizoplano y en los tejidos internos de las plantas, la presencia de *Burkholderia vietnamiensis* así como de nuevas especies pertenecientes a este género (Estrada-de los Santos *et al.* 2001). *B. vietnamiensis* fue considerada durante muchos años como la única especie fijadora de nitrógeno en este género (Gillis *et al.* 1995) y solo recientemente *B. kururiensis* fue identificada como especie diazótropa (Estrada-de los Santos *et al.* 2001).

Los análisis recientes de los grupos nuevos de aislados fijadores de nitrógeno recobrados de caña de azúcar, de maíz, de teocintle y de cafeto condujeron a la propuesta de *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado *et al.* en prensa) y de *Burkholderia tropica* (Reis *et al.* en prensa) como nuevas especies. Tanto la especie *B. unamae* como la especie *B. tropica* están constituidas por 4 diferentes genotipos ARDRA (Análisis de patrones de restricción de ADN ribosomal amplificado). Los genotipos de *B. unamae* son los denominados 13, 14 y 15, identificados originalmente por Estrada-de los Santos *et al.* (2001) y el genotipo mas reciente, 15a, descrito por Caballero-Mellado *et al.* (en prensa). Los primeros genotipos indentificados de *B. tropica* fueron los designados como 16, 17 y 19 (Estrada-de los Santos *et al.* 2001) y posteriormente fue descrito el genotipo 19a (Reis *et al.* en prensa).

El género *Burkholderia* fue removido del género *Pseudomonas* sobre la base de estudio de taxonomía molecular como la hibridación ADN-ADN y por comparación de secuencias del gen ribosomal 16S (Yabuuchi *et al.* 1992). Este género pertenece a la subclase beta de las proteobacterias (Stackebrandt *et al.* 1988) y se encuentra constituido actualmente por alrededor de 30 especies (Coenye y Vandamme, 2003) con *B. cepacia* como la especie tipo del género (Yabuuchi *et al.* 1992). Un árbol filogenético basado en la secuencias del gen 16S rRNA muestra las relaciones entre las especies del género *Burkholderia* (Figura 1).

El género *Burkholderia* incluye especies del suelo y de la rizosfera así como patógenos de plantas, animales y del hombre (Achouak *et al.* 1999; Tabacchioni *et al.* 1993; Vandamme *et al.* 1997; Viallard *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2000). La capacidad de *B. phymatum* y *B. tuberum* de nodular plantas leguminosas ha sido reconocida recientemente (Vandamme *et al.* 2002b). Aún mas recientemente, *B. caribensis* y *Ralstonia taiwanensis* (otra beta proteobacteria cercana filogenéticamente a *Burkholderia*) fueron identificadas como nodulantes de la leguminosa *Mimosa pudica* (Chen *et al.* 2003). Estos hallazgos confirman la amplia distribución geográfica y entre hospederos de las especies del género *Burkholderia*.

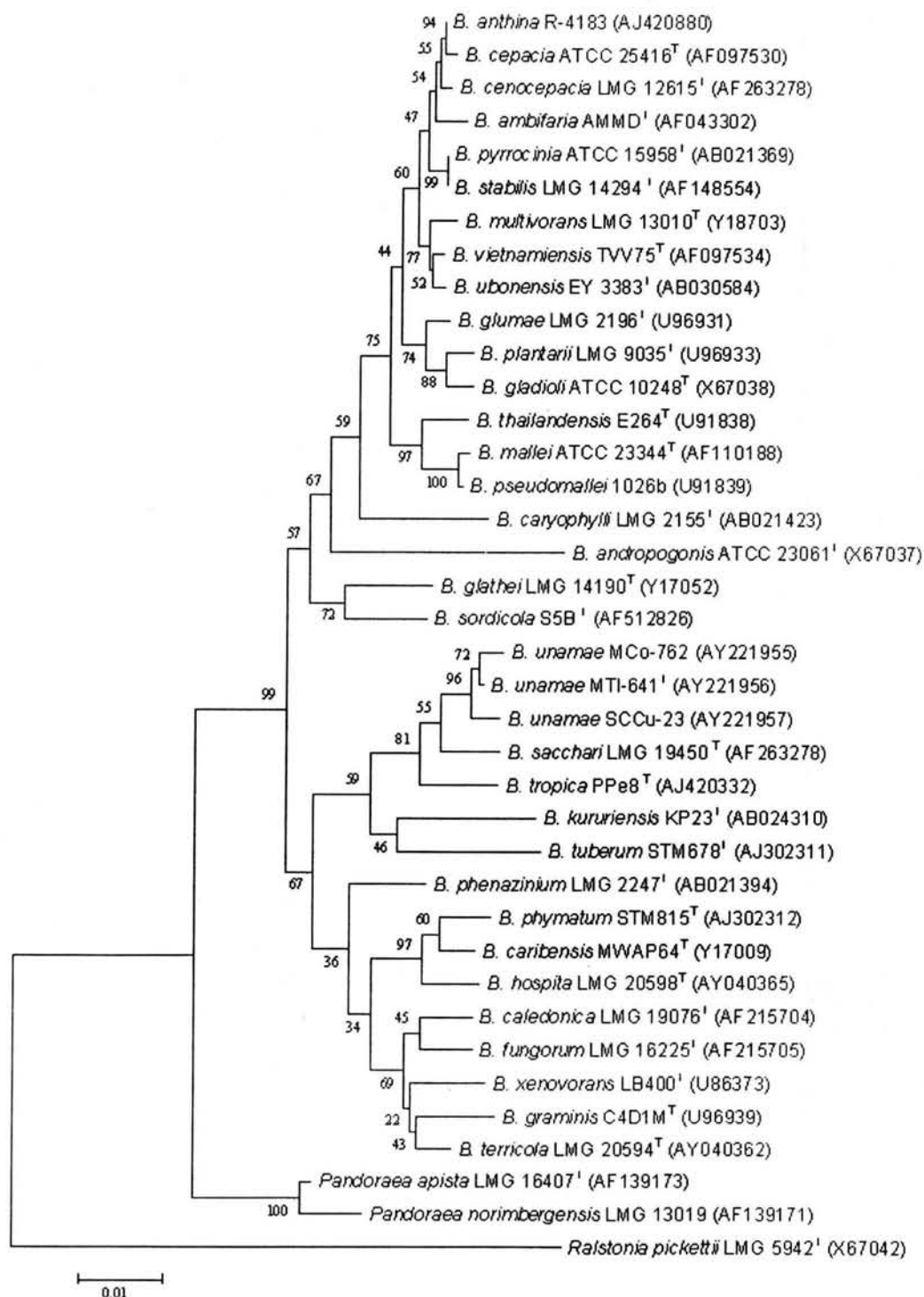


Figura 1. Árbol filogenético de las especies del género *Burkholderia* basado en la comparación de 1331 sitios de la secuencia del gen 16S rRNA. Entre paréntesis se indica en número de acceso en el GenBank. (<sup>T</sup>) cepa tipo de la especie. Tomado de Caballero-Mellado, *et al.* (en prensa).

Con una amplia distribución en el ambiente natural y clínico se encuentran los miembros del llamado complejo *B. cepacia*, constituido hasta hace muy poco tiempo por 9 genomovares o especies genómicas en razón a sus características fenotípicas muy similares pero genómicamente diferentes. Los 9 genomovares han sido redefinidos actualmente como 9 especies sobre la base de características fenotípicas diferenciables. En la Tabla 1 se muestran las especies que constituyen el complejo *B. cepacia*.

Tabla 1. Complejo *Burkholderia cepacia*.

<i>B. cepacia</i>		
Genomovar	Nombre de la especie	Referencia
I	<i>Burkholderia cepacia</i>	Vandamme <i>et al.</i> (1997).
II	<i>Burkholderia multivorans</i>	Vandamme <i>et al.</i> (1997).
III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Vandamme <i>et al.</i> (1997; 2003).
IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	Vandamme <i>et al.</i> (1997; 2000).
V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Gillis <i>et al.</i> (1995); Vandamme <i>et al.</i> (1997).
VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	Coenye <i>et al.</i> (2001a); Vermis <i>et al.</i> (2003).
VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Coenye <i>et al.</i> (2001b).
VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	Vandamme <i>et al.</i> (2002a).
IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Vandamme <i>et al.</i> (2002a).

Entre las especies del complejo, *B. cepacia* (antes *Pseudomonas cepacia*) ha despertado gran interés debido a su amplia distribución en ambientes naturales y hospitalarios (Holmes *et al.* 1998; Segonds *et al.* 1999; Vandamme *et al.* 1997). *B. cepacia*, originalmente descrita como patógeno de la cebolla (Burkholder, 1950), se encuentra comúnmente en el suelo, en el agua y en las superficies de las plantas (Woods, D.E y P. A. Sokol, 2000) pero también como contaminante de soluciones empleadas en prácticas hospitalarias (Bevivino *et al.* 1994).

*B. cepacia* es reconocida por su gran versatilidad metabólica para usar fuentes de carbono poco comunes y por degradar compuestos xenobióticos diversos entre los que destacan los pesticidas (Daubaras *et al.* 1996; Lu *et al.* 2003; Peñaloza-Vázquez *et al.* 1995), e hidrocarburos complejos (Kang *et al.* 2003; Krumme *et al.* 1993; Lessie y Gaffney, 1986; Reardon *et al.* 2002). *B. cepacia* es conocida también como agente de control de fitopatógenos (Bevivino *et al.* 1994; McLoughlin *et al.* 1992; O'Sullivan *et al.* 1992; Thomashow *et al.* 1990), por su capacidad para promover el crecimiento del



maíz (Bevivino *et al.* 1998; Bevivino *et al.* 2000) e incrementar el rendimiento de diversos cultivos (Chiarini *et al.* 1998; Tabacchioni *et al.* 1993). *B. vietnamiensis*, aislada por primera vez de la rizosfera del arroz y miembro actual del complejo *B. cepacia*, también se reconoce por su capacidad de promover significativamente el crecimiento de las plantas y la producción de arroz (Trân Van *et al.* 1994; Trân Van *et al.* 2000).

Las capacidades de *B. cepacia* y *B. vietnamiensis* descritas anteriormente representan desde el punto de vista biotecnológico características sobresalientes para ser usadas con fines agronómicos. No obstante, el uso de ambas especies en aplicaciones agrícolas ha sido cuestionado (Holmes *et al.* 1998; Vidaver *et al.* 1999) debido a que tanto *B. cepacia* como *B. vietnamiensis* y otras especies incluidas en el complejo *B. cepacia* (Vandamme *et al.* 1997), particularmente *B. cenocepacia* (antes denominado genomovar III), han sido aisladas de pacientes con fibrosis quística y de otras infecciones hospitalarias (Vandamme *et al.* 1997).

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva mortal que origina un trastorno multisistémico, que afecta a diversos tejidos con secreción epitelial glandular exócrina (sudoríparas, salivales, hepáticas, del aparato respiratorio, del intestino y del páncreas) produciendo secreciones anómalas y espesas que originan su obstrucción (Rosenstein *et al.* 1998). La FQ es causada por mutaciones en el gen que codifica un conducto o canal de cloruro, llamado regulador de la conductancia de transmembrana de la FQ, con sus siglas en inglés CFTR (Orenstein *et al.* 2000).

La incidencia de casos de FQ en el mundo se ha estimado en: 1 en 2000 a 3000 nacidos vivos en la población blanca; 1 en 17000 en la población negra; 1 en 12000 en la población indu; 1 en 90000 en la población oriental; 1 en 80000 en población estadounidense nativa y en Arabia 1 en 5800 (Fitz, 1993; Kosorok *et al.* 1995; 1996; Hamosh *et al.* 1998; Macri, 1997). En México no se conoce con certeza la incidencia de esta patología, esto en gran parte por el desconocimiento de la enfermedad por el personal de salud. La Asociación Mexicana de Fibrosis Quística tiene el registro de 351 casos entre 1980 y 1991 (Lezana *et al.* 1994; López *et al.* 1980). Mercado (2001) registra 301 casos de FQ entre 1993 y 1997, y Segovia

(2002) registra 48 casos de FQ solo en el hospital "La Raza" del Distrito Federal, México.

En los pacientes con FQ, la eliminación inadecuada de secreciones predispone a los pacientes a la obstrucción de los conductos por secreciones espesas que se adhieren a las paredes de las vías respiratorias, favoreciendo la colonización de organismos patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* (Hodson, M. E., y D. M. Geddes, 1997; Oliver *et al.* 2000), *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y otros menos comunes como *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella* spp., hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, algunos virus sinciales respiratorios (VRS), así como el aislamiento poco frecuente de *Stenotrophomonas maltophilia* (Govan y Deretic 1996; Hodson, M. E., y D. M. Geddes. 1997; Gibson *et al.* 2003), *Alcaligenes xylosoxidans* y *Comamonas acidovorans* (Henry *et al.* 1997).

En las dos últimas décadas, evidencias epidemiológicas han mostrado un incremento en la morbilidad y mortalidad de pacientes con FQ, lo cual se ha correlacionado con un aumento en la frecuencia de aislamiento de *B. cepacia*, particularmente de los pulmones de los pacientes (Govan *et al.* 1993; Holmes *et al.* 1998). Este incremento de aislamiento de cepas de *B. cepacia*, particularmente de cepas caracterizadas por un tipo electroforético ET12, en pacientes con FQ de Canadá, Edinburgo y Manchester en el Reino Unido (Govan *et al.* 1993; Johnson *et al.* 1994; Rozee *et al.* 1994), se debe a la transmisión por contacto directo entre pacientes con FQ (LiPuma *et al.* 1990) y por contacto social indirecto entre pacientes con FQ aún de clínicas distantes así como por el uso de instrumentos hospitalarios contaminados con cepas de tipo epidémico (Biddick *et al.* 2003; Govan *et al.* 1993).

Las cepas epidémicas se encuentran dentro del complejo *B. cepacia* y son las que conforman el llamado síndrome cepacia (Vandamme *et al.* 1997). Dada la severidad de las infecciones por *B. cepacia* en algunos pacientes, se ha tratado de dilucidar los mecanismos de virulencia de estas cepas. Se han identificado diversos factores de virulencia entre los que se incluyen diferentes sideróforos (pioquelina, ácido salicílico, cepabactina y ornibactina), proteasas, hemolisinas, lipasas, complejos extracelulares tóxicos, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa, exopolisacáridos (EPS) (Govan *et al.* 1996; Mohr *et al.* 2001; Nelson *et al.* 1994).

También las fimbrias o pilis son considerados como determinantes de la virulencia debido a que participan en la adherencia de las células bacterianas a las células epiteliales, aumentando la capacidad colonizadora de la bacteria (Klemm, 1985; Mooi y DeGraaf, 1985; Thanassi *et al.* 2000; Uhlin *et al.* 1985).

En cepas de *B. cepacia* aisladas de pacientes con FQ, de consultorios clínicos y del ambiente se encontró, por microscopía electrónica, la presencia de cinco clases de pilis: el tipo I *B. cepacia* (Msh), el tipo II *B. cepacia* (Cbl), el tipo III *B. cepacia* (Fil), el tipo IV *B. cepacia* (Spn) y/o el tipo V *B. cepacia* (Spk) (Goldstein *et al.* 1995). Este estudio reveló la presencia del pili tipo II *B. cepacia* (Cbl) en las cepas altamente epidémicas aisladas de casos de FQ y su asociación con el síndrome cepacia (Goldstein *et al.* 1995). Éstos aislados de *B. cepacia* que presentan el llamado Pili "cable" se han encontrado en ambos lados del Atlántico, tanto en Toronto, Canadá como en Edinburgo, Escocia (Sun *et al.* 1995). El pili cable está codificado en un operón de 5 genes (*cbIB*, *cbIA*, *cbIC*, *cbID* y *cbIS*) (Sajjan *et al.* 2003) donde el gen *cbIA* codifica la subunidad mayor del pili cable, que junto con proteínas de la membrana externa desempeñan una función importante en la adhesión de algunas cepas del complejo *B. cepacia* a las células epiteliales y en la colonización del tracto respiratorio (Kuehn *et al.* 1992; Saiman *et al.* 1990; Sajjan *et al.* 1993; Sajjan *et al.* 1995; Sajjan *et al.* 2000; Sun *et al.* 1995).

Se ha sugerido que *B. cepacia* tiene la capacidad de propagarse en el ambiente y como patógeno oportunista en el hombre debido a que posee un genoma muy complejo y variable (Lessie *et al.* 1996). La presencia de múltiples cromosomas, de plasmidos y de secuencias de inserción le confiere a *B. cepacia* una gran versatilidad metabólica (Lessie *et al.* 1996).

Muchas especies bacterianas han sido analizadas para conocer sus genomas, tanto en el tamaño y número de cromosomas y plasmidos así como para conocer los genes que los constituyen. En la actualidad, con la secuenciación de genomas completos se sabe el contenido de genes cromosomales y plasmídicos. Estudios previos a la secuencia de genomas, por medio de mapas físicos, estimaron que la cepa ATCC25416<sup>T</sup> de *B. cepacia* presenta un genoma de 8.1 Mb, constituido por tres cromosomas circulares de 3.65 Mb, 3.17 Mb, 1.07 Mb y un plásmido de 200 kb

(Rodley *et al.* 1995). También por análisis de macrorestricción de ADN e hibridaciones tipo Southern se sabe que la cepa ATCC17616 de *B. multivorans* tiene un genoma de 7 Mb, constituido por tres replicones circulares de 3.4 Mb, 2.5 Mb y 0.9 Mb (Cheng y Lessie, 1994; Komatsu *et al.* 2003). El análisis de 37 cepas de *B. cepacia*, aisladas de distintas fuentes, reveló distintos perfiles plasmídicos (Lennon y DeCicco, 1991). Otras especies de importancia agrícola y médica tienen al igual que *B. cepacia* múltiples cromosomas, por ejemplo, *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens* (Allardet-Servent *et al.* 1993; Michaux *et al.* 1993; Suwanto y Kaplan, 1989) y *Azospirillum brasilensis* (Caballero-Mellado *et al.* 1999).

El genoma de *B. cepacia* también contiene numerosas secuencias de inserción (Cheng y Lessie, 1994; Holmes *et al.* 1998; Lessie *et al.* 1996). Las secuencias de inserción (ISs) son consideradas como entidades genéticas móviles de tamaño pequeño que tienen la capacidad de insertarse en diferentes sitios del genoma procariótico. Estos elementos genéticos pueden causar dentro del genoma varios tipos de rearrreglos, como deleciones, inserciones, duplicaciones y fusiones de replicones. Por su característica de insertarse dentro de genes, las ISs causan mutagénesis espontáneas (ver revisiones Galas y Chandler, 1989; Mahillon y Chandler, 1998) así como reclutamiento de genes foráneos (Lessie *et al.* 1996).

En el genoma de diversas especies de *Burkholderia* se han detectado distintas ISs. Por hibridación sustractiva se identificó la secuencia de inserción IS1363, en cepas de *B. cenocepacia* designadas PHDC aisladas de suelo agrícola de Nueva York y de pacientes con FQ de la región media del Atlántico de Estados Unidos. También se ha detectado en cepas de *B. ambifaria* aisladas de suelo agrícola de Nueva York, y en cepas de *B. cenocepacia* (linaje ET12) aisladas de esputo de pacientes con FQ (Liu *et al.* 2003). Las cepas del linaje ET12 presentan de 1 a 2 copias, mientras que las cepas PHDC presentan 4 copias de la ISs. La transposasa IS1363 tiene un 61.1% de homología en aminoácidos con la transposasa IS1328 de *Yersinia enterocolitica* y un 57.8% de homología con TnpA de *Enterobacter aerogenes* (Liu *et al.* 2003).

Otro marcador molecular asociado con las cepas epidémicas de *B. cepacia* es el "Marcador de cepas epidémicas de *B. cepacia*" (con siglas en inglés BCESM). Este marcador BCESM es identificado como un fragmento de ADN de 1.4 kb que presenta un marco de lectura abierto (*esmR*), con una homología con varios reguladores transcripcionales negativos. El BCESM, presumiblemente transmisible, ha sido detectado en cepas epidémicas aisladas en centros hospitalarios y raramente en aislados del ambiente (Mahenthiralingam *et al.* 1997).

## Justificación del proyecto de tesis

---

El determinar el potencial de nuevas especies del género *Burkholderia* asegurando la ausencia de genes involucrados en la patogenicidad de algunas especies de este género, podría abrir expectativas de aplicaciones agrícolas para su uso como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas de cultivo y como agente de control biológico.

## Objetivo general

---

El objetivo general de este trabajo es ampliar la caracterización genómica de dos especies descritas recientemente, *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica*, asociadas al maíz y otras plantas de interés agrícola, así como la búsqueda en estas especies de algunos determinantes de virulencia asociados a las especies del complejo *B. cepacia*.

## Objetivos particulares

---

1. Determinar el perfil de los replicones que conforman el genoma de *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica*.
2. Detección y localización en *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica* de los genes *nifHDK*, involucrados en la fijación de nitrógeno, del gen ribosomal 16S rRNA y del gen *recA*.
3. Búsqueda en *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica* de genes asociados a la patogenicidad de *Burkholderia cenocepacia*.

## Material y Métodos

### Cepas diazótroficas aisladas de plantas de maíz, cafeto, teocintle y caña de azúcar.

Las cepas de *Burkholderia unamae* analizadas fueron aisladas previamente de la rizosfera, del rizoplano y del interior de raíz y tallo de plantas de maíz, caña de azúcar y café, de acuerdo al procedimiento descrito por Estrada-de los Santos *et al.* (2001). Las plantas fueron colectadas de diferentes regiones geográficas de México. Las cepas analizadas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *Burkholderia unamae* analizadas en este trabajo.

Genotipo ARDRA	Cepa	Planta	Origen/Zona	Localidad	Clima	Referencia
15	MTI-641 <sup>1</sup>	Maíz	Rizósfera	Tlayacapan, Morelos	1	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
13	MCo-762	Maíz	Raíz	Coatepec, Veracruz	2	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
15	M2Cy-711	Maíz	Rizósfera	Cocoyoc, Morelos	3	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
14	M2Cy-626	Maíz	Rizoplano	Cocoyoc, Morelos	4	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
15a	M2Cy-717	Maíz	Rizósfera	Cocoyoc, Morelos	3	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
15	MEd-9573	Maíz	Tallo	El Eden, Chiapas	4	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
13	M2Tu-2319	Maíz	Rizósfera	Tuxtla Chico, Chiapas	4	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
15	SCCu-22	Caña de azúcar	Rizósfera	Cuernavaca, Morelos	1	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
15	SCCu-23	Caña de azúcar	Raíz	Cuernavaca, Morelos	1	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
13	SCZa-39	Caña de azúcar	Tallo	Zacatepec, Morelos	3	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
15	SCZa-121	Caña de azúcar	Tallo	Zacatepec, Morelos	3	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
13	SCZa-211	Caña de azúcar	Tallo	Zacatepec, Morelos	3	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
13	SCZa-452	Caña de azúcar	Tallo	Zacatepec, Morelos	3	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
13	CAC-98	Café	Rizósfera	Coatepec, Veracruz	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
15	CAC-112	Café	Rizoplano	Coatepec, Veracruz	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
13	CAC-382	Café	Rizoplano	Coatepec, Veracruz	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
15	CGC-72	Café	Rizoplano	Coatepec, Veracruz	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
15	CGC-316	Café	Rizósfera	Coatepec, Veracruz	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
14	CGC-321	Café	Rizósfera	Coatepec, Veracruz	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
15	C2RT-2811	Café	Rizósfera	Tapachula, Chiapas	4	Caballero-Mellado <i>et al.</i> (en prensa).
Clases climáticas:		1. Semicálido y subhúmedo, 2. Semicálido y húmedo, 3. Cálido y subhúmedo, 4. Cálido y húmedo.				

<sup>1</sup>(Cepa tipo).

Las cepas de *Burkholderia tropica* analizadas fueron aisladas previamente de la rizosfera, del rizoplano y del interior de la raíz y tallo de plantas de maíz y teocintle, de acuerdo al procedimiento descrito por Estrada-de los Santos *et al.* (2001). Las plantas fueron colectadas de diferentes regiones geográficas de México. Las cepas analizadas se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Burkholderia tropica* analizadas en este trabajo.

Genotipo ARDRA	Cepa	Planta	Origen/Zona	Localidad	Clima	Referencia
16	MCh-1054	Maíz	Raíz	Chilpancingo, Guerrero	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
16	MOC-725	Maíz	Rizoplano	Ocoatepec, Morelos	3	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
16	MTe-73523	Maíz	Raíz	Tepoztlan, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
16	MTe-7363	Maíz	Rizoplano	Tepoztlan, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
16	MTI-582	Maíz	Rizósfera	Tlayacapan, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
16	TTe-225	Teocintle	Rizósfera	Tepoztlan, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	MCA-9022	Maíz	Rizósfera	Cacaohatan, Chiapas	4	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	MCo-7931	Maíz	Rizósfera	Coatepec, Veracruz	2	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	MCu-831	Maíz	Rizoplano	Cuernavaca, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	MMi-786	Maíz	Rizoplano	Miacatlán, Morelos	3	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
17	MSj-805	Maíz	Rizósfera	San J. Atenco, Puebla	5	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	MTo-672	Maíz	Tallo	Totontepec, Oaxaca	2	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	TSj-832	Teocintle	Rizósfera	San J. Atenco, Puebla	5	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
17	TTe-1910	Teocintle	Tallo	Tepoztlan, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
19	MCo-761	Maíz	Raíz	Coatepec, Veracruz	2	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
19	MCu-82	Maíz	Rizósfera	Cuernavaca, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
19	MCu-842	Maíz	Rizoplano	Cuernavaca, Morelos	1	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
19	MSj-8432	Maíz	Rizósfera	San J. Atenco, Puebla	5	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
19	MTo-16	Maíz	Rizósfera	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
19	MTo-293	Maíz	Tallo	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
19	MCo-7531	Maíz	Rizósfera	Coatepec, Veracruz	2	Este trabajo
19	MCo-8511	Maíz	Rizósfera	Coatepec, Veracruz	2	Este trabajo
19	Ppe8 <sup>T</sup>	Caña de azúcar	Parte aérea	Pernambuco, Brasil	4	Reis <i>et al.</i> (en prensa).
Clases climáticas:		1. Semicálido y subhúmedo, 2. Semicálido y húmedo, 3. Cálido y subhúmedo, 4. Cálido y húmedo, 5. Templado y subhúmedo.				



Las cepas de *Burkholderia* de especies diferentes a *B. unamae* y *B. tropica* utilizadas en el presente trabajo se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas de *Burkholderia* spp. analizadas en este trabajo.

Cepa	Especie	Origen/Zona	Localidad	Referencia en literatura
IPT101 <sup>T</sup>	<i>B. sacchari</i>	Caña de azúcar	Brasil	Brämer <i>et al.</i> (2001).
KP23 <sup>T</sup>	<i>B. kururiensis</i>	Suelo, agua con TCE	Japón	Zhang <i>et al.</i> (2000).
M-130	<i>B. brasilensis</i> <sup>*</sup>	Endófito de arroz	Brasil	No. AJ238360 en GenBank.
CAC-124	<i>B. xenovorans</i>	Rizosfera de café	Coatepec, Veracruz	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
LMG16224	<i>B. xenovorans</i>	Cultivo de sangre de mujer	Göteborg, Suiza	Goris <i>et al.</i> (en prensa).
LMG21463 <sup>T</sup>	<i>B. xenovorans</i>	Suelo contaminado con PBC	Moreau, Nueva York	Goris <i>et al.</i> (en prensa).
TVV75 <sup>T</sup>	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de arroz	Binh Thanh, Vietnam	Gillis <i>et al.</i> (1995).
TVV72	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de arroz	Binh Thanh, Vietnam	Gillis <i>et al.</i> (1995).
TVV115	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de arroz	Binh Thanh, Vietnam	Gillis <i>et al.</i> (1995).
TVV127	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de arroz	Binh Thanh, Vietnam	Gillis <i>et al.</i> (1995).
TVV69	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de arroz	Binh Thanh, Vietnam	Gillis <i>et al.</i> (1995).
J1647	<i>B. vietnamiensis</i>	Paciente III	Atlanta, E. U	-
C1704	<i>B. vietnamiensis</i>	Paciente con FQ	Edinburgo, U.K	-
MMi-324	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de maíz	Miacatlán, Morelos	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
MMi-302	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de maíz	Miacatlán, Morelos	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
CCE-101	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizoplano de café	El Eden, Chiapas	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
CCE-303	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizoplano de café	El Eden, Chiapas	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001).
STM678 <sup>T</sup>	<i>B. tuberum</i>	Nódulos de <i>Aspalattus carnosus</i>	Sudáfrica	Vandamme <i>et al.</i> (2002b).
STM815 <sup>T</sup>	<i>B. phymatum</i>	Nódulos de <i>Machaerium lunatum</i>	Guayana Francesa	Vandamme <i>et al.</i> (2002b).
ATCC25416 <sup>T</sup>	<i>B. cepacia</i>	Cebolla	-	Yabuuchi <i>et al.</i> (1992).
BC 20	<i>B. cepacia</i>	Sedimento de río	Estados Unidos	Wise <i>et al.</i> (1995).
AU1550	<i>B. cepacia</i>	Esputo de paciente con FQ	Estados Unidos	LiPuma <i>et al.</i> (2001b).
LMG12614	<i>B. cenocepacia</i>	Esputo de paciente con FQ	Reino Unido	Vandamme <i>et al.</i> (1997).
J2315 <sup>T</sup>	<i>B. cenocepacia</i>	Esputo de paciente con FQ	Edinburgo, UK	Govan <i>et al.</i> (1993).
A0007	<i>B. cenocepacia</i>	Esputo de paciente con FQ	Estados Unidos	LiPuma <i>et al.</i> (2001).
BC 5	<i>B. cenocepacia</i>	Paciente FQ	Canadá	Sajjan <i>et al.</i> (1995).
BC 7	<i>B. cenocepacia</i>	Paciente FQ	Canadá	Sajjan <i>et al.</i> (1995).
BC 29	<i>B. cenocepacia</i>	Paciente FQ	Canadá	Sajjan <i>et al.</i> (1995).
BC 38	<i>B. cenocepacia</i>	Paciente FQ	Canadá	Sajjan <i>et al.</i> (1995).
LMG18941	<i>B. dolosa</i>	Esputo de paciente con FQ	Estados Unidos	Coenye <i>et al.</i> (2001a).

TCE (Tricloroetileno)  
FQ (Fibrosis Quística)  
PBC (Policlorobifenil)

### Aislamiento de ADN total.

Todas las cepas analizadas en este trabajo fueron sembradas en medio Luria-Bertani (LB) a 29°C en agitación por 18 a 22 horas. Para el aislamiento de ADN total se empleó la técnica de Ausubel *et al.* (1987).

### Oligos para amplificación del gen *recA*.

Para la amplificación del gen *recA*, se procedió al alineamiento de genes reportados en el GenBank (página web [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Versión 5.0.9). Se utilizaron más de 70 secuencias parciales y completas del gen *recA* de algunas cepas de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*,

*Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, y *Ralstonia*. Por medio del programa OLIGO 4.0-s, se diseñaron los oligonucleótidos R1 5' AAG CAG TTC GGC AAA GGG TC 3' y R2 5' ACG GCG GCG ATA CCT TGT TC 3'. Las condiciones empleadas para la reacción de amplificación fueron las siguientes: en un volumen final de 25  $\mu$ l, se mezcló 1  $\mu$ l de ADN (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de 10X PCR Buffer Mg, 2.5  $\mu$ l de dimetil-sulfoxido (DMSO), 0.75  $\mu$ l de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l de 2.5 mM de dNTP's, 0.8  $\mu$ l de cada oligo (R1 y R2) a 100  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa de 5U/ $\mu$ l (Invitrogen™). Las condiciones de temperatura para la amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos; 94°C por 2 minutos, 63°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos; un ciclo de 72°C por 10 minutos. Los productos de la amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

#### **Secuencia parcial del gen *recA*.**

En el vector de ligación TA Cloning® Kit pCR®2.1 (Figura 2), se ligó el producto de PCR de 712 pb del gen *recA* de *Burkholderia unamae* MTI-641<sup>T</sup> y de *Burkholderia tropica* MTo-293. El vector fue transformado en células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Se analizaron las colonias blancas de *E. coli* que crecieron en placas de medio LB con 25  $\mu$ g/ml de 5-bromo-4cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido (X-Gal) disueltos en dimetilformamida (DMF), 200  $\mu$ g/ml de isopropil-  $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG), 25  $\mu$ g/ml de kanamicina y 100  $\mu$ g/ml de carbenicilina. Después de la purificación de varias colonias se aisló el plásmido recombinante, a partir de cultivos celulares líquidos de LB, por medio del High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Para verificar que el inserto correspondía al producto de amplificación de aproximadamente 712 pb, el plásmido purificado se digirió con la enzima *Eco*RI y el producto de la digestión fue visualizado en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X. Una vez obtenido el plásmido con el inserto correspondiente se determinó la secuencia, utilizando los oligonucleótidos Universal y Reverso que contiene el vector pCR®2.1, por medio del método de Secuenciación Fluorescente de DNA Automatizada. La secuencia se obtuvo en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

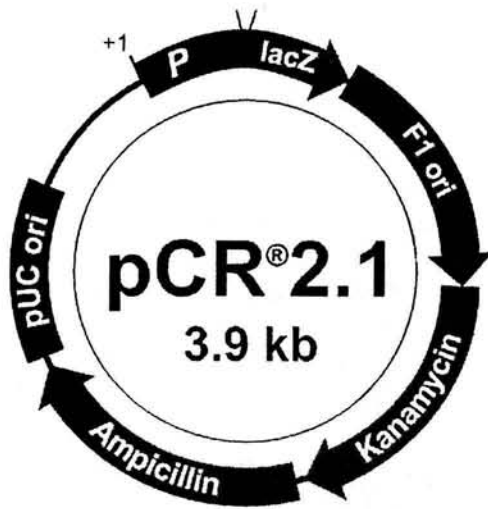


Figura 2. Vector de clonación utilizado para ligar el producto de PCR del gen *recA* de las cepas MTI-641<sup>T</sup> y MTo-293 de *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica* respectivamente. Tomado de TA Cloning® Kit pCR® 2.1 Version T de Invitrogen™ Corporation.

### **Análisis de las secuencias parciales del gen *recA*.**

Las secuencias parciales del gen *recA* de *Burkholderia unamae* MTI-641<sup>T</sup> y de *Burkholderia tropica* MTo-293, fueron comparadas con las secuencias reportadas en las bases de datos de NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), por medio del programa BLASTn (nucleótido-nucleótido). Después se hizo un mapa de restricción con el programa DNA Strider™ 1.1.

### **Análisis de restricción del gen *recA*.**

Los productos de amplificación del gen *recA* obtenidos con las condiciones descritas anteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HindI*, *MspI* y *RsaI*. El ADN digerido fue visualizado en geles de agarosa al 3% en buffer TAE 1X. Los patrones de restricción obtenidos con las distintas enzimas generaron una matriz de datos con la que se construyó un árbol de similaridad utilizando el método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Average (UPGMA).

### Perfil genómico y localización de genes.

Para la visualización del perfil de replicones se analizaron cepas de *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica*. La cepa CFN 42<sup>T</sup> de *Rhizobium etli* (Romero *et al.* 1991), la cepa 1021 de *Sinorhizobium meliloti* (Honeycutt *et al.* 1993) y la cepa Cd de *Azospirillum brasilense* (Caballero-Mellado *et al.* 1999) fueron usadas como referencia para estimar el tamaño de los replicones. El método empleado fue el de Hynes y McGregor (1990) con las modificaciones siguientes: los geles de agarosa fueron al 0.75% con SDS al 0.9%; *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica* fueron incubadas a 29°C en medio BSE con 0.6 g de extracto de levadura por litro; se utilizó 500 µl de cultivos de 22 a 24 horas con densidad óptica de 0.8 a 0.9 (600 nm), el cual se lavó con 80 µl de medio BSE modificado (para remover la capa de polisacáridos); se utilizó 250 µl de solución de sarcosyl al 0.36%; se resuspendió la reacción en 25 µl de solución de lisis que contenía 9 mg/ml de lisozima. Se corrió una electroforesis horizontal en buffer TBE 1X, a 85 V por 13 h a 11°C. Los geles fueron teñidos en solución de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta (UV) en el Eagle Eye<sup>TM</sup> (Stratagene<sup>®</sup>). El peso molecular de los replicones fue estimado a partir de una gráfica semilogarítmica de peso molecular de los replicones de referencia contra la movilidad relativa de los replicones de estudio.

Para la localización de los genes *nifHDK*, 16S rRNA y *recA*, los geles con los perfiles genómicos de *Burkholderia unamae* y *Burkholderia tropica* fueron transferidos a membranas de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N+, Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con Southern (1975). Las sondas fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP] (Redivue<sup>TM</sup>) en tubos de *rediprime*<sup>TM</sup>II DNA (Amersham Pharmacia Biotech), después fueron incorporadas a los tubos de hibridación. La hibridación fue de acuerdo con las condiciones descritas por Caballero-Mellado y Martínez-Romero (1994).

Las sondas usadas para los ensayos de hibridación fueron un fragmento interno del gen 16S rRNA de *E. coli* clonado en el plásmido pKK3535 (Brosius *et al.* 1981); un fragmento de 4.1 kb del gen *nifHDK* de *Rhizobium etli* CFN 42<sup>T</sup> clonado en el plásmido pCQ12 (Quinto *et al.* 1985) y subclonado en el plásmido pEM15, y los productos de amplificación del gen *recA* de la cepa MTI-641<sup>T</sup> de *Burkholderia unamae* y de la cepa MTo-293 de *Burkholderia tropica*.

### **Detección de los genes 16S rRNA, *recA* y *nifHDK*, mediante (RFLP's).**

ADN total de cepas representativas de *B. tropica*, *B. unamae* y *B. vietnamiensis*, así como de las cepas tipo de *B. sacchari*, *B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. kururiensis*, "*B. brasilensis*" y *B. cepacia* fue digerido con la enzima *EcoRI* y sujeto a electroforesis vertical a 40 voltios por 13 a 14 horas. Los geles empleados fueron al 1% de agarosa en buffer TAE 1X, los cuales se tiñeron con solución de bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta (UV) en el Eagle Eye™ (Stratagene®). El ADN fue transferido e hibridizado de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente.

### **Detección del gen *cbIA*, *emsR* y la ISs *IS1363*.**

Para la búsqueda de *cbIA*, *BCESM* e *IS1363*; se empleo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN total de todas las cepas de estudio. Las condiciones empleadas para la amplificación del gen *cbIA* fueron las siguientes: en un volúmen final de 25  $\mu$ l, se mezcló 1  $\mu$ l de ADN (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de 10X PCR Buffer, 2.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  a 50 mM, 0.5  $\mu$ l de dNTP's a 2.5 mM, 0.5  $\mu$ l del oligo CBL1 y CBL2 (Clode *et al.* 2000) a 10  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ l de *Taq* ADN polimerasa de 5U/ $\mu$ l (Invitrogen™). La amplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf). Las condiciones de temperatura empleadas para la reacción de PCR fueron descritas previamente por Clode *et al.* (2000). Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta (UV) en el Eagle Eye™ (Stratagene®).

Las condiciones empleadas para la amplificación del marcador *BCESM* fueron las siguientes: en un volumen final de 25  $\mu$ l, se mezcló 1  $\mu$ l de ADN (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de 10X PCR Buffer, 2.0  $\mu$ l de  $MgCl_2$  a 50 mM, 0.5  $\mu$ l de dNTP's a 2.5 mM, 0.5  $\mu$ l de cada oligo *BCESM1* y *BCESM2* (Clode *et al.* 2000) a 10  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa de 5U/ $\mu$ l. Las condiciones de temperatura empleadas para la reacción de PCR fueron descritas previamente por Clode *et al.* (2000). Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta (UV).

Las condiciones empleadas para la amplificación de la secuencia de inserción *IS1363* fueron las siguientes: en un volumen final de 25  $\mu$ l, se mezcló 1  $\mu$ l de ADN (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de 10X PCR Buffer, 0.75  $\mu$ l de  $MgCl_2$  a 50 mM, 1  $\mu$ l de dNTP's a 2.5 mM, 0.5  $\mu$ l de cada oligo P1 y P5 (Liu *et al.* 2003) a 20  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa de 5U/ $\mu$ l. Las condiciones de temperatura empleadas para la reacción de PCR fueron descritas previamente por Liu *et al.* (2003). Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta (UV).

## Resultados

### Amplificación del gen *recA* por PCR.

Los oligonucleotídeos diseñados fueron R1 5' AAG CAG TTC GGC AAA GGG TC 3' (de las bases +50 del gen *recA*) y R2 5' ACG GCG GCG ATA CCT TGT TC 3' (de las bases +760 del gen *recA*). Por medio de PCR y utilizando los oligos R1 y R2 se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 712 pb de la secuencia parcial del gen *recA* de todas las cepas de estudio del género *Burkholderia*. Cabe mencionar que la amplificación fue repetida al menos tres veces y que las cepas *S. meliloti* 1021 y *R. etli* CFN 42, usadas como control negativo, no se obtuvieron productos de amplificación del gen *recA* con los oligos R1 y R2. Ejemplos de los productos de amplificación se muestran en las Figuras 3 y 4.

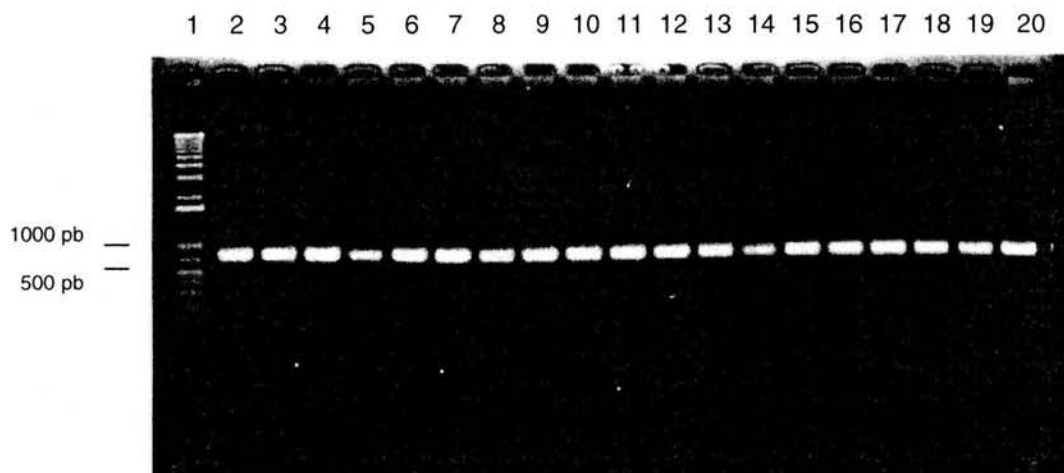


Figura 3. Productos de amplificación del gen parcial *recA*. Carril 1, Marcador 1kb plus; carril 2, *B. sacchari* IPT101<sup>T</sup>; carriles 3, 4, 10, 12 y 15, *B. tropica* MMi-786, MCa-9022, MOc-725, MCo-761, Ppe8<sup>T</sup> y MCu-82; carril 5, *B. tuberum* STM678<sup>T</sup>; carriles 6 y 18, "*B. xenovorans*" LMG 16224 y LMG 21463<sup>T</sup>; carriles 7, 8, 16 y 17, *B. vietnamiensis* TVV115, TVV72, TVV75<sup>T</sup> y TVV69; carril 9, *B. unamae* CAC-98; carril 13, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>; carril 14, *B. cepacia* ATCC 25146<sup>T</sup>; carril 19, *B. cenocepacia* J2315<sup>T</sup>; carril 20, "*B. brasilensis*" M-130.

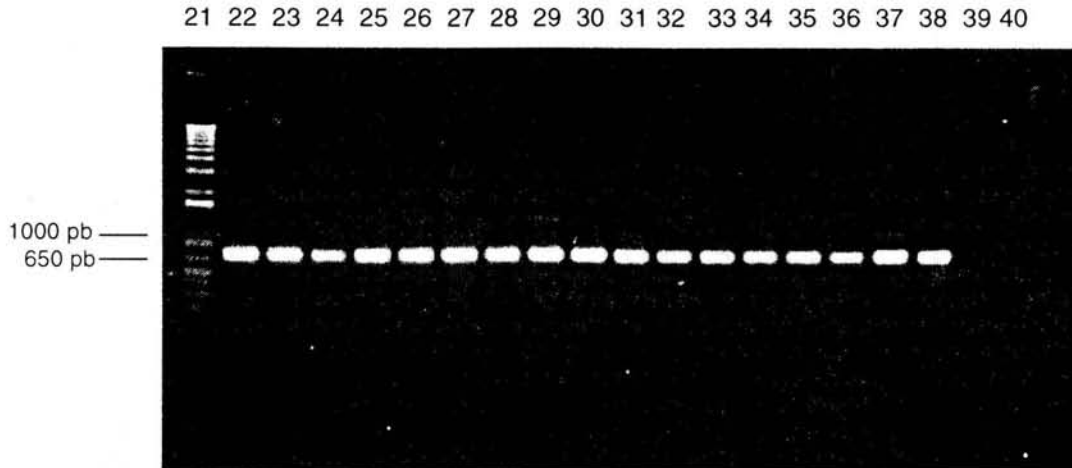


Figura 4. Productos de amplificación del gen parcial *recA*. Carril 21, Marcador 1kb plus; carriles 22, 25, 26 y 37, *B. unamae* CGC-321, MEd-9573, CGC-72, M2Cy-711; carril 23, "*B. xenovorans*" CAC-124; carriles 24, 31, 33, 35 y 36, *B. cenocepacia* BC38, BC29, BC5, BC7 y LMG 12614; carriles 27, 28, 32, 34 y 38, *B. vietnamiensis* J1647, MMi-302, TVV127, C1704 y CCE-101; carril 29, *B. tropica* TTe-225; carril 30, *B. phymatum* STM815<sup>T</sup>; carril 39, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>; carril 40, Control (agua).

#### Secuencia parcial del gen *recA*.

La secuencia de 712 pb del gen *recA* de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> y de *B. tropica* MTo-293 se presentan en la Figura 5. El alineamiento de las secuencias del gen *recA* de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> y de *B. tropica* MTo-293 muestra un segmento que abarca de 40 pb (bases 582-618) donde se localizan las principales diferencias entre ambas secuencias.

Las secuencias del gen *recA* de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> y de *B. tropica* MTo-293 presentan una alta identidad (94% y 93% respectivamente) con la secuencia del gen *recA* de *B. sacchari* (número de acceso AJ550303 en NCBI) (Tabla 5). La mayoría de las otras especies de *Burkholderia* analizadas presenta una identidad del 90%.



	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	10	20	30	40	50	60
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	AAGCAGTTCG	GCAAAGGGTC	GATCATGCGA	CTCGGCGACG	GCGA	GCGGT	CGA
<b>B. tropica</b>	AAGCAGTTCG	GCAAAGGGTC	GATCATGCGA	CTCGGCGACG	GCGA	GCGGT	CGA
<b>MT0-293</b>	AAGCAGTTCG	GCAAAGGGTC	GATCATGCGA	CTCGGCGACG	GCGA	GCGGT	CGA
<b>Consenso</b>	AAGCAGTTCG	GCAAAGGGTC	GATCATGCGA	CTCGGCGACG	GCGA	GCGGT	CGA ACAT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	70	80	90	100	110	120
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	CAGGTGGT	CCACCGG	GCTCGGTCTC	GACATCGC	TCGGCGT	CGG	CTGCCG
<b>B. tropica</b>	CAGGTGGT	CCACCGG	GCTCGGTCTC	GACATCGC	TCGGCGT	CGG	CTGCCG
<b>MT0-293</b>	CAGGTGGT	CCACCGG	GCTCGGTCTC	GACATCGC	TCGGCGT	CGG	CTGCCG
<b>Consenso</b>	CAGGTGGT	T CCACCGG	TC GCTCGGTCTC	GACATCGC	C TCGGCGT	GG	CGG CTGCCG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	130	140	150	160	170	180
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	CGCGGCCG	TGGTCGA	CTACGGTCCG	GAATCGTCGG	G	AAGACCAC	GCTCACGCTG
<b>B. tropica</b>	CGCGGCCG	TGGTCGA	CTACGGTCCG	GAATCGTCGG	G	AAGACCAC	GCTCACGCTG
<b>MT0-293</b>	CGCGGCCG	TGGTCGA	CTACGGTCCG	GAATCGTCGG	G	AAGACCAC	GCTCACGCTG
<b>Consenso</b>	CGCGGCCG	G TGGTCGA	AT CTACGGTCCG	GAATCGTCGG	G	AAGACCAC	GCTCACGCTG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	190	200	210	220	230	240
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	CA	GTGATCG	C	GA	TGCA	AAG	TCGGC
<b>B. tropica</b>	CA	GTGATCG	C	GA	TGCA	AAG	TCGGC
<b>MT0-293</b>	CA	GTGATCG	C	GA	TGCA	AAG	TCGGC
<b>Consenso</b>	CA	GTGATCG	C	GA	TGCA	AAG	TCGGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	250	260	270	280	290	300
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	GCGCTCGACG	T	CA	TACGC	TTC	AAGCTC	GCGTGAACG
<b>B. tropica</b>	GCGCTCGACG	T	CA	TACGC	TTC	AAGCTC	GCGTGAACG
<b>MT0-293</b>	GCGCTCGACG	T	CA	TACGC	TTC	AAGCTC	GCGTGAACG
<b>Consenso</b>	GCGCTCGACG	T	CA	TACGC	C	AAGCTC	GCGTGAACG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	310	320	330	340	350	360
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	CAGCCGGACA	CGGGCGA	CA	GCGCTCGAA	ATC	CCGACG	C
<b>B. tropica</b>	CAGCCGGACA	CGGGCGA	CA	GCGCTCGAA	ATC	CCGACG	C
<b>MT0-293</b>	CAGCCGGACA	CGGGCGA	CA	GCGCTCGAA	ATC	CCGACG	C
<b>Consenso</b>	CAGCCGGACA	CGGGCGA	CA	GCGCTCGAA	ATC	CCGACG	C
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	370	380	390	400	410	420
<b>B. unamae</b>							
<b>MT1-641</b>	ATCGACATGA	TCGT	ATCGA	CTCGTTCGCG	GC	CTCGTGC	CGAAGGC
<b>B. tropica</b>	ATCGACATGA	TCGT	ATCGA	CTCGTTCGCG	GC	CTCGTGC	CGAAGGC
<b>MT0-293</b>	ATCGACATGA	TCGT	ATCGA	CTCGTTCGCG	GC	CTCGTGC	CGAAGGC
<b>Consenso</b>	ATCGACATGA	TCGT	ATCGA	CTCGTTCGCG	GC	CTCGTGC	CGAAGGC

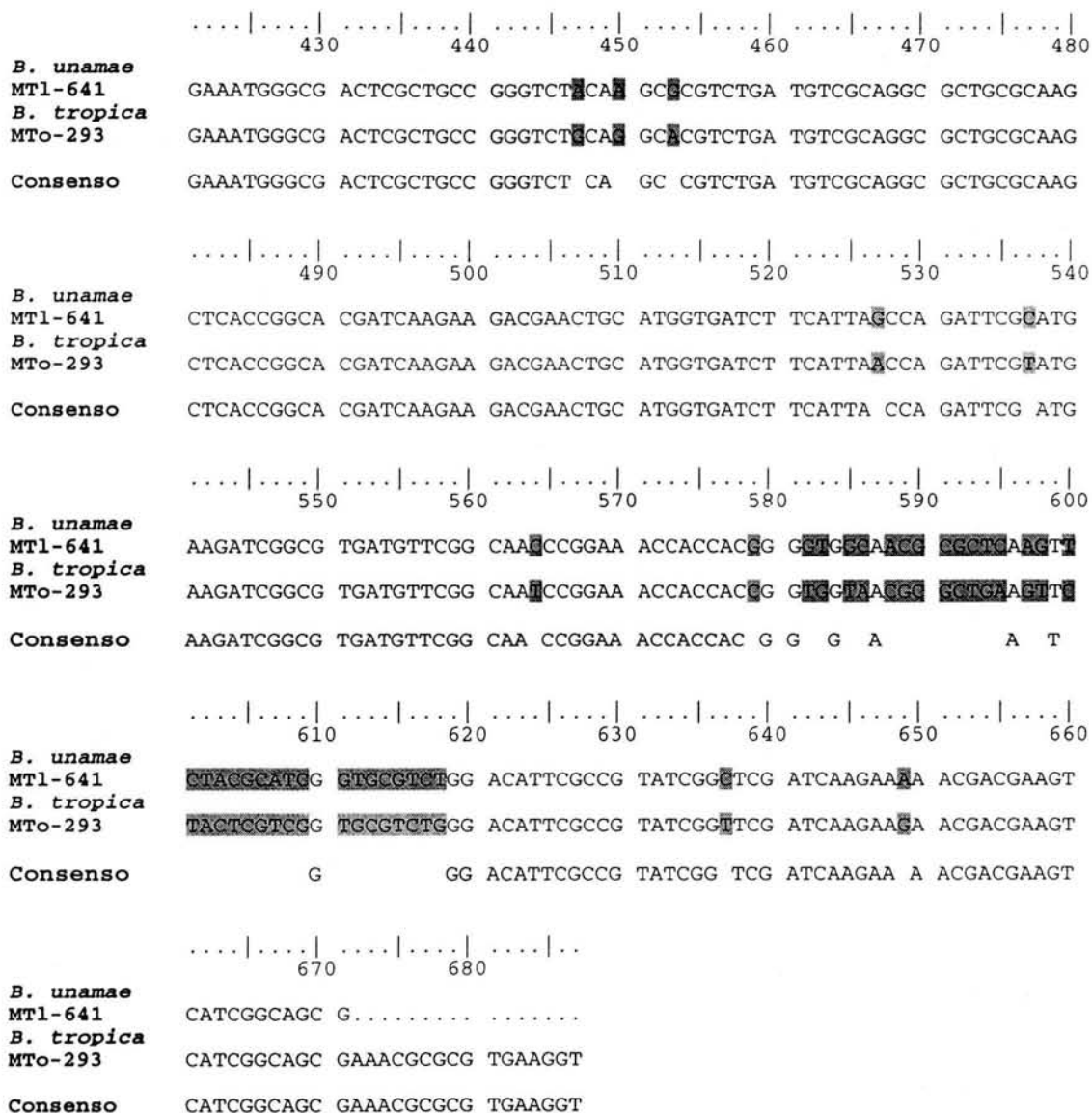


Figura 5. Alineamiento de las secuencias parciales del gen *recA* de *B. unamae* MT1-641<sup>T</sup> y *B. tropica* MT0-293. Se resaltan las diferencias en nucleotidos de ambas secuencias.

Tabla 5. Identidad en bases nucleotídicas de las secuencias parciales del gen *recA* de la cepa MTI-641<sup>T</sup> de *B. unamae* y de la cepa MTo-293 de *B. tropica* con las secuencias del gen *recA* reportadas en el GenBank.

Especies	Cepa	No. acceso en NCBI	<i>B. tropica</i> MTo-293	<i>B. unamae</i> MTI-641 <sup>T</sup>
<i>B. sacchari</i>	IPT101 <sup>T</sup>	AJ550303	93%	94%
<i>B. glumae</i>	LMG2196	AJ551324	92%	91%
<i>B. cepacia</i>	LMG7000	AF143789	90%	90%
<i>B. stabilis</i>	LMG14294	AF456031	90%	90%
<i>B. pyrrocinia</i>	ATCC39277	AF456032	90%	90%
<i>B. plantarii</i>	LMG9035	AJ551323	90%	90%
<i>B. dolosa</i>	LMG21443	AY324808	90%	90%
<i>B. tropica</i>	MTo-293	-	100%	89%
<i>B. ambifaria</i>	CEPO958	AF456007	90%	89%
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV75 <sup>T</sup>	AF143793	90%	89%
<i>B. multivorans</i>	C1576	AF143774	90%	89%
<i>B. cenocepacia</i>	BELF2	AF456050	90%	90%
<i>P. cepacia</i>	JN25	D90120	90%	89%
<i>B. unamae</i>	MTI-641 <sup>T</sup>	-	89%	100%
<i>B. graminis</i>	LMG18924	AJ551267	88%	89%
<i>B. fungorum</i>	LMG19511	AJ551265	88%	89%
<i>B. anthina</i>	BHS1	AJ544692	89%	89%

(-) sin No. de acceso.

### Análisis de los patrones de restricción del gen *recA* amplificado.

Se llevó a cabo la amplificación del gen *recA* de cepas de *B. unamae*, *B. tropica* y de otras especies fijadoras de nitrógeno del género *Burkholderia* así como de la especie tipo y cepas epidémicas de *B. cenocepacia*. Los productos de amplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HindI*, *MspI* y *RsaI*. Estas enzimas cortan la secuencia parcial de *recA* en segmentos fáciles de identificar en electroforesis de geles de agarosa al 3%. La presencia de los sitios de corte, con las enzimas de restricción usadas, en la secuencias parciales del gen *recA* de *B. unamae* y *B. tropica* fue confirmada en mapas de restricción (datos no mostrados). La restricción de la secuencias del gen *recA* de las especies del género *Burkholderia* reveló de 2 a 11 patrones con diferentes tamaños dependiendo de la enzima (datos no mostrados). A cada patron se les asignó un número de identificación (Tabla 6). Con la matriz de datos obtenida y por medio del método UPGMA, se generó un dendograma de las especies analizadas (Figura 6).

Tabla 6. Patrones de restricción del gen parcial *recA* de cepas representativas de estudio.

Cepas	Especie	Origen/Zona	Perfiles de restricción						
			<i>DdeI</i>	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HindI</i>	<i>RsaI</i>
MTI-641 <sup>T</sup>	<i>B. unamae</i>	Rizosfera de maíz	1	4	1	1	1	1	1
SCCu-23 <sup>a</sup>	<i>B. unamae</i>	Raíz de caña de azúcar	1	4	1	1	1	1	1
Ppe8 <sup>T</sup>	<i>B. tropica</i>	Rizosfera de caña de azúcar	1	1	1	1	1	1	1
MTo-293 <sup>b</sup>	<i>B. tropica</i>	Tallo de maíz	1	1	1	1	1	1	1
IPT101 <sup>T</sup>	<i>B. sacchari</i>	Caña de azúcar	1	4	6	9	1	2	9
TVV75 <sup>T</sup>	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de arroz	1	2	2	7	4	2	3
MMi-324	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera de maíz	1	2	5	7	4	2	2
CCE-101	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizoplano de café	1	2	6	7	4	2	6
STM678 <sup>T</sup>	<i>B. tuberum</i>	Nódulos de <i>Aspalattus carnosus</i>	1	4	1	10	1	2	5
STM815 <sup>T</sup>	<i>B. phymatum</i>	Nódulos de <i>Machaerium lunatum</i>	1	2	10	4	2	2	4
ATCC25416 <sup>T</sup>	<i>B. cepacia</i>	Cebolla	1	2	11	3	3	3	2
BC 20	<i>B. cepacia</i>	Sedimento de río	1	6	8	8	1	3	7
AU1550	<i>B. cepacia</i>	Espuito de paciente con FQ	1	6	8	8	1	2	8
J2315 <sup>T</sup>	<i>B. cenocepacia</i>	Espuito de paciente con FQ	1	6	7	8	4	2	7
A0007	<i>B. cenocepacia</i>	Espuito de paciente con FQ	1	6	7	8	4	2	7
CAC-124	<i>B. xenovorans</i>	Rizósfera de cafeto	1	4	4	6	5	2	6
LMG16224	<i>B. xenovorans</i>	Cultivo de sangre de mujer	1	5	4	6	6	2	6
LMG21463 <sup>T</sup>	<i>B. xenovorans</i>	Suelo contaminado con PCB	1	4	4	6	5	2	6
KP23 <sup>T</sup>	<i>B. kururiensis</i>	Suelo, agua con TCE	2	3	3	2	1	3	2
M-130	" <i>B. brasiliensis</i> "	Endófito de arroz	2	3	3	5	1	3	2

<sup>a</sup> Todas las cepas de *B. unamae* analizadas en este trabajo presentaron el mismo perfil de restricción.

<sup>b</sup> Todas las cepas de *B. tropica* analizadas en este trabajo presentaron el mismo perfil de restricción.

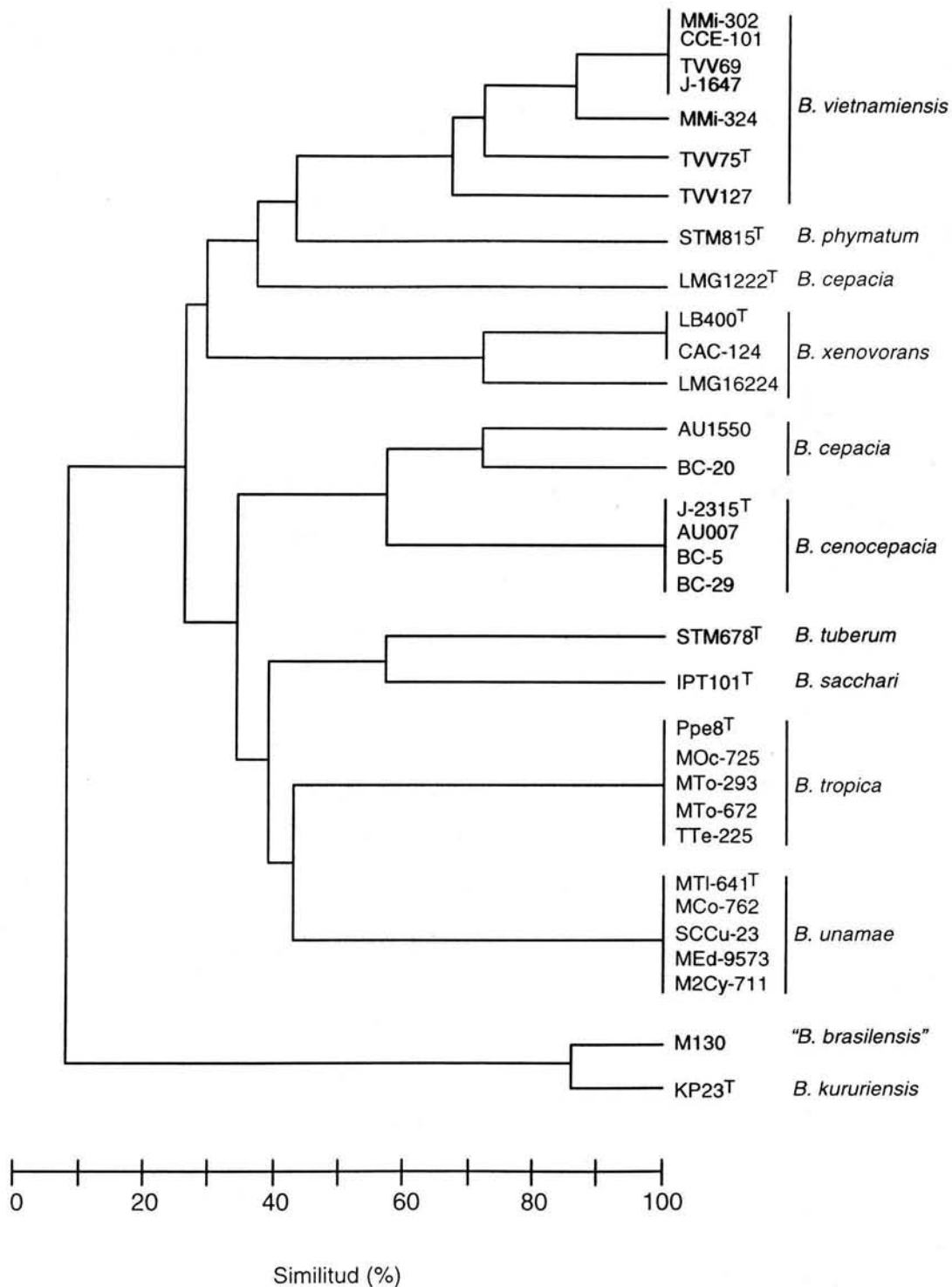


Figura 6. Dendrograma de especies fijadoras de nitrógeno y de otras especies del género *Burkholderia*, obtenido mediante el análisis de patrones de restricción del gen *recA* amplificado parcialmente por PCR.

### **Perfil genómico y localización de genes.**

Se logro visualizar el perfil genómico de cepas de *B. unamae* y *B. tropica* con la técnica de Eckardth (1978) modificada por Hynes y McGregor (1991) y modificada en este trabajo. La visualización de los replicones presentes en cepas de *B. unamae* fue inconsistente, especialmente aquellos con tamaño mayor a 1700 kb. A pesar de múltiples ensayos no fue posible detectar el o los factores que influyen en la reproducibilidad del método con las especies de *Burkholderia* analizadas. La lisis de las células parece ser el principal factor para lograr la reproducibilidad, pero no se lograron establecer las condiciones apropiadas para observar replicones de mayor tamaño. Esta situación influyó significativamente en la localización de los genes 16S rRNA, *recA* y *nifHDK* en las especies *B. unamae* y *B. tropica*, debido a la falta de detección de señales de hibridación claras y concluyentes. Por las razones expuestas, los resultados de las hibridaciones que se presentan deben ser consideradas con reserva y confirmadas por medio de otras metodologías como la electroforesis en campos pulsados.

Todas las cepas de *B. unamae*, independientemente de su origen, muestran un perfil de replicones específico para cada genotipo (Tabla 7). Un ejemplo del perfil de los replicones de *B. unamae* se muestra en la Figura 7.

Tabla 7. Perfil genómico en cepas de *B. unamae* y ubicación de los genes 16S rRNA, *recA* y *nifHDK*.

Genotipo ARDRA	Cepa	Número de Replicones	Tamaño de replicon (kb)	Replicones en los que se detectaron los genes:		
				16S rRNA	<i>recA</i>	<i>nifHDK</i>
13	MCo-762	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
13	M2Tu-2319	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
13	SCZa-39	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
13	SCZa-211	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
13	SCZa-452	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
13	CAC-98	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
13	CAC-382	4	>1700, 1300, 630, 550	1300, 630	1300, 630, 550	550
14	M2Cy-626	4	1300, 700, 550, 350	1300, 550	Nd	700
14	CGC-321	4	1300, 700, 550, 350	1300, 550	Nd	700
15	MTI-641	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	M2Cy-711	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	MEd-9573	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	SCCu-22	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	SCCu-23	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	SCZa-121	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	CAC-112	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	CGC-72	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	CGC-316	4	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15	C2RT-2811	3	>1700, 1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200	1300, 1200
15a	M2Cy-717	2	1300, 250	Nd	Nd	Nd
Nd (No determinado)						

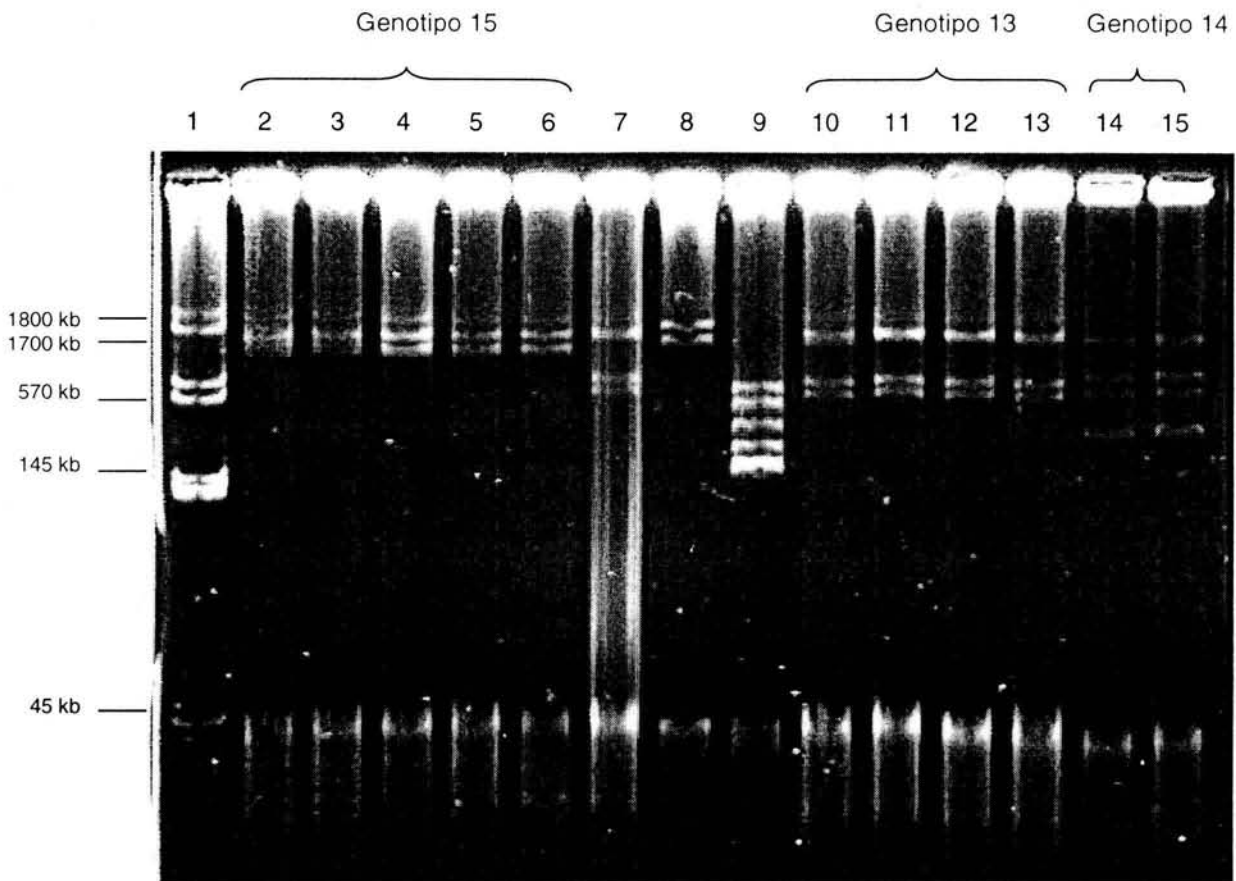


Figura 7. Ejemplo del perfil electroforético de replicones en cepas de *B. unamae* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *A. brasilensis* Cd (tamaño de replicones >1800 kb, 1700 kb, 630 kb, 570 kb, 145 kb, 140 kb y 130 kb); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. unamae* SCCu-22, SCZa-121, CGC-316, MTI-641<sup>T</sup>, MEd-9573 y M2Tu-2319; carril 8, *S. meliloti* 1021 (tamaño de megaplásmidos: 1700 kb y 1340 kb); carril 9, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (tamaño de replicones: 630 kb, 510 kb, 390 kb, 270 kb, 150 kb y 150 kb); carriles 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. unamae* SCZa-211, SCZa-452, CAC-98, MCO-762, CGC-321 y M2Cy-626.



En las cepas de *B. unamae* se localizó el gen 16S rRNA en un replicón de 1300 kb, independientemente del genotipo. Sin embargo, dependiendo del genotipo se detectó el gen 16S rRNA en otros replicones de diferentes tamaños. Por ejemplo, en las cepas MTI-641<sup>T</sup> y CGC-72 (genotipo 15) se detectaron en un replicon de 1200 kb, en tanto que las cepas CAC-98 y MCo-762 (genotipo 13) se detectaron en un replicon de 630 kb y en las cepas CGC-321 y M2Cy-626 (genotipo 14) se detectaron en un replicon de 550 kb (Tabla 7, Figuras 8 y 8a).

El gen *recA* en las cepas de *B. unamae* del genotipo 15 y 13 fue localizado en todos los replicones, excepto en el de tamaño >1700 kb (Tabla 7, Figuras 9 y 9a). Los controles *A. brasilensis* Cd presentaron señal de hibridación del gen *recA* en los 6 replicones de tamaño mayor, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> en sus 6 replicones y *S. meliloti* 1021 en sus 2 megaplásmidos.

En las cepas de *B. unamae* del genotipo 15 los genes *nifHDK* fueron localizados en los replicones de 1300 kb y 1200 kb, en tanto que en las cepas del genotipo 13 se detectaron en un replicon de 550 kb y en las cepas del genotipo 14 en un replicon de 700 kb (Tabla 7, Figura 10 y 10a).

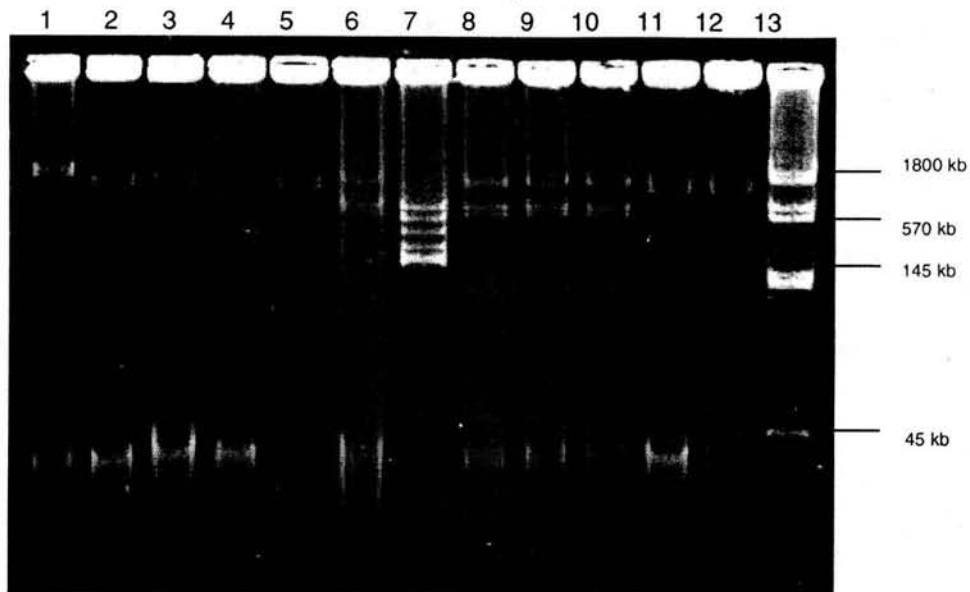


Figura 8. Perfil electroforético de replicones en *B. unamae* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *S. meliloti* 1021 (Control); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. unamae* SCCu-23, CGC-72, CGC-321, MTI-641 y SCZa-39; carril 7, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 8, 9, 10, 11 y 12, *B. unamae* CAC-98, SCZa-211, MCo-762, M2Cy-711 y MEd-9573; carril 13, *A. brasilensis* Cd (Control).

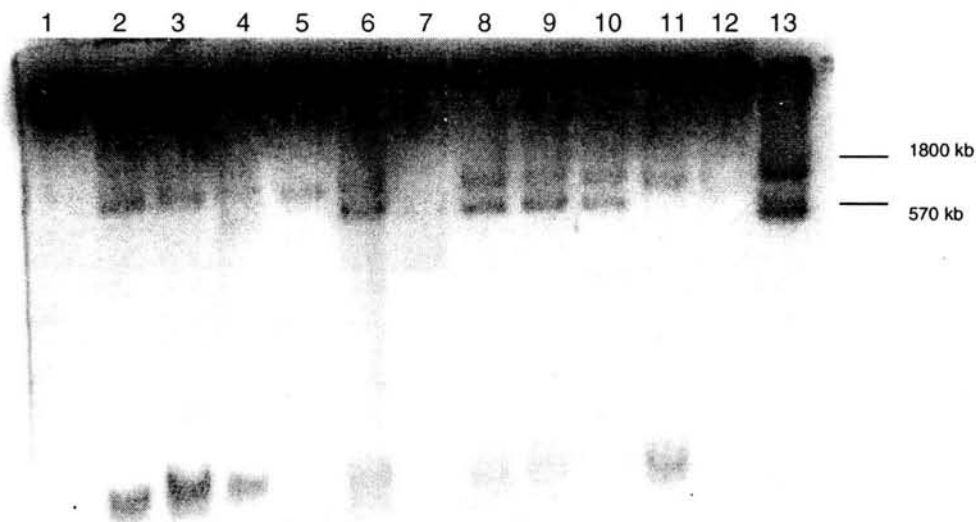


Figura 8a. Autoradiografía tipo Southern blot del perfil de replicones de cepas de *B. unamae* de la Figura 8, después de la hibridación con un fragmento interno del gen 16S rRNA de *E. coli*.

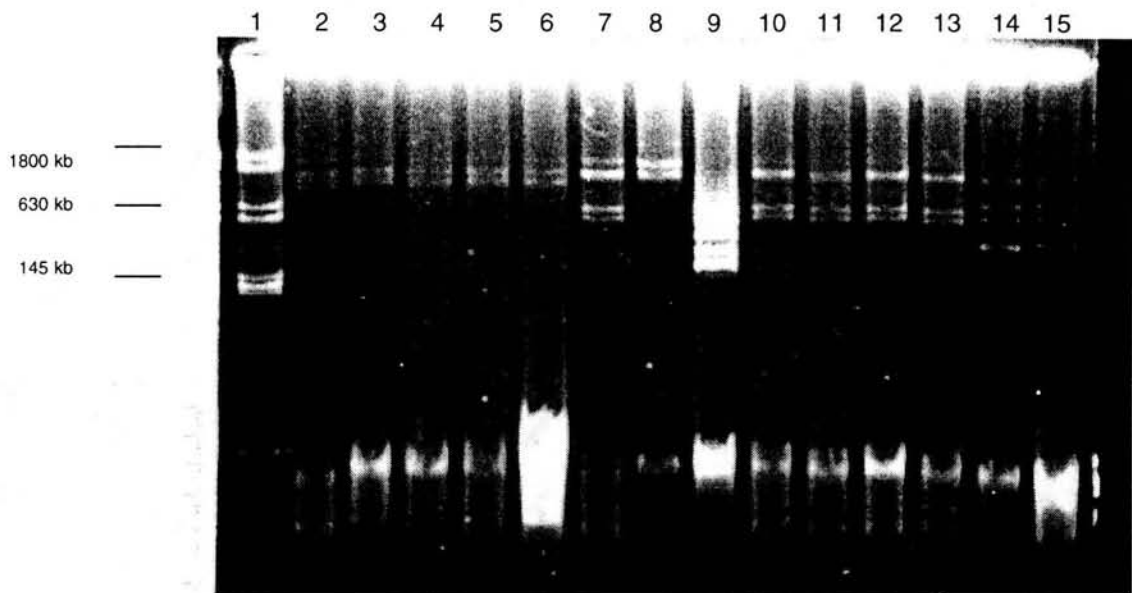


Figura 9. Perfil electroforético de replicones en *B. unamae* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *A. brasilensis* Cd (Control); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. unamae* SCCu-22, SCZa-121, CGC-313, MTI-641, MEd-9573 y M2Tu-2319; carril 8, *S. meliloti* 1021 (Control); carril 9, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. unamae* SCZa-211, SCZa-452, CAC-98, MCo-762, CGC-321y CGC-626.

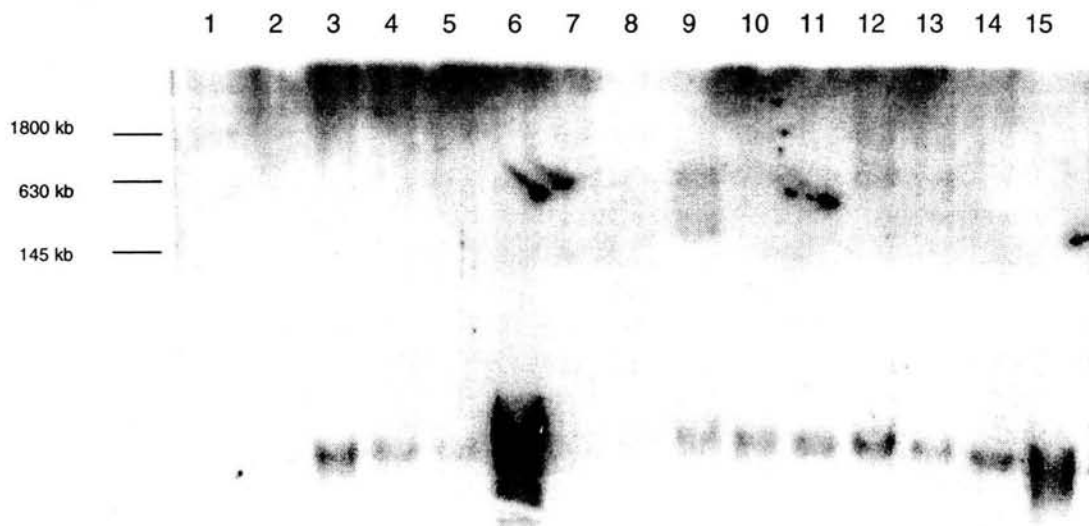


Figura 9a. Autorradiografía tipo Southern blot del perfil de replicones de cepas de *B. unamae* de la Figura 9, después de la hibridación con el producto de PCR del gen *recA* de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>.

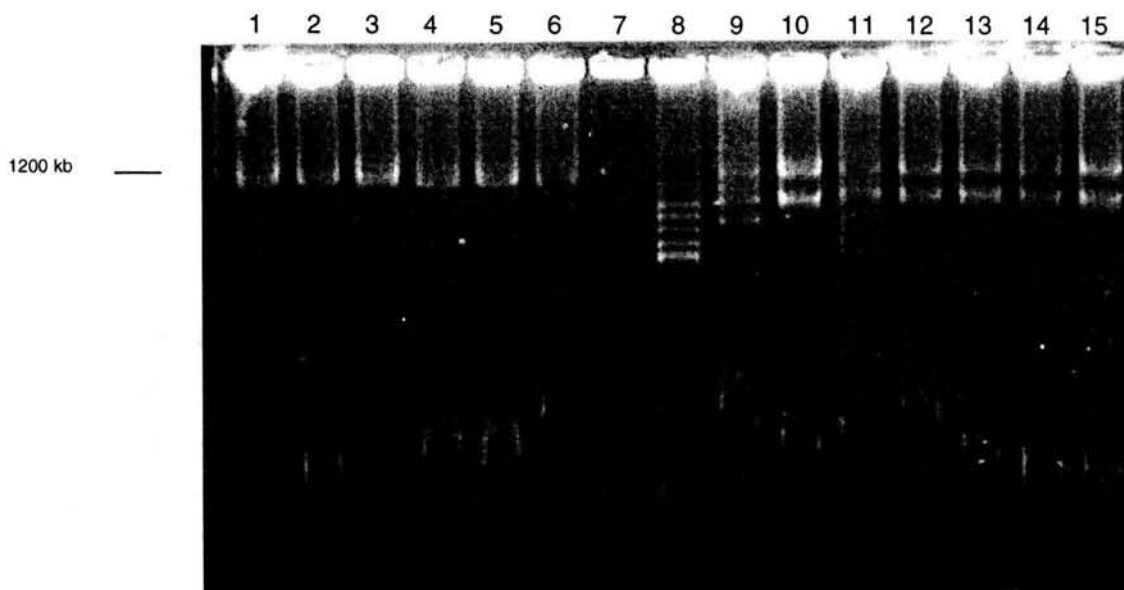


Figura 10. Perfil electroforético de replicones en *B. unamae* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6, *B. unamae* CAC-112, SCCu-22, MEd-9573, CGC-316, M2Cy-711 y MTI-641; carril 7, *S. meliloti* 1021 (Control); carril 8, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. unamae* CGC-321, MCo-762, SCZa-211, SCZa-452, SCZa-39, CAC-98 y CAC-382.

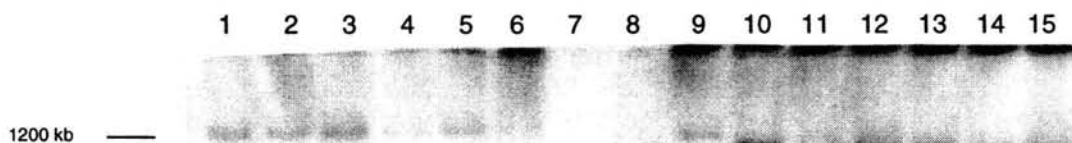


Figura 10a. Autorradiografía tipo Southern blot del perfil de replicones de cepas de *B. unamae*, de la Figura 10 después de la hibridación con el gen *nifHDK* de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>.

Todas las cepas de *B. tropica* estudiadas en este trabajo presentaron un replicón de 1800 kb y otro de 1700 kb. Solo las cepas del genotipo 16 presentaron un perfil genómico igual, en tanto que las cepas del genotipo 17 y 19 presentan perfiles genómicos distintos, tanto en el número y tamaño de los replicones (Tabla 8). Se muestra un ejemplo del perfil de replicones de cepas de *B. tropica* en la Figura 11.

Tabla 8. Perfil genómico en cepas de *B. tropica* y ubicación de los genes 16S rRNA, *recA* y *nifHDK*.

Genotipo ARDRA	Cepa	Número de Replicones	Tamaño de replicon (kb)	Replicones en los que se detectaron los genes:		
				16S rRNA	<i>recA</i>	<i>nifHDK</i>
16	MOc-725	3	1800, 1700, 630	1800, 1700	1800, 1700, 630	630
16	MTe-73523	3	1800, 1700, 630	1800, 1700	1800, 1700, 630	630
16	MTI-582	3	1800, 1700, 630	Nd	Nd	Nd
17	Mca-9022	3	1800, 1700, 590	Nd	Nd	Nd
17	MCo-7931	3	1800, 1700, 590	1800, 1700	1800, 1700, 590	590
17	MCu-831	3	1800, 1700, 570	1800, 1700	1800, 1700, 570	570
17	MMi-786	4	1800, 1700, 530, 300	1800, 1700	1800, 1700, 530, 300	530
17	MSj-805	3	1800, 1700, 530	1800, 1700	1800, 1700, 530	530
17	MTo-672	4	1800, 1700, 460, 270	1800, 1700	1800, 1700, 460, 270	460, 270
17	TSj-832	3	1800, 1700, 570	Nd	Nd	Nd
17	TTe-1910	4	1800, 1700, 470, 270	Nd	Nd	Nd
19	MCo-761	3	1800, 1700, 530	Nd	Nd	Nd
19	MCu-82	3	1800, 1700, 555	1800, 1700	1800, 1700, 555	555
19	MCu-842	3	1800, 1700, 555	1800, 1700	1800, 1700, 555	555
19	MSj-8432	4	1800, 1700, 470, 130	1800, 1700	1800, 1700, 470, 130	470, 130
19	MTo-16	3	1800, 1700, 530	Nd	Nd	Nd
19	MTo-293	3	1800, 1700, 550	1800, 1700	1800, 1700, 550	550
19	MCo-7531	4	1800, 1700, 500, 330	Nd	Nd	Nd
19	MCo-8511	4	1800, 1700, 430, 140	Nd	Nd	Nd
19	Ppe8 <sup>T</sup>	3	1800, 1700, 600	1800, 1700	1800, 1700, 600	600

Nd (No determinado)

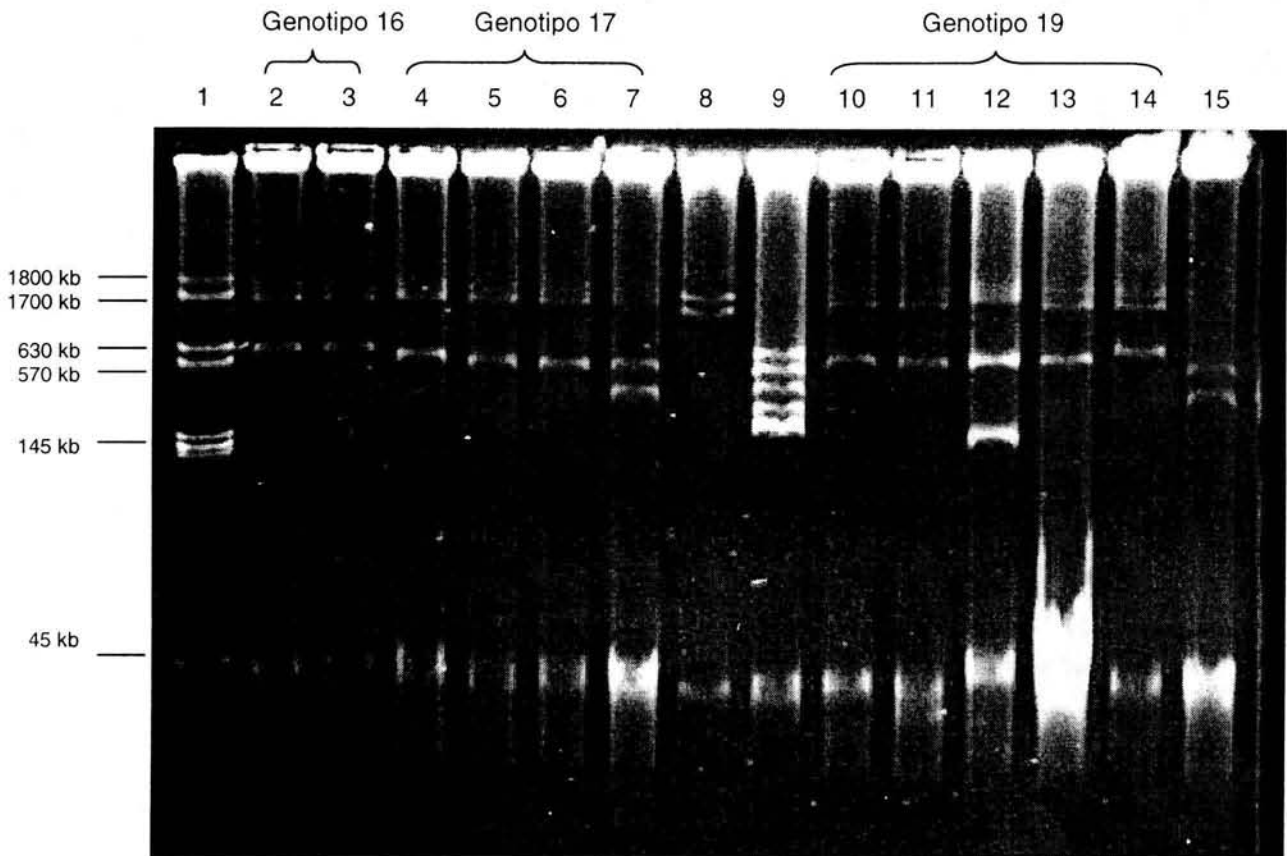


Figura 11. Ejemplo del perfil electroforético de replicones en cepas de *B. tropica* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *A. brasilensis* Cd (Control); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. tropica* MOc-725, MTe-73523, MCo-7931, MCu-831, MSj-805 y MMi-786; carril 8, *S. meliloti* 1021 (Control); carril 9, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. tropica* MCu-842, MCu-82, MSj-8432, MTo-293, Ppe8<sup>T</sup> y MTo-672.

La ubicación del gen 16S rRNA en todas las cepas de *B. tropica* se detectó en los replicones con tamaños de 1800 kb y 1700 kb (Tabla 8, Figuras 12 y 12a).

En las cepas de *B. tropica*, la localización del gen *recA* se detectó en todos los replicones (Tabla 8, Figuras 13 y 13a). Las cepas control mostraron una señal de hibridación, de resolución baja, en los 6 replicones de mayor tamaño *A. brasilensis* Cd; en los 2 megaplásmidos *S. meliloti* 1021 y en los 6 replicones de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>, como se presentó en las hibridaciones de los replicones de *B. uname*.

En las cepas de *B. tropica* se localizaron los genes *nifHDK* en los replicones de menor tamaño, como en el caso de las cepas MSj-8432 y MTo-672 (Tabla 8). Aunque, la cepa MMi-786 mostró señal de hibridación en el replicon de 530 kb, el cual no es el de menor tamaño (Tabla 8 y Figuras 14 y 14a).

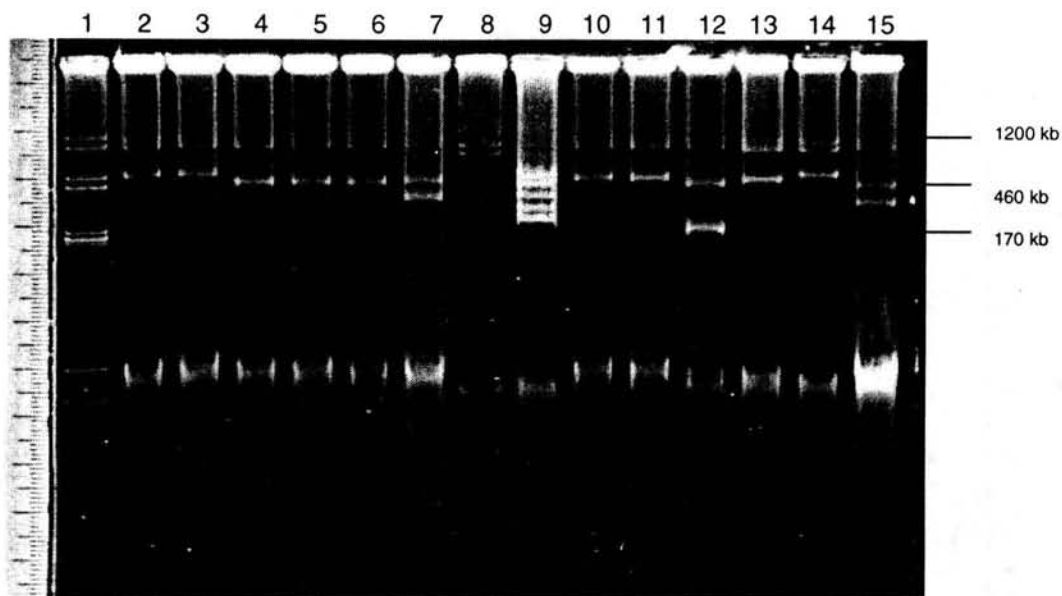


Figura 12. Perfil electroforético de replicones en *B. tropica* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *A. Brasilensis* Cd (Control); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. tropica* MOc-725, MTe-73523, MCo-7931, MCu-831, MSj-805 y MMi-786; carril 8, *S. meliloti* 1021 (Control); carril 9, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. tropica* MCu-842, MCu-82, MSj-8432, MTo-293, Ppe8<sup>T</sup> y MTo-672.

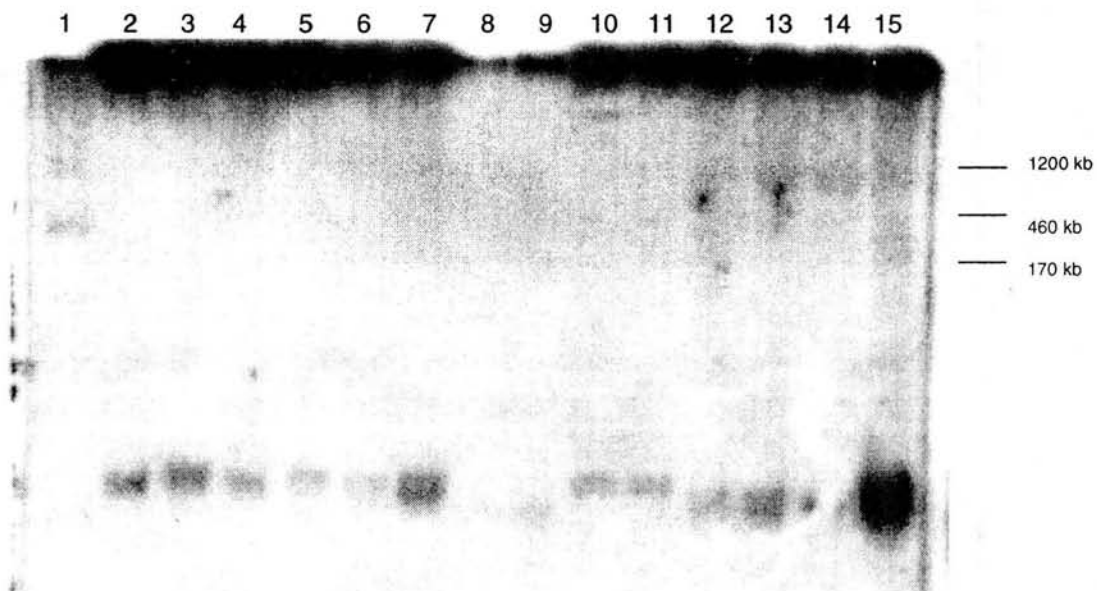


Figura 12a. Autorradiografía tipo Southern blot del perfil de replicones de cepas de *B. tropica* de la Figura 12, después de la hibridación con un fragmento interno del gen 16S rRNA de *E. coli*.



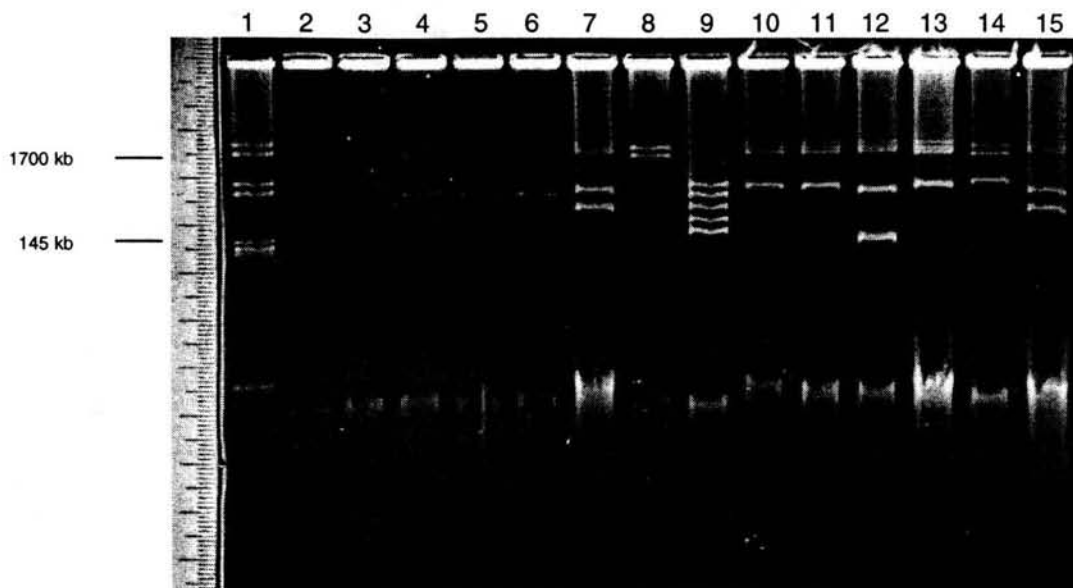


Figura 13. Perfil electroforético de replicones en *B. tropica* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *A. brasiliensis* Cd (Control); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. tropica* MOc-725, MTe-73523, MCo-7931, MCu-831, MSj-805 y MMi-786; carril 8, *S. melloti* 1021 (Control); carril 9, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. tropica* MCu-842, MCu-82, MSj-8432, MTo-293, Ppe8<sup>T</sup> y MTo-672.

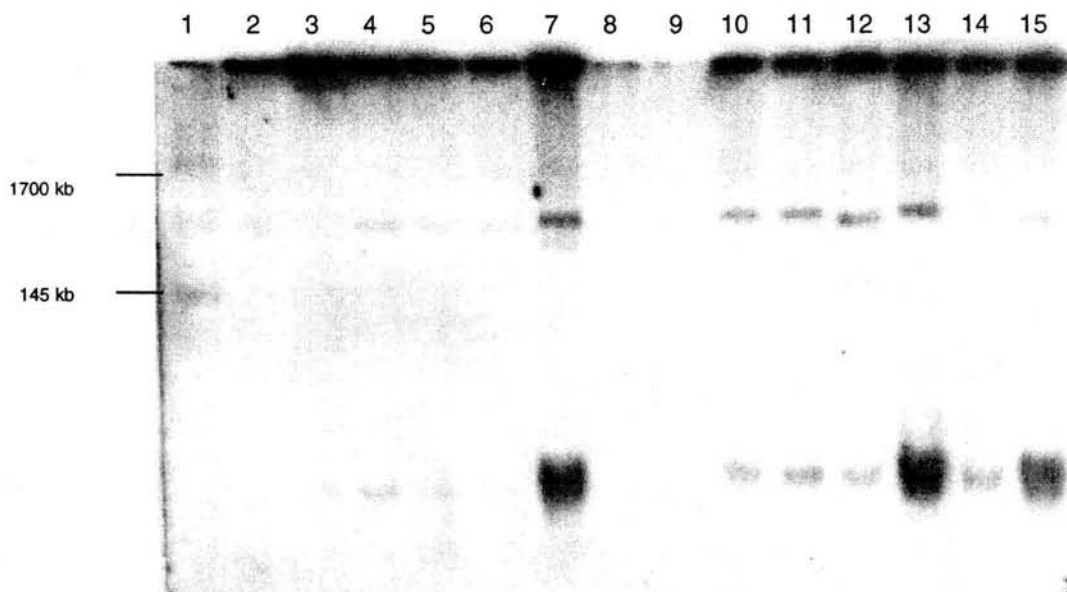


Figura 13a. Autoradiografía tipo Southern blot del perfil de replicones de cepas de *B. tropica* de la Figura 13, después de la hibridación con el producto de PCR del gen *recA* de *B. unamae* MTo-293..

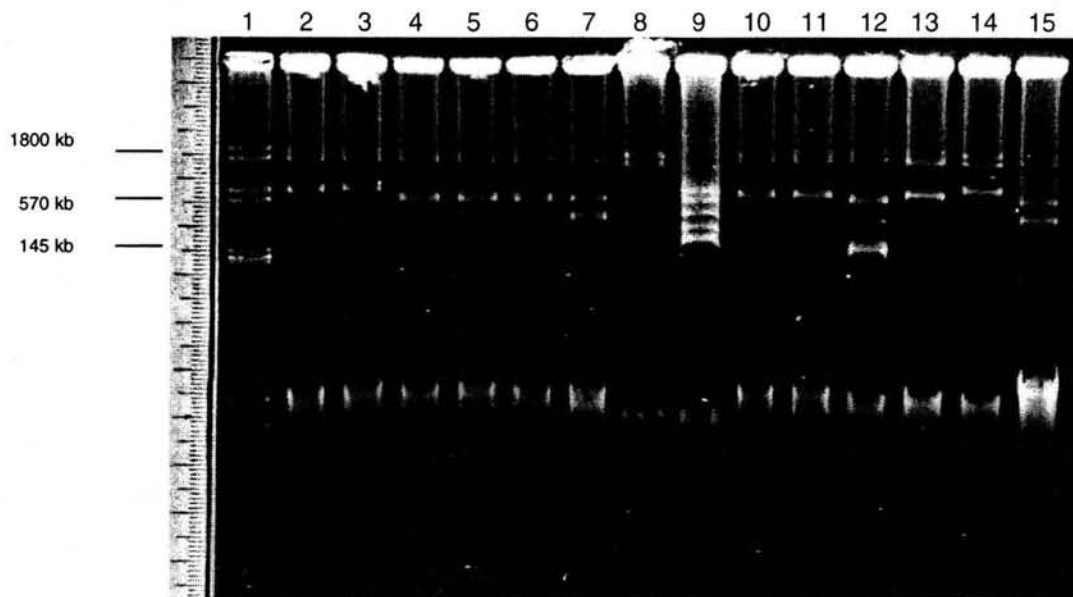


Figura 14. Perfil electroforético de replicones en *B. tropica* obtenido por el método de Eckhardt modificado. Cepas analizadas por carril 1, *A. brasilensis* Cd (Control); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, *B. tropica* MOC-725, MTe-73523, MCo-7931, MCu-831, MSj-805 y MMi-786; carril 8, *S. meliloti* 1021 (Control); carril 9, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (Control); carriles 10, 11, 12, 13, 14 y 15, *B. tropica* MCu-842, MCu-82, MSj-8432, MTo-293, Ppe8<sup>T</sup> y MTo-672.

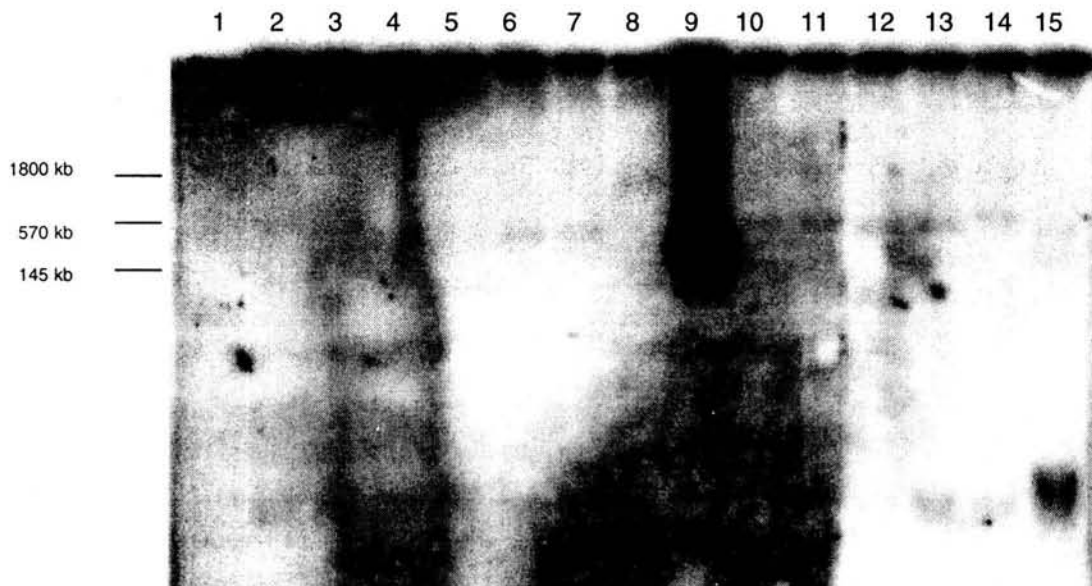


Figura 14a. Autoradiografía tipo Southern blot del perfil de replicones de cepas de *B. tropica* de la Figura 14, después de la hibridación con el gen *nifHDK* de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>.

### Detección por RFLP's de los genes 16S rRNA, *recA* y *nifHDK*.

Los RFLP's del gen 16S rRNA de cepas representativas de *B. unamae*, en general son idénticos, independientemente del genotipo ARDRA, excepto para dos de las cepas analizadas (M2Cy-711 y CGC-321) las cuales presentan una banda de hibridación extra de aproximadamente 4.6 kb y 4.2 kb respectivamente (Tabla 9). Los RFLP's de *B. unamae* se muestran en la Figura 15.

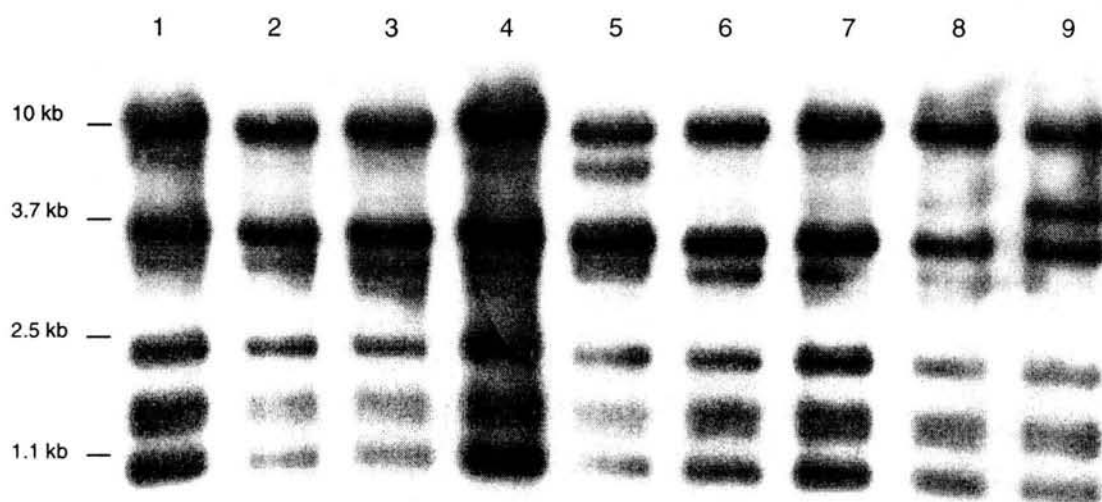


Figura 15. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI*, de cepas de *B. unamae*, después de la hibridación con un fragmento interno del gen 16S rRNA de *E. coli*. Carril 1, MTI-641<sup>T</sup>; carril 2, CGC-72; carril 3, SCCu-23; carril 4, MEd-9573; carril 5, M2Cy-711; carril 6, MCo-762; carril 7, CAC-98; carril 8, SCZa-452; carril 9, CGC-321.

Tabla 9. Tamaños de los RFLP's del gen 16S rRNA, de cepas de *B. unamae*

Genotipo	Cepas	Tamaños de los RFLP's del gen 16S rRNA (kb):
13	CAC-98, MCo-762 y SCZa-452	10, 3.8, 3.5, 2.3, 1.6, 1.4, 1.1
14	CGC-321	10, 4.2, 3.8, 3.5, 2.3, 1.6, 1.4, 1.1
15	MTI-641 <sup>T</sup> , CGC-72, SCCu-23 y MEd-9573	10, 3.8, 3.5, 2.3, 1.6, 1.4, 1.1
15	M2Cy-711	10, 4.6, 3.8, 3.5, 2.3, 1.6, 1.4, 1.1

Se resaltan las diferencias en tamaño de las bandas de hibridación.

Los RFLP's del gen 16S rRNA de *B. tropica* MTo-16 y MCo-842 que pertenecen al genotipo 19 son iguales. También las cepas Ppe8<sup>T</sup>, MTo-293, MTo-672 y MTI-582 presentan patrones de hibridación iguales, aunque pertenecen a diferentes genotipos. En contraste en la cepa MCo-725 se observó un patrón distinto, por presentar dos bandas extras (Tabla 10). Los RFLP's de *B. tropica* se muestran en la Figura 16.

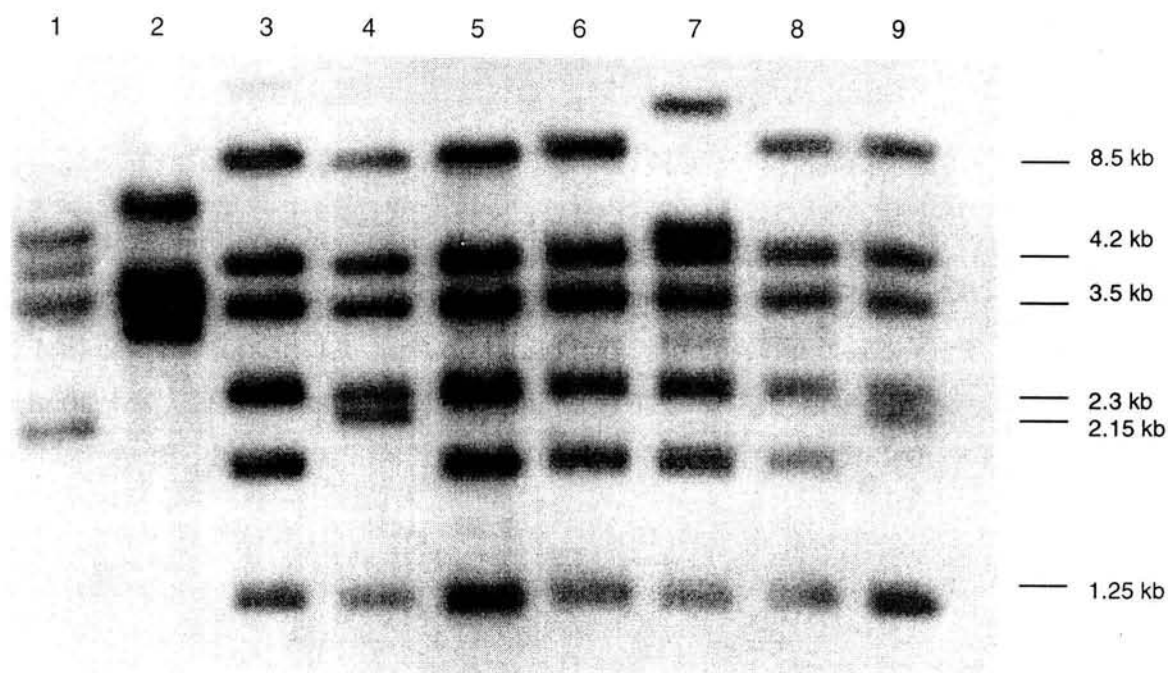


Figura 16. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total de cepas de diferentes especies de *Burkholderia* digerido con la enzima *EcoRI*, después de la hibridación con un fragmento interno del gen 16S rRNA de *E. coli*. Carril 1, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>; carril 2, *B. vietnamensis* TVV75<sup>T</sup>; carriles 3-9, *B. tropica* Ppe8<sup>T</sup>, MTo-16, MTo-293, MTo-672, MCo-725, MTI-582 y MCo-842.

Tabla 10. Tamaños de los RFLP's del gen 16S rRNA, de cepas de *B. tropica*.

Genotipo	Cepa	Tamaños de los RFLP's del gen 16S rRNA (kb):
ARDRA		
16	MCo-725	12.7, 4.8, 4.3, 3.7, 2.4, 1.9, 1.2
16	MTI-582	10.2, 4.3, 3.7, 2.4, 1.9, 1.2
17	MTo-672	10.2, 4.3, 3.7, 2.4, 1.9, 1.2
19	Ppe8 <sup>T</sup> y MTo-293	10.2, 4.3, 3.7, 2.4, 1.9, 1.2
19	MTo-16 y MCo-842	10.2, 4.3, 3.7, 2.4, 2.1, 1.2

Se resaltan las diferencias en tamaño de las bandas de hibridación.

Los RFLP's del gen *recA* de las cepas de *B. unamae* de los genotipos 14 y 15 presentan el mismo patrón de hibridación con una banda de 8.5 kb, en tanto que las cepas del genotipo 13 presentan una banda de 6.1 kb (Tabla 11). Se muestra los RFLP's de cepas de *B. unamae* en la Figura 17.

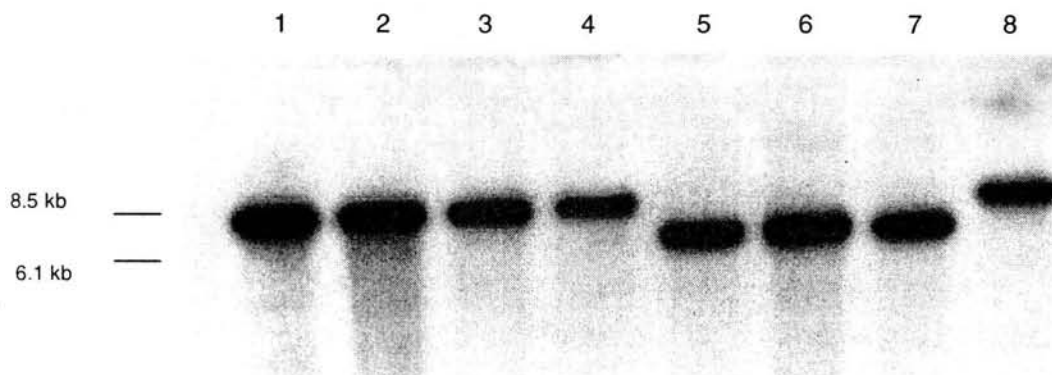


Figura 17. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI*, de cepas de *B. unamae*, después de la hibridación con el producto de PCR del gen *recA* de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>. Carril 1, MTI-641<sup>T</sup>; carril 2, CGC-72; carril 3, SCCu-23; carril 4, MEd-9573; carril 5, MCo-762; carril 6, CAC-382; carril 7, SCZa-452; carril 8, CGC-321.

Tabla 11. Tamaños de los RFLP's del gen *recA* de cepas de *B. unamae*.

Genotipo ARDRA	Cepa	Tamaños de los RFLP's del gen <i>recA</i> (kb):
13	MCo-762, CAC-382 y SCZa-452	6.1
14	CGC-321	8.5
15	MTI-641 <sup>T</sup> , CGC-72, SCCu-23 y MEd-9573	8.5

Los RFLP's del gen *recA* de las cepas de *B. tropica* se muestran en la Figura 18. Todas las cepas analizadas presentan dos bandas consistentes de 1.8 kb y 1.2 kb (Tabla 12).

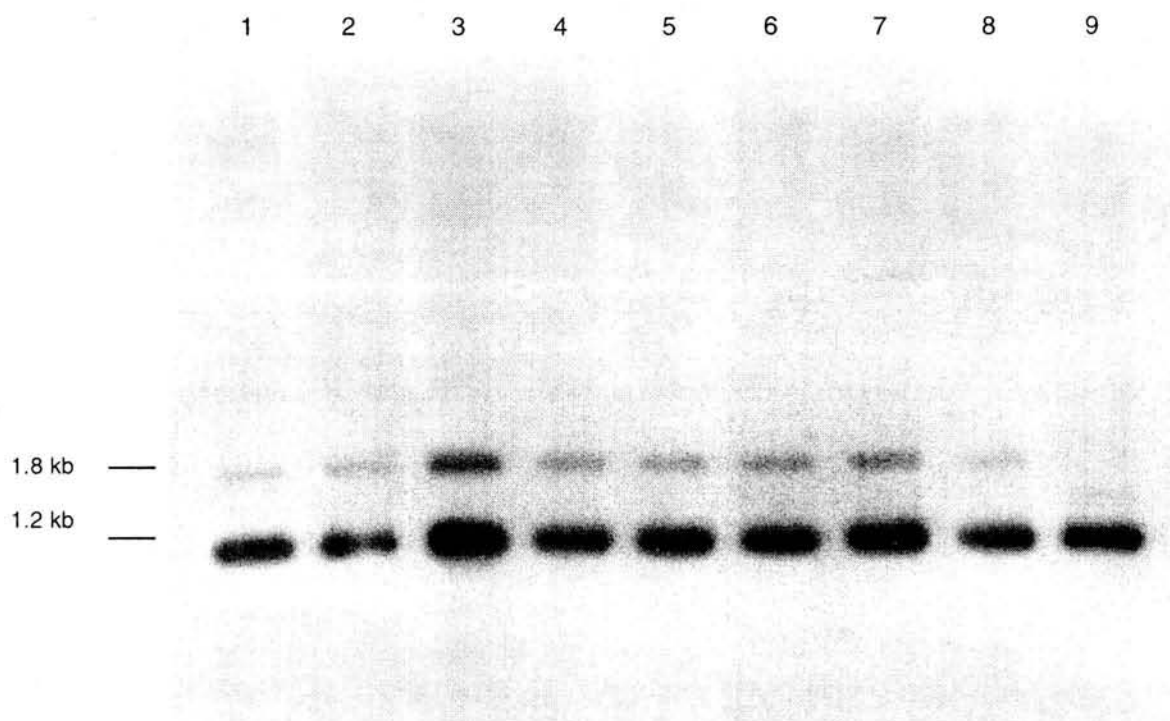


Figura 18. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI*, de cepas de *B. tropica*, después de la hibridación con el producto de PCR del gen *recA* de *B. tropica* MTo-293. Carril 1, Ppe8<sup>T</sup>; carril 2, MCh-1054; carril 3, MTo-293; carril 4, MCu-831; carril 5, TTe-225; carril 6, TSj-832; carril 7, MCo-9022; carril 8, MCo-761; carril 9, MCo-725.

Tabla 12. Tamaños de los RFLP's del gen *recA* de cepas de *B. tropica*.

Genotipo ARDRA	Cepa	Tamaños de los RFLP's del gen <i>recA</i> (kb):
16	MCo-725, MCh-1054 y TTe-225	1.8, 1.2
17	MCu-831, TSj-832 y MCo-9022	1.8, 1.2
19	Ppe8 <sup>T</sup> , MTo-293 y MCo-761	1.8, 1.2

Los RFLP's de los genes *nifHDK* que codifican para el componente I y II de la nitrogenasa de las cepas de *B. unamae* se muestra en la Figura 19. Solo se observó una banda de hibridación consistente para todas las cepas, independientemente del genotipo ARDRA (Tabla 13).

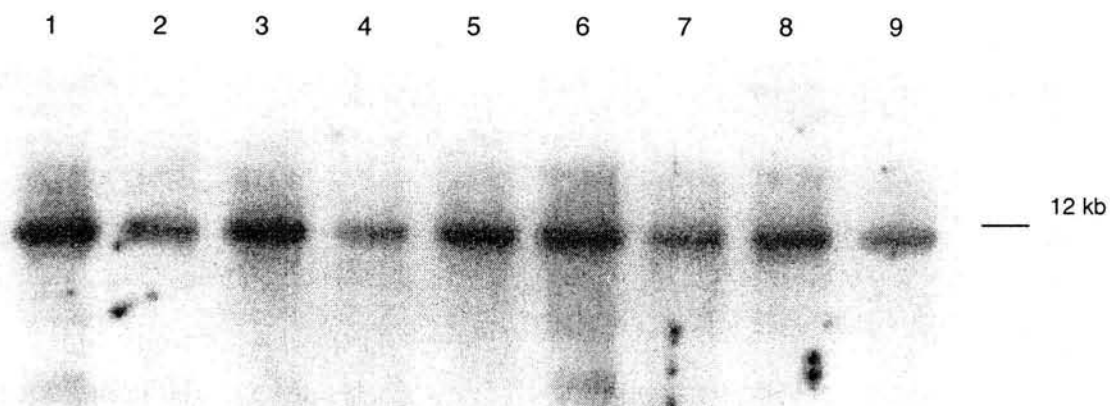


Figura 19. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI*, de cepas de *B. unamae*, después de la hibridación con el gen *nifHDK* de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>. Carril 1, MTI-641<sup>T</sup>; carril 2, MCo-762; carril 3, MEd-9573; carril 4, SCCu-23; carril 5, CAC-98; carril 6, CGC-321; carril 7, CGC-72; carril 8, M2Tu-2319; carril 9, SCZa-39.

Tabla 13. Tamaños de los RFLP's de los genes *nifHDK* de cepas de *B. unamae*.

Genotipo ARDRA	Cepa	Tamaños de los RFLP's del gen <i>nifHDK</i> (kb):
13	MCo-762, CAC-98, M2Tu-2319 y SCZa-39	12
14	CGC-321	12
15	MTI-641 <sup>T</sup> , MEd-9573, SCCu-23 y CGC-72	12

También los RFLP's de los genes *nifHDK* en las cepas de *B. tropica* muestran una banda consistente de aproximadamente 4.1kb (Tabla 14 y Figuras 20 y 20a).

Tabla 14. Tamaños de los RFLP's de los genes *nifHDK* de cepas de *B. tropica*.

Genotipo ARDRA	Cepa	Tamaños de los RFLP's del gen <i>nifHDK</i> (kb):
16	MCh-1054, TTe-225, MCo-725 y MTI-582	4.1
17	MCu-831, TSj-832, MCo-9022 y MTo-672	4.1
19	Ppe8 <sup>T</sup> , MTo-293, MCo-761, MTo-16 y MCu-842	4.1

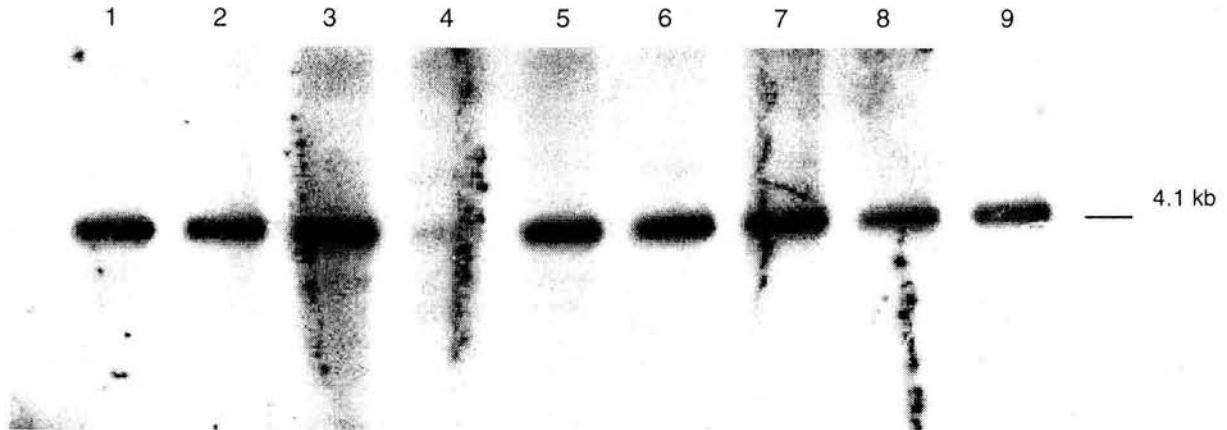


Figura 20. Autorradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI*, de cepas de *B. tropica*, después de la hibridación con el gen *nifHDK* de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>. Carril 1, Ppe8<sup>T</sup>; carril 2, MCh-1054; carril 3, MTo-293; carril 4, MCu-831; carril 5, TTe-225; carril 6, TSj-832; carril 7, MCA-9022; carril 8, MCo-761; carril 9, MCo-725.

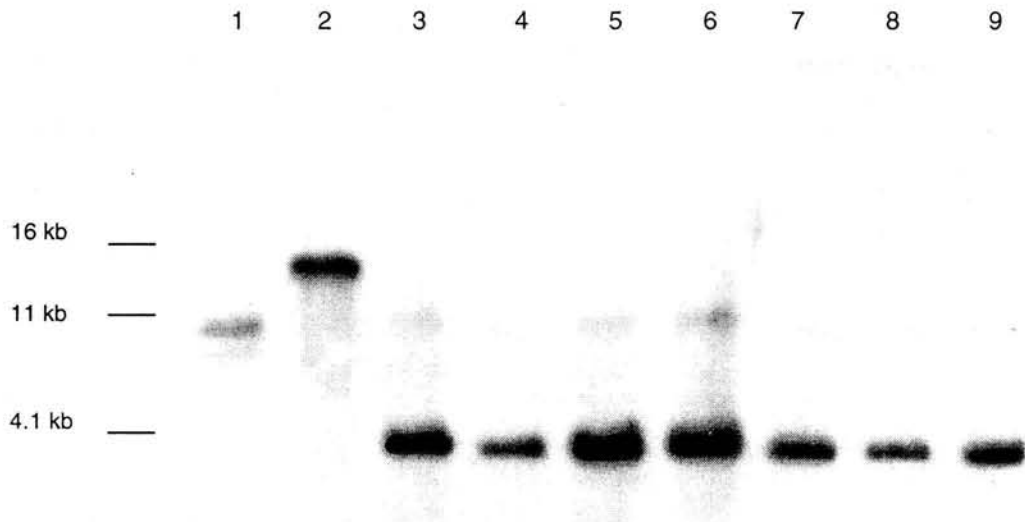


Figura 20a. Autorradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI* después de la hibridación con el fragmento del gen *nifHDK* de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>. Carril 1, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>; carril 2, *B. vietnamensis* TVV75<sup>T</sup>; carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9, *B. tropica* Ppe8<sup>T</sup>, MTo-16, MTo-293, MTo-672, MCo-725, MTI-582 y MCu-842.



Los ribotipos de distintas especies de *Burkholderia* se muestran en la Figura 21. En general, los ribotipos son claramente diferentes entre las especies analizadas. No obstante, entre cepas de una misma especie, por ejemplo, TVV75<sup>T</sup> y MMi-324 de *B. vietnamiensis* ó las cepas Ppe8<sup>T</sup> y MOc-725 de *B. tropica*, se detectaron ligeras diferencias en el RFLP. La mayoría de las cepas presentan una banda *Eco*RI de 3.7 kb común en todas las especies analizadas (Tabla 15).

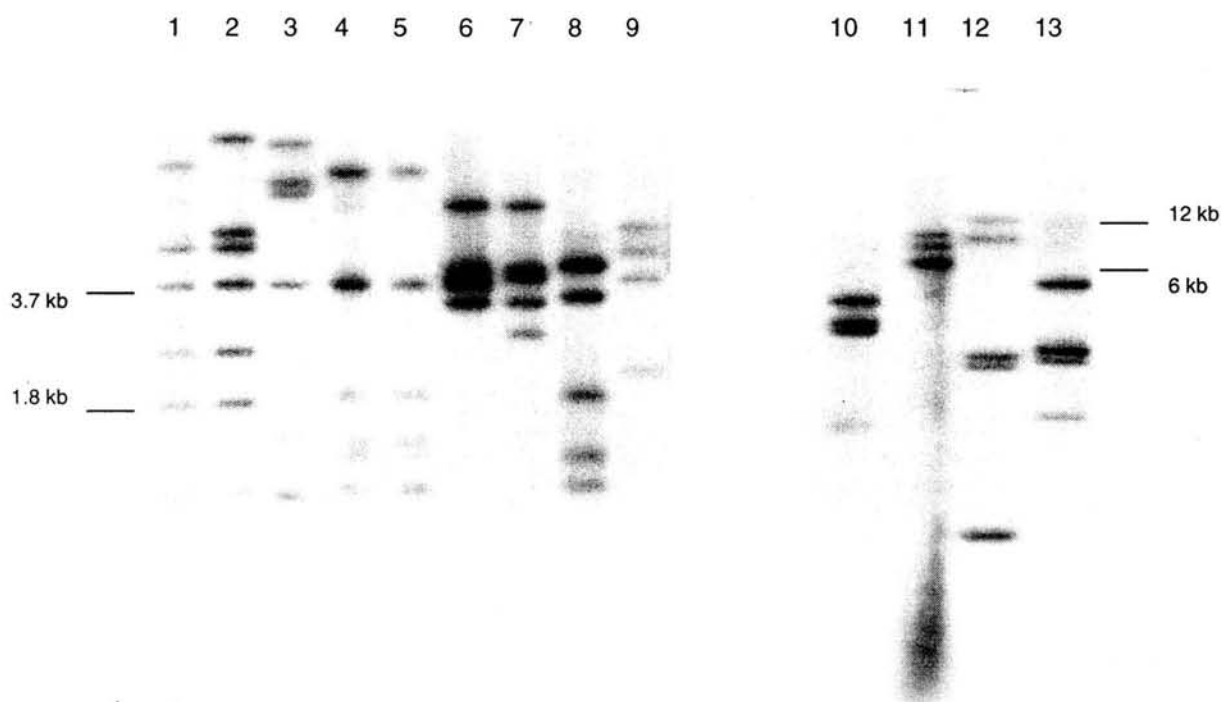


Figura 21. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *Eco*RI, de cepas de *Burkholderia* spp., después de la hibridación con el fragmento interno del gen 16S rRNA de *E. coli*. Carriles 1 y 2, *B. tropica* Ppe8<sup>T</sup> y MOc-725; carril 3, *B. sacchari* IPT101<sup>T</sup>; carriles 4 y 5, *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> y MOc-762; carriles 6 y 7, *B. vietnamiensis* TVV75<sup>T</sup> y MMi-324; carril 8, "*B. xenovorans*" CAC-124; carril 9, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>; carril 10, "*B. brasilensis*" M-130; carril 11, *B. tuberum* STM678<sup>T</sup>; carril 12, *B. phymatum* STM815<sup>T</sup>; carril 13, *B. cepacia* ATCC 25416<sup>T</sup>.

Los RFLP's del gen *recA* de *B. unamae*, *B. tropica* y de otras especies de *Burkholderia* analizadas se presentan en la Figura 22. En todas las especies se detectó un solo fragmento (*EcoRI*) de hibridación de tamaño variable (Tabla 15) pero en la mayoría de ellas con un tamaño en el rango de 1.1 kb a 1.8 kb.

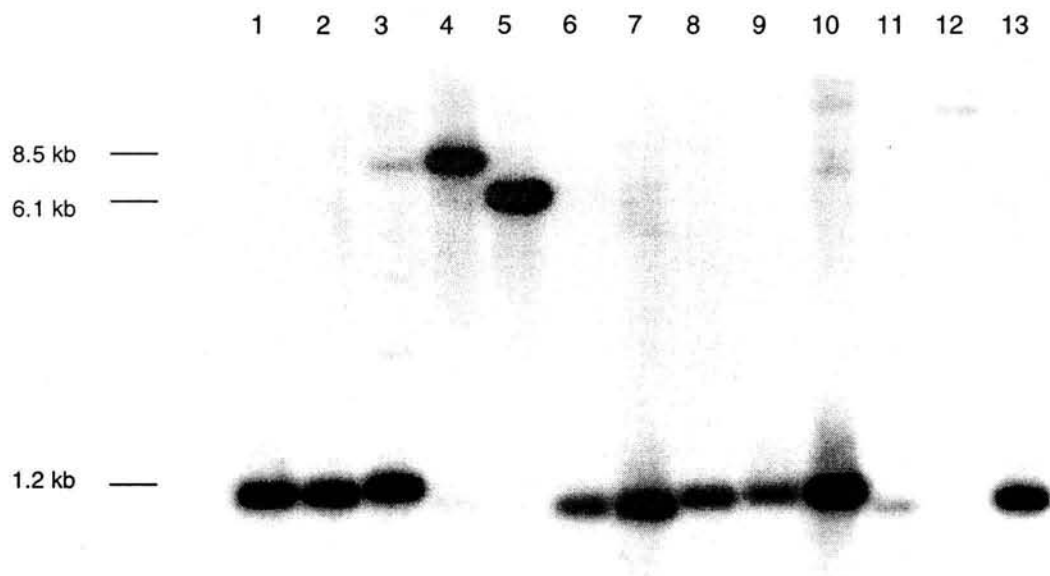


Figura 22. Autoradiografía tipo Southern blot de ADN total digerido con la enzima *EcoRI*, de cepas de *Burkholderia* spp., después de la hibridación con el producto de PCR del gen *recA* de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>. Carriles 1 y 2, *B. tropica* Ppe8<sup>T</sup> y MOc-725; carril 3, *B. sacchari* IPT101<sup>T</sup>; carriles 4 y 5, *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> y MOc-762; carriles 6 y 7, *B. vietnamensis* TVV75<sup>T</sup> y MMi-324; carril 8, "*B. xenovorans*" CAC-124; carril 9, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>; carril 10, "*B. brasilensis*" M-130; carril 11, *B. cepacia* ATCC 25416<sup>T</sup>; carril 12, *B. tuberum* STM678<sup>T</sup>; carril 13, *B. phymatum* STM815<sup>T</sup>.

En los RFLP's de las especies analizadas se detectaron una o dos fragmentos (*EcoRI*) de hibridación de los gen *nifHDK* de tamaño variable. En general, los fragmentos de hibridación correspondientes a los genes *nifHDK* fueron del mismo tamaño en una misma especie, con excepción en 2 especies supuestamente diferentes, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> y "*B. brasilensis*" M-130 las cuales presentaron el mismo patron de hibridación (Tabla 15). En las cepas correspondientes a especies no fijadoras de N<sub>2</sub>, *B. sacchari* IPT101<sup>T</sup> y *B. cepacia* ATCC25416<sup>T</sup> no se observaron señales de hibridación con los genes *nifHDK*.

Tabla 15. Tamaños de los RFLP's de lo genes *16S rRNA*, *recA* y *nifHDK* de especies de *Burkholderia*.

Especies	Cepas	Tamaños (kb) de los RFLP's de los genes:		
		16S rRNA	<i>recA</i>	<i>nifHDK</i>
<i>B. sacchari</i>	IPT101 <sup>T</sup>	>12, 9, 8.8, 3.7, 1.6, 1.2	1.3	—
<i>B. kururiensis</i>	KP23 <sup>T</sup>	5.5, 4.5, 3.2, 2.3	1.15	10
" <i>B. brasilensis</i> "	M-130	5.5, 4.5, 4.3, 2.3	1.14	10
<i>B. xenovorans</i>	CAC-124	4.1, 3.8, 2.1, 1.4, 1.2	1.16	1.5
<i>B. vietnamensis</i>	TVV75 <sup>T</sup>	9, 4.1, 3.7, 2.5	1.1	>17 y >12
<i>B. vietnamensis</i>	MMi-324	6, 4.1, 4, 3.5, 2.8	1.1	>12
<i>B. tuberum</i>	STM678 <sup>T</sup>	>12, 9, 8.8	12	7.5
<i>B. phymatum</i>	STM815 <sup>T</sup>	>12, 9.1, 4.2, 3.5, 1	1.17	>12 y 4
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416 <sup>T</sup>	6, 4, 3.2, 2.2	1.1	—
<i>B. unamae</i>	MTI-641 <sup>T</sup>	10, 3.2, 2.3, 1.6, 1.4, 1.1	8.5	12
<i>B. unamae</i>	MOC-762	10, 3.2, 2.3, 1.6, 1.4, 1.1	6.1	12
<i>B. tropica</i>	Ppe8 <sup>T</sup>	10.2, 4.3, 3.2, 2.4, 1.9, 1.2	1.8, 1.2	4.1
<i>B. tropica</i>	MCo-725	12.7, 4.8, 4.3, 3.2, 2.4, 1.9, 1.2	1.8, 1.2	4.1

(—) No detección.

### Detección de los marcadores moleculares *cbIA*, BCESM e *IS1363*.

En las cepas de *B. unamae* y *B. tropica* mediante ensayos de PCR, no se detectaron los marcadores moleculares asociados con las clonas epidémicas de *B. cenocepacia*, de *B. cepacia* BC 20 y *B. cepacia* AU1510 (Tabla 16 y 17). En la Figura 23 se muestra un ejemplo de la amplificación del gen *cbIA* en las cepas epidémicas de *B. cenocepacia*. Los ensayos de amplificación fueron repetidos de 3 a 5 veces.

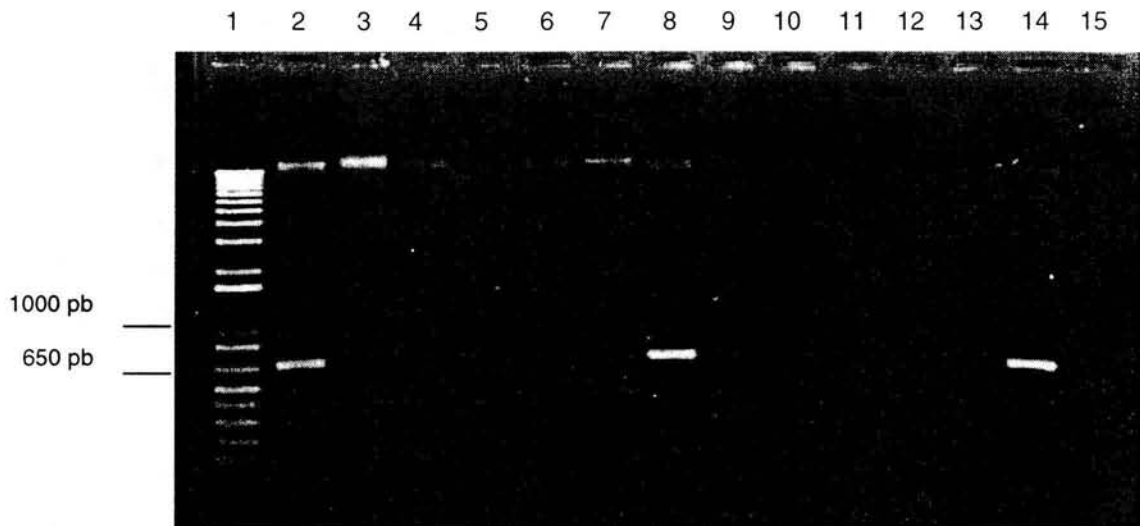


Figura 23. Amplificación del gen *cbIA* por PCR. Carril 1, Marcador 1kb plus; carril 2, *B. cenocepacia* BC7; carriles 3, 4, 5, 6 y 7, *B. tropica* MTo-293, MOc-725, MTo-672, Ppe8<sup>T</sup> y MCo-831; carril 8, *B. cenocepacia* BC5; carriles 9, 10, 11, 12 y 13, *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>, MCo-762, SCCu-23, CGC-321 y CAC-98; carril 14, *B. cenocepacia* J2315<sup>T</sup>; carril 15, Control (agua).

Tabla 16 y 17. Búsqueda de marcadores moleculares epidémicos en cepas de *B. unamae* y *B. tropica*, mediante PCR.

Genotipo				
ARDRA	Cepa	<i>cbiA</i>	BCESM	<i>IS1363</i>
13	MCo-762	—	—	—
13	M2Tu-2319	—	—	—
13	SCZa-39	—	—	—
13	SCZa-211	—	—	—
13	SCZa-452	—	—	—
13	CAC-98	—	—	—
13	CAC-382	—	—	—
14	M2Cy-626	—	—	—
14	CGC-321	—	—	—
15	MTI-641	—	—	—
15	M2Cy-711	—	—	—
15	MEd-9573	—	—	—
15	SCCu-22	—	—	—
15	SCCu-23	—	—	—
15	SCZa-121	—	—	—
15	CAC-112	—	—	—
15	CGC-72	—	—	—
15	CGC-316	—	—	—
15	C2RT-2811	—	—	—
15 <sup>a</sup>	M2Cy-717	—	—	—

(—) Falta de amplificación.

Genotipo				
ARDRA	Cepa	<i>cbiA</i>	BCESM	<i>IS1363</i>
16	MCh-1054	—	—	—
16	MOC-725	—	—	—
16	MTe-73523	—	—	—
16	MTe-7363	—	—	—
16	MTI-582	—	—	—
16	TTe-225	—	—	—
17	MCa-9022	—	—	—
17	MCo-7931	—	—	—
17	MCu-831	—	—	—
17	MMi-786	—	—	—
17	MSj-805	—	—	—
17	MTo-672	—	—	—
17	TSj-832	—	—	—
17	TTe-1910	—	—	—
19	MCo-761	—	—	—
19	MCu-82	—	—	—
19	MCu-842	—	—	—
19	MSj-8432	—	—	—
19	MTo-16	—	—	—
19	MTo-293	—	—	—
19	MCo-7531	—	—	—
19	MCo-8511	—	—	—
19	Ppe8 <sup>T</sup>	—	—	—

(—) Falta de amplificación.

En ninguna de las cepas de *B. unamae* y *B. tropica* se amplificaron por PCR el marcador molecular epidémico del complejo *B. cepacia* BCESM ni la secuencia de inserción *IS1363* (Tabla 16 y 17). Estos marcadores fueron detectados solamente en las cepas control de *B. cenocepacia* (Tabla 18). En la Figura 24 se muestra un ejemplo de la amplificación por PCR del marcador molecular BCESM y en la Figura 25 se muestra un ejemplo de la amplificación de la *IS1363* en las cepas control de *B. cenocepacia*.

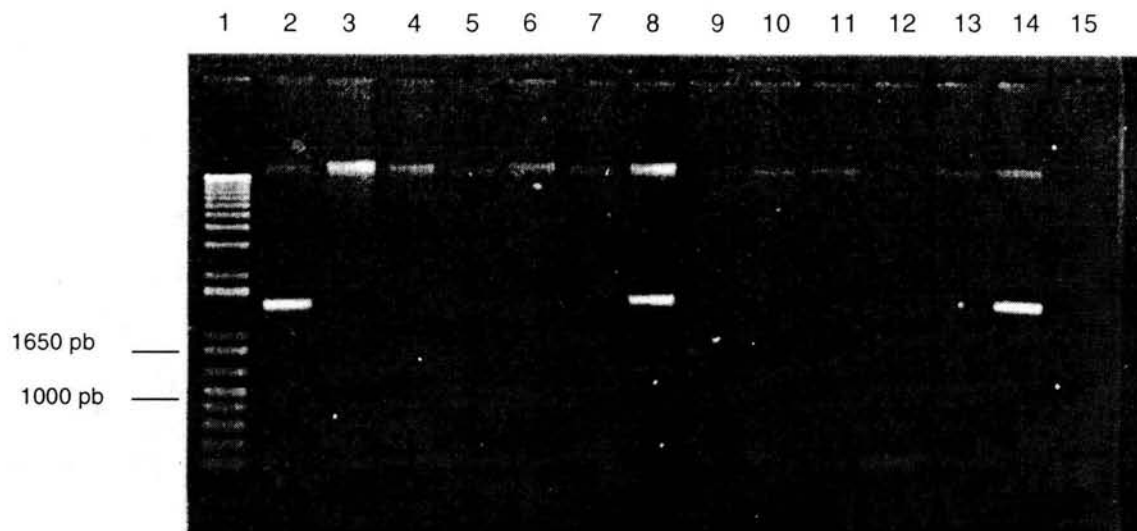


Figura 24. Búsqueda del marcador molecular BCESM mediante PCR. Carril 1, Marcador 1kb plus; carril 2, *B. cenocepacia* BC7 (Control positivo); carriles 3-7, *B. tropica* MTo-293, MOc-725, MTo-672, Ppe8<sup>T</sup> y MCo-842; carril 8, *B. cenocepacia* BC5 (Control positivo); carriles 9-13, *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>, MCo-762, SCCu-23, CGC-321 y CAC-98; carril 14, *B. cenocepacia* J2315<sup>T</sup> (Control positivo); carril 15, Control (agua).

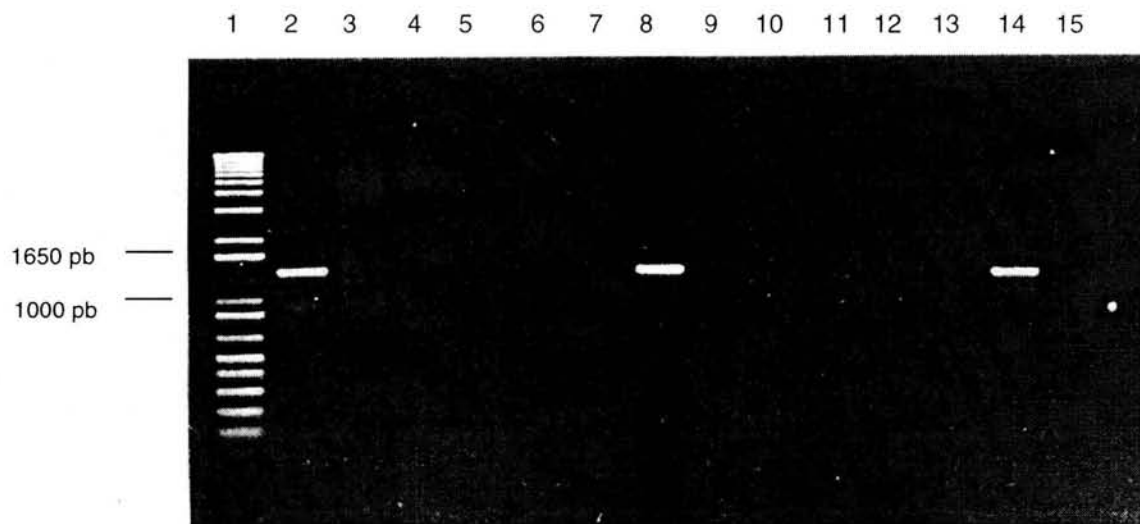


Figura 25. Búsqueda de la *IS1363* mediante PCR. Carril 1, Marcador 1kb plus; carril 2, *B. cenocepacia* BC38 (Control positivo); carriles 3-7, *B. tropica* MTo-293, MOc-725, MTo-672, Ppe8<sup>T</sup> y TTe-225; carril 8, *B. cenocepacia* A0007 (Control positivo); carriles 9-13, *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>, MCo-762, SCCu-23, CGC-321 y CAC-98; carril 14, *B. cenocepacia* J2315<sup>T</sup> (Control positivo); carril 15, Control (agua).

Tabla 18. Búsqueda de marcadores moleculares epidémicos en las diferentes especies de *Burkholderia*.

Especie	Cepa	<i>cblA</i>	<i>BCESM</i>	<i>IS1363</i>
<i>B. sacchari</i>	IPT101 <sup>T</sup>	—	—	—
<i>B. kururiensis</i>	KP23 <sup>T</sup>	—	—	—
" <i>B. brasilensis</i> "	M-130	—	—	—
" <i>B. xenovorans</i> "	CAC-124	—	—	—
" <i>B. xenovorans</i> "	LMG 16224	—	—	—
" <i>B. xenovorans</i> "	LMG 21463 <sup>T</sup>	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV75 <sup>T</sup>	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV72	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV115	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV127	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV69	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	J1647	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	C1704	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	MMi-324	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	MMi-302	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	CCE-101	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	CCE-303	—	—	—
<i>B. tuberum</i>	STM678 <sup>T</sup>	—	—	—
<i>B. phymatum</i>	STM815 <sup>T</sup>	—	—	—
<i>B. cepacia</i>	ATCC 25416 <sup>T</sup>	—	—	—
<i>B. cepacia</i>	BC 20	+	—	—
<i>B. cepacia</i>	AU1550	+	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	LMG 12614	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i>	J2315 <sup>T</sup>	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i>	A0007	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i>	BC 5	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i>	BC 7	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i>	BC 29	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i>	BC 38	+	+	+
<i>B. dolosa</i>	LMG 18941	—	—	—

(—) Falta de amplificación.

(+) Falta de amplificación.

## Discusión

---

En los años recientes se describió la existencia de varias especies fijadoras de N<sub>2</sub> desconocidas pertenecientes al género *Burkholderia* (Estrada-de los Santos *et al.* 2001). El análisis de numerosas cepas, basadas en los criterios de la taxonomía polifásica, condujo a la descripción de dos nuevas especies, *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado *et al.* en prensa) y *Burkholderia tropica* (Reis *et al.* en prensa), ambas especies relacionadas íntimamente con *Burkholderia sacchari* por el criterio de comparación de secuencias del gene 16S rRNA.

En el presente trabajo, por medio de los patrones de restricción del gene *recA*, el cual ha mostrado ser útil para la separación de especies cercanas (Karlin *et al.* 1995), se logró una clara separación de las especies *B. unamae*, *B. tropica* y *B. sacchari* como la lograda con los patrones de restricción del gene 16S rDNA. Además con la restricción del gene *recA* se confirma la separación filogenética de *B. unamae* y *B. tropica* de las especies incluidas en el complejo *B. cepacia*, particularmente de la especie tipo del género y de cepas epidémicas de *B. cenocepacia*. De acuerdo con los resultados de restricción del gene *recA* de la cepa KP23<sup>T</sup> de *B. kururiensis* y de la M-130 de "*B. brasilensis*" se concluye que son cepas estrechamente relacionadas, confirmándose la hipótesis de que ambas cepas constituyen una misma especie (Estrada-de los Santos *et al.* 2001). Además, los resultados del análisis de los patrones de restricción del gene *recA* muestran la utilidad para agrupar y diferenciar las especies del género *Burkholderia* así como para identificar nuevos aislados de este género.

Se sabe que el genoma de algunas especies del género *Burkholderia* está constituido por múltiples cromosomas y plásmidos (Wigley y Burton 2000). Nuestros resultados muestran que los genomas de *B. unamae* y de *B. tropica* también están constituidos por múltiples replicones. *B. unamae* y *B. tropica* presentan replicones mayores a 600 kb, similar a lo observado en *B. cepacia* ATCC25416<sup>T</sup>, en *B. multivorans* ATCC17616, ambas especies pertenecientes al complejo *B. cepacia* (Komatsu *et al.* 2003; Lessie *et al.* 1996; Rodley *et al.* 1995) y en *B. phymatum*



STM815<sup>T</sup> (Chen *et al.* 2003). A pesar de que la estrategia usada para determinar con exactitud el contenido de los replicones de las dos nuevas especies del género *Burkholderia*, nuestros resultados nos permite inferir, que el genoma de *B. unamae* varia de 3000 kb a 4000 kb en tanto que *B. tropica* tiene un genoma mayor a los 4000 kb; sin descartar la posibilidad de que hubiese replicones de mayor tamaño que no se lograron visualizar debido a las condiciones empleadas durante nuestros ensayos.

El tamaño del genoma de *B. unamae* y *B. tropica* concuerda con el tamaño de los genomas de algunas especies conocidas del género *Burkholderia*, en el rango de 4000 kb a 8000 kb (Lessie *et al.* 1996; Holmes *et al.* 1998; Wigley y Burton 2000). Las especies conocidas del género *Burkholderia* son reconocidas por su gran versatilidad metabólica, lo cual se atribuye a la complejidad de su genoma (Lessie *et al.* 1996). La similar estructura de los genomas de *B. unamae* y *B. tropica* sugiere que estas especies también son igualmente versátiles en su actividad metabólica. Con base en este conocimiento, será de gran valor el evaluar la capacidad de las especies *B. unamae* y *B. tropica* para degradar compuestos xenobióticos.

Los cromosomas bacterianos han sido definidos como replicones esenciales ya que contienen genes que codifican funciones indispensables para el crecimiento normal de las células (Moreno, 1988). Sobre esta base, la presencia de genes ribosomales en los replicones de mayor tamaño de *B. unamae* y *B. tropica*, por presentar señal de hibridación con el gene 16S rRNA, indicaría que corresponden a los cromosomas en ambas especies. La presencia de cromosomas múltiples ha sido observada en otras especies de *Burkholderia*, por ejemplo, en *B. cepacia* ATCC25416<sup>T</sup> los replicones de 3650 kb, 3170 kb y 1070 kb corresponden a cromosomas (Rodley *et al.* 1995).

Aun cuando se sabe de la presencia de dos copias del gene *recA* en cada uno de los cromosomas mas grandes de *B. cepacia* ATCC25416<sup>T</sup> (Rodley *et al.* 1995), en los replicones de *B. unamae* y *B. tropica* la ubicación del gene *recA* no es clara ni precisa ya que se observo señal de hibridación en todos los replicones presentes en ambas especies. Al parecer las condiciones de hibridación no fueron las óptimas ya que la cepa CFN 42<sup>T</sup> de *R. etli* y y la cepa 1021 de *S. meliloti*, usadas como controles, mostraron señal de hibridación con el gene *recA* en todos los replicones,

incluyendo los plasmidos. De acuerdo con la secuencia completa del genoma de las cepas control, el gene *recA* se encuentra localizado solamente en el cromosoma y no en los plasmidos. Las secuencias de los plasmidos de las cepas control antes mencionadas, están depositadas en las siguientes páginas web (<http://www.cifn.unam.mx/retliddb/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/chrom.cgi?gi=187&db=G>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=186>). Además, ensayos de hibridación tipo Southern con el fragmento parcial del gene *recA*, amplificado con los oligos R1 y R2 diseñados en este trabajo, en cepas de *B. unamae* y *B. tropica*, mostraron la presencia de solo una banda de hibridación, lo que indicaría la presencia de una sola copia del gen o de varias copias del gen idénticas en tamaño.

La ubicación de los genes *nifHDK* en *B. unamae* (cepas genotipo 13 y 14) y en las cepas de *B. tropica* fue detectada en los replicones de menor tamaño lo que pueden considerarse como plasmidos.

Para conocer la estructura genómica precisa (número y tamaño de replicones) de *B. unamae* y *B. tropica* será necesario de otra metodología diferente a la empleada en el presente trabajo, como la electroforesis de campos pulsados (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) que permite una mejor separación de los replicones y contiene mayor cantidad de ADN, lo cual es conveniente en los ensayos de hibridación. Con esta estrategia probablemente se podrá establecer la ubicación clara y concluyente de los genes 16S rRNA, del gene *recA* y de los genes *nifHDK* en los replicones de *B. unamae* y *B. tropica*.

Los ribotipos se han empleado en estudio de taxonomía polifásica como parte de la caracterización genómica de cepas analizadas (Vandamme *et al.* 1996). En el presente trabajo fue observado que los ribotipos *EcoRI* de *B. unamae*, *B. tropica* y de otras especies de *Burkholderia* son diferentes, por lo cual se podrá utilizar esta estrategia como un criterio adicional para la diferenciación e identificación de estas especies. La detección de más de una banda de hibridación con el gene 16S rDNA indica la presencia de más de una copia o de copias distintas del gene, ya que las secuencias del gene 16S rRNA tienen un solo sitio de restricción *EcoRI* (datos no mostrados). Tomando en cuenta que los genomas de *B. unamae* y *B. tropica* están

constituidos aparentemente por al menos dos cromosomas, es explicable la detección de varias bandas de hibridación en estas especies.

En estudios previos fue mostrado que las cepas de *B. unamae* y *B. tropica* tienen la capacidad de reducir acetileno (ARA) (Estrada-de los Santos, *et al.* 2001; Reis *et al.* en prensa; Caballero-Mellado *et al.* en prensa). En este estudio, la hibridación de los genes *nifHDK* observados en cepas de *B. unamae* y *B. tropica* confirman la capacidad de ambas especies para fijar nitrógeno. La presencia de una sola banda en los RFLP's de los genes *nifHDK* de *B. unamae* y *B. tropica* sugiere que estos genes se encuentran agrupados en un solo operon, situación similar a la observada en las arqueas y en la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Minerdi *et al.* 2001).

En ninguna de las cepas de *B. unamae* o de *B. tropica* fue detectado el gene *cbIA*, el cual ha sido involucrado con la adherencia específica a la mucina en casos de pacientes con FQ así como a las células epiteliales de las vías respiratorias (Kuehn *et al.* 1992; Saiman *et al.* 1990; Sajjan *et al.* 1993; Sajjan *et al.* 1995; Sajjan *et al.* 2000; Sun *et al.* 1995). Cepas de todas las especies del complejo *B. cepacia* han sido aisladas de pacientes con FQ, no obstante, prevalece la infección oportunista por *B. cenocepacia* y *B. multivorans* (Coenye and Vandamme, 2003). El gene *cbIA* se ha detectado casi exclusivamente, con muy pocas excepciones, en cepas de las especies del complejo *B. cepacia* (Richardson *et al.* 2001) por lo que ha sido considerado el marcador molecular mas específico para las cepas epidémicas (Clode *et al.* 2000) particularmente de la especie *B. cenocepacia* (Sajja *et al.* 2003).

El gene *esmR*, usado como marcador de cepas de *B. cepacia* epidémicas (BCESM), no fue detectado en ninguna de las cepas de *B. unamae* o de *B. tropica* analizadas. Estos resultados confirman que la presencia del BCESM no es común entre aislados ambientales (Mahenthiralingam *et al.* 1997). También la presencia del BCESM no es común en cepas no epidémicas aisladas de pacientes con FQ, sin embargo se ha detectado con mucha frecuencia en cepas epidémicas del complejo *B. cepacia* que han infectado numerosos pacientes con FQ (Mahenthiralingam *et al.* 1997). A pesar de que el gene *esmR* es un marcador menos específico que el *cbIA* (Clode *et al.* 2000), su presencia ha servido como referencia para detectar cepas,

principalmente de *B. cenocepacia*, que podrían tener una alta probabilidad de transmitirse entre el ambiente clínico.

En ninguna de las cepas de *B. unamae* ni de *B. tropica* se detectó la *IS1363*. Esta IS se ha detectado casi exclusivamente en cepas de los linajes clonales denominados ET12 y PHDC de *B. cenocepacia* aisladas de numerosos pacientes con FQ (Richardson *et al.* 2001), así como en algunas cepas de *B. cepacia* aisladas del suelo y en dos cepas de *B. ambifaria* aisladas de un suelo agrícola (Liu *et al.* 2003).

Aunque para asegurar que ninguno de los genes involucrados en la patogenicidad de *B. cenocepacia* estudiados en este trabajo se encuentre en el genoma de *B. unamae* y *B. tropica*, sería conveniente hacer ensayos tipo Southern utilizando como sonda los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los genes *cbIA* e *esmR* así como de la *IS1363* de *B. cenocepacia*.

La falta de detección de los genes *cbIA* y *esmR* así como de la *IS1363* en *B. unamae* y *B. tropica* abre una interesante expectativa para el uso de ambas especies en la agricultura, ya que tanto *B. unamae* como *B. tropica* promueven el crecimiento de las plantas de maíz bajo condiciones de invernadero (Caballero-Mellado *et al.* 2003). Además, ambas especies fijadoras de nitrógeno expresan la capacidad de producir sideróforos (Reis *et al.* en prensa; Tenorio-Salgado com. pers) los cuales pudieran desempeñar una importante función en el control biológico de fitopatógenos.

## Conclusión

---

El uso del gene *recA* sirve como una herramienta más para la sistemática molecular de las especies del género *Burkholderia*, que en conjunto con otros marcadores moleculares, como el gene 16S rRNA, sustenta las relaciones filogenéticas existentes dentro del género.

La organización genómica en *B. unamae* y *B. tropica* aparentemente está conformada por múltiples cromosomas y plásmidos de gran tamaño, similar a otras especies conocidas del género *Burkholderia*.

En las especies *B. unamae* y *B. tropica* fueron detectados los genes *nifHDK* involucrados en la fijación de nitrógeno.

La ausencia de los marcadores moleculares de virulencia (el gene *cbIA*, el gene *esmR* y la *IS1363*) en las cepas de *B. unamae* y *B. tropica*, sugiere que estas especies no tiene el potencial de las especies del complejo *B. cepacia* para infectar pacientes con FQ. No obstante, sería conveniente llevar a cabo estudios sobre la transposición de IS's, recombinación y transferencia horizontal en *B. unamae* y *B. tropica* para asegurar su uso tanto en agrobiotecnología como en biorremediación.

## Literatura citada

---

- Achouak, W., R. Christen, M. Barakat, M. H. Martel, and T. Heulin.** 1999. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 787-794.
- Alkorta, I., I. Amezaga, I. Albizu, A. Aizpurua, M. Onaindia, V. Buchner, and C. Garbisu.** 2003. Molecular microbial biodiversity assesment: a biological indicador of soil health. *Rev. Environ. Health* **18**: 131-151.
- Allardet-Servent, A., S. Michaux-Charachon, E. Jumasbilak, L. Karayan, and M. Ramuz.** 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.* **175**: 7869-7874.
- Amann, R., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1994. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* **60**: 360-365.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1987. *Current protocols in molecular microbiology*, N.Y: Jonh Wiley and Sons, Inc.
- Barea, J. M.** 1998. Biología de la rizosfera. *Investigación y Ciencia.* **256**: 74-81.
- Bevivino, A. C. Dalmastrri, S. Tabacchioni, and L. Chiarini.** 2000. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 on disease suppression and growth promotion of maize. *Biol. Fertil. Soil* **31**: 225-231.
- Bevivino, A., S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. V. Carusi, M. Del Gallo, and P. Visca.** 1994. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* **140**: 1069-1077.
- Bevivino, A., S. Sarrocco, C. Dalmastrri, S. Tabacchioni, C. Cantale, and L. Chiarini.** 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 225-237.
- Biddick, R., T. Spilker, A. Martin, and J. J. LiPuma.** 2003. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**: 57-62.

- Bloemberg, G. V., and B. J. J. Lugtenberg.** 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Op. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- Boddey, R. M., and J. Dobereiner.** 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research* **42**: 241-250.
- Boddey, R. M., and J. Dobereiner.** 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant Soil* **108**: 53-65.
- Bohannan, B. J., and J. Hughes.** 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 282-287.
- Brämer, C. O., P. Vandamme, L. F. da Silva, J. G. C. Gomez, and A. Steinbüchel.** 2001. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1709-1713.
- Brosius, J., T. J. Dull, D. D., Sleteer, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**: 107-127.
- Bull, A. T., M. Goodfellow, and J. H. Slater.** 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 219-252.
- Burkholder, W.H.** 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology.* **40**: 115-117.
- Caballero-Mellado, J., M. G. Carcaño-Montiel, and M. A. Mascarúa-Esparza.** 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Simbiosis* **13**: 243-353.
- Caballero-Mellado, J., L. López-Reyes, and R. Bustillos-Cristales.** 1999. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **178**: 283-288.
- Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, and P. Estrada-de los Santos.** *Burkholderia unamae* sp nov., a N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa).

- Caballero-Mellado, J., and E. Martínez-Romero.** 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1532-1537.
- Caballero-Mellado, J., and E. Martínez-Romero.** 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* **26**: 111-121.
- Caballero-Mellado, J., y M. Valdés.** 1983. Incidencia de *Azospirillum* en algunas gramíneas del trópico subhúmedo cálido de México. *Turrialba* **33**: 83-88.
- Cheng, H-P., and T. G. Leslie.** 1994. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *J. Bacteriol.* **176**: 4034-4042.
- Chen, W-M., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Béna, and C. Boivin-Masson.** 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* **185**: 7266-7272.
- Chiarini, L., A. Bevivino, S. Tabacchioni, and C. Dalmastri.** 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor* root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 81-87.
- Christiansen-Weniger, C.** 1998. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**: 55-76.
- Clode, F.E., M. E. Kaufmann, H. Malnick, and L. P. Tyrone.** 2000. Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and nonepidemic strains of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1763-1766.
- Coenye, T., J. J. LiPuma, D. Henry, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M. Gillis, D. P. Speert, and P. Vandamme.** 2001a. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 271-279.
- Coenye, T., E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. Speert, and P. Vandamme.** 2001b. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolated. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1481-1490.



- Coenye, T., and P. Vandamme.** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **5**: 719-729.
- Costacurta, A., and J. Vanderleyden.** 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**: 1-18.
- Daubaras, D. L., C. E. Danganan, A. Hübner, R. W. Ye, W. Hendrickson, and A. M. Chakrabarty.** 1996. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight. *Gene* **179**: 1-8.
- Di Cello, F., A. Bevivino, L. Chiarini, R. Fani, D. Paffetti, S. Tabacchioni, and C. Dalmastrì.** 1997. Biodiversity of *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4485-4493.
- Dixon, R., Q. Cheng, G. F. Sheng, A. Day, and M. Dowson-Day.** 1997. *Nif* gen transfer and expression in chloroplasts: prospects and problems. *Plant Soil* **194**: 193-203.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-González, J. Caballero-Mellado, J. F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, and Y. Okon.** 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 871-879.
- Dos Reis Junior, F. B., V. M. Reis, S. Urquiaga, and J. Dobereiner.** 2000. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant Soil* **219**: 153-159.
- Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Eisen, J. A.** 1995. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J. Mol. Evol.* **41**: 1105-1123.
- Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales, and J. Caballero-Mellado.** 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2790-2798.

- Fitz, Simmons. S.C.** 1993. The changing epidemiology of the cystic fibrosis. *J. Pediatrics* **122**: 1-9.
- Fuentes-Ramírez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, and E. Martínez-Romero.** 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**: 117-127.
- Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* **154**: 145-150.
- Galas, D. J., and M. Chandler.** 1989. Bacterial insertion sequences. p. 109-162. In: D. E. Berg and M. M. Howe, (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Gibson, R. L., J. L. Burns, and B. W. Ramsey.** 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**: 918-951.
- Gillis, M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, and M. P. Fernández.** 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 274-289.
- Glick, B. R., and Y. Bashan.** 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* **15**: 353-378.
- Glick, B. R.** 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**: 383-393.
- Goldstein, R., L. Sun, R-Z. Jiang, U. Sajjan, J. F. Forstner, and C. Campanelli.** 1995. Structurally variant classes of pilus appendage fibers coexpressed from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J. Bacteriol.* **177**: 1039-1052.
- Goris, J., P. De Vos, J. Caballero-Mellado, J-H, Park, E. Falsen, J. M. Tiedje, and P. Vandamme.** Classification of the PCB-and biphenyl degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa).

- Govan, J. R. W., P. H. Brown, J. Maddison, C. J. Doherty, J. W. Nelson, M. Dodd, A. P. Greening, and A. K. Webb.** 1993. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* **342**: 15-19.
- Govan, J. R. W., and V. Deretic.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**: 539-574.
- Govan, J. R., J. E. Hughes, and P. Vandamme.** 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J. Med. Microbiol.* **45**: 395-407.
- Graham, P. H., J. Bale, D. Baker, M. Fried, J. Roskoski, K. T. Mackay, and E. Craswell.** 1988. The contribution of biological nitrogen fixation to plant production: an overview of the symposium and its implications. *Plant Soil* **108**: 1-6.
- Hamosh, A., S. FitzSimons, M. Macek.** 1998. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J. Pediatrics* **132**: 255-259.
- Henry, D. A., M. E. Campbell, J. J. LiPuma, and D. P. Speert.** 1997. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 614-619.
- Hodson, M. E., and Geddes, D. M.** 1997. *Cystic Fibrosis*. Chapman & Hall Medical. London, UK.
- Holmes, A., J. Govan, and R. Goldstein.** 1998. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: A threat to human health? *Emer. Infect. Dis.* **4**: 221-227.
- Honeycutt, R. J., M. McClelland, and B. W. S. Sobral.** 1993. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **175**: 6945-6952.
- Hynes, M.F., and N. F. McGregor.** 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**: 567-574.
- Johnson, W. M., S. D. Tyler, and K. R. Rozee.** 1994. Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 924-930.

- Kang, H., S. Y. Hwang, Y. M. Kim, E. Kim, Y. S. Kim, S. K. Kim, S. W. Kim, C. E. Cerniglia, K. L. Shuttleworth, and G. J. Zylstra.** 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. *Can. J. Microbiol.* **49**: 139-144.
- Karlin, S., and L. Brocchieri.** 1996. Evolutionary conservation of *RecA* genes in relation to protein structure and function. *J. Bacteriol.* **178**: 1881-1894.
- Karlin, S., G. Weinstock, and V. Brendel.** 1995. Bacterial classifications derived from *RecA* protein sequence comparisons. *J. Bacteriol.* **177**: 6881-6893.
- Kirchhof, G., V. M. Reis, J. I. Baldani, B. Eckert, J. Dobereiner, and A. Hartmann.** 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil* **194**: 45-55.
- Klemm, P.** 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 321-340.
- Kolb, W., and P. Martin.** 1988. Influence of nitrogen on the number of N<sub>2</sub>-fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil. Biol. Biochem.* **20**: 221-225.
- Komatsu, H., Y. Imura, A. Ohori, Y. Nagata, and M. Tsuda.** 2003. Distribution and organization of auxotrophic genes on the multichromosomal genome of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *J. Bacteriol.* **185**: 3333-3343.
- Kosorok, M.R., W. H. Wei, and D. M. Farell.** 1995. The incidence of cystic fibrosis. Stat Lewis P. A. The epidemiology of cystic fibrosis. p. 1-13. In: Hedson M. E., Geddes, D. M., (eds)., *Cystics Fibrosis*. London: Chapman and May.
- Kosorok, M.R., W. H. Wei, and D. M. Farell.** 1996. The incidence of the Cystic Fibrosis. *Stat. Med.* **15**: 449-462.
- Krumme, M.L., K. N. Timmis, and D. F. Dwyer.** 1993. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4, 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2746-2749.
- Kuehn, M., K. Lent, J. Haas, J. Hagenzieker, M. Cervin, and A. L. Smith.** 1992. Fimbriation of *Pseudomonas cepacia*. *Infect. Immun.* **60**: 2002-2007.
- Lennon, E., and B. T. DeCicco.** 1991. Plasmids of *Pseudomonas cepacia* strains of diverse origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2345-2350.
- Lessie, T.G., W. Hendrickson, B. D. Manning, and R. Devereux.** 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**: 117-128.

- Lessie, T. G., and T. Gaffney.** 1986. Catabolic potencial of *Pseudomonas cepacia*. In Sokatch, J. R. (Ed.), *The Bacteria*, Vol. X. Academic Press, Orlando, FL. pp. 439-481.
- Lezana, J. L., D. Maza, y M. A. Lezana.** 1994. Fibrosis Quística en México: Análisis de sus principales aspectos epidemiológicos. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* **51**: 305-310.
- LiPuma, J. J., S. E. Dasen, D. W. Nielson, R. C. Stern, and T. L. Stull.** 1990. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet.* **336**: 1094-1096.
- LiPuma, J. J., T. Spilker, L. H. Gill, P. W. Campbell, L. Liu, E. and Mahenthalingam.** 2001. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* **164**: 92-96.
- Liu, L., T. Spilker, T. Coenye, and J. J. LiPuma.** 2003. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2471-2476.
- López, C. E., S. C. Ridaura, and C. G. López.** 1980. Cystic fibrosis in Mexican children. A report of 32 casos in 3260 consecutive autopsies. *Pathol.* **18**: 167-181.
- Lu, Z., H. Min, S. Wu, and A. Ruan.** 2003. Phylogenetic and degradation characterization of *Burkholderia cepacia* WZ1 degrading herbicide quinclorac. *J. Environ. Sci. Health B.* **38**: 771-782.
- Lugtenberg, B. J. J., T. F. C. Chin-A-Woeng, and G. V. Bloemberg.** 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 373-383.
- Macri, C.** 1997. Registro Latinoamericano de Fibrosis Quística. Boletín informativo de la Asociación Latinoamericana de Fibrosis Quística. L997:58-63.
- Mahenthalingam, E., D. A. Simpson, and D. A. Speert.** 1997. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 808-816.
- Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725-774.

- Malik, K. A., R. Bilal, S. Mehnaz, G. Rasul, M. S. Mirza, and S. Ali.** 1997. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil* **194**: 37-44.
- Martínez-Romero, E. and D. A. Phillips.** 2000. Biological nitrogen fixation. p. 492-505. In. *Encyclopedia of microbiology*. Vol. 1. 2da. ed. Academia Press.
- McInroy, J. A., and J. W. Kloepper.** 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* **173**: 337-342.
- McLoughlin, T.J., J. P. Quinn, A. Bettermann, and R. Bookland.** 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1760–1763.
- Mercado Cardenas, Ariel Oviden.** 2001. Fibrosis quística en México, visión de un problema actual de salud. Imprim. México. Descr. 18 p. Tesis Especialidad en Neumología Pediátrica-UNAM, Facultad de Medicina.
- Michaux, S., J. Paillisson, M. Charles-Nurit, G. Bourg, A. Allardet-Servent, and M. Ramuz.** 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* **175**: 701-705.
- Minerdi, D., R. Fani, R. Gallo, A. Boarino, and P. Bonfante.** 2001. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 725–732.
- Mohr, C. D., M. Tomich, and C. A. Herfst.** 2001. Cellular aspects of *Burkholderia cepacia* infection. *Microbes Infection* **3**: 425-435.
- Mooi, F. R., and F. K. DeGraaf.** 1985. Molecular biology of fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **118**: 119–138.
- Moreno, E.** 1988. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol. Lett.* **22**: 255-275.
- Morris, C. E., M. Bardin, O. Berge, P. Frey-Klett, N. Fromin, H. Girardin, M. H. Guinebretiere, P. Lebaron, J. M. Thiery, and M. Troussellier.** 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **66**: 592-616.

- Mulder, E. G., T. A. Lie, and A. Houwers.** 1977. The importance of legumenes under temperate conditions. p. 221-242. In. A treatise on dinitrogen fixation. Section IV. Agronomy and Ecology. R.W.F. Hardy and A.M. Gibson (eds). John Willey.
- Nelson, J. W., S. L. Butler, D. Krieg, and J. R. W. Govan.** 1994. Virulence factors of *Burkholderia cepacia*. FEMS Inmmu. Med. Microbiol. **8**: 89-98.
- Okon, Y., and C. A. Labandera.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. **26**: 1591-1601.
- Oliver, A., R. Cantón, P. Campo, F. Baquero, and J. Blázquez.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science **288**: 1251-1253.
- Orenstein, D. M., B. J. Rosenstein, R. C. Stern.** 2000. Cystic Fibrosis: Medical Care. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- O'Sullivan, D. J., and F. O'Gara.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rev. **56**: 662-676.
- Pace, N. R.** 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. ASM News **62**: 463-470.
- Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science **276**: 734-740.
- Palus, J. A., J. Borneman, P. W. Ludden, and E. W. Triplett.** 1996. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. Plant Soil **186**: 135-142.
- Paredes-Cardona, E., M. Carcaño-Montiel, M. A. Mascarúa-Esparza, y J. Caballero-Mellado.** 1988. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. Rev. Lat-amer. Microbiol. **30**: 351-355.
- Peñaloza-Vázquez, A., G. L. Mena, L. Herrera-Estrella, and A. M. Bailey.** 1995. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosphate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 538:543.
- People, M. B., D. F. Herrigdge, and J. K. Ladha.** 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen fixation for sustainable agricultural production? Plant Soil **174**: 3-28.

- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, M. L. Girard, E. Calva, and R. Palacios.** 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigen family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 1170-1174.
- Reardon, K. F., D. C. Mosteller, J. B. Rogers, N. M. DuTeau, and K. H. Kim.** 2002. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacteria cultures. Environ. Health Perspect. **110**: 1005-1011.
- Reinhold-Hurek, B., and T. Hurek.** 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. **6**: 136-144.
- Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, V. L. D. Baldani, M. Schmid, J. I. Baldani, J. Balandreau, A. Hartmann, and J. Caballero-Mellado.** *Burkholderia tropica* sp nov.: a new nitrogen-fixing, plant-associated bacterial species in the genus *Burkholderia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (en prensa).
- Richardson, J., D. E. Stead, and R. H. A. Coutts.** 2001. Incidence of the *cbIA* major subunit pilin gen amongst *Burkholderia* species. FEMS Microbiol. Letters. **196**: 61-66.
- Rodley, P.D., U. Römling, and B. Tümmler.** 1995. Physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. Mol. Microbiol. **17**: 57-67.
- Romero, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M. L. Girard, R. Palacios, and G. Dávila.** 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. **173**: 2435-2441.
- Rosenstein, B., and P. Zeitlin.** 1998. Cystic Fibrosis. Lancet. **351**: 227-282.
- Roy, R. N., R. V. Misra, and A. Montanez.** 2002. Decreasing reliance on mineral nitrogen-yet more food. Ambio **31**: 177-183.
- Roze, K., D. Haase, N. MacDonald, and W. Johnson.** 1994. Comparison by extended ribotyping of *Pseudomonas cepacia* isolates from cystic fibrosis patients with acute and chronic infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 181-186.
- Saiman, L., G. Cacalano, and A. Prince.** 1990. *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. **58**: 2578-2584.



- Sainju, U. M., W. F. Whitehead, and B. P. Singh.** 2003. Agricultural management practices to sustain crop yields and improve soil and environmental qualities. *Scientific World Journal* **3**: 768-789.
- Sajjan, U. S., and J. F. Forstner.** 1993. Role of a 22-kilodalton pilin protein in binding of *Pseudomonas cepacia* to buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **61**: 3157-3163.
- Sajjan, U. S., L. Sun, R. Goldstein, and J. F. Forstner.** 1995. Cable (Cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: nucleotide sequence of the *cblA* major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *J. Bacteriol.* **177**: 1030-1038.
- Sajjan, U. V., F. A. Silvestre, and J. F. Forstner.** 2000. Cable-piliated *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**: 1787-1795.
- Sajjan, U. S., H. Xie, M. D. Lefebvre, M. A. Valvano, and J. F. Forstner.** 2003. Identification and molecular analysis of cable pilus biosynthesis genes in *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* **149**: 961-971.
- Segonds, Ch., T. Heulin, N. Marty and G. Chabanon.** 1999. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2201-2208.
- Segovia Gómez, Helberth Armando.** 2002. Aspectos epidemiológicos en pacientes con fibrosis quística a ingresados en el servicio de neumología pediátrica del Centro Médico Nacional "La Raza", revisión de 10 años. Imprim. México. 28 p. Tesis Especialidad en Pediatría Médica-UNAM, Facultad de Medicina.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stackebrandt, E., R. G. E. Murray, and H. G. Truper.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and relatives" *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:321-325.
- Sun, L., R-Z. Jiang, S. Steinbach, A. Holmes, C. Campanelli, J. Forstner, U. Sajjan, M. Riley, and R. Goldstein.** 1995. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF center epidemics in North America and Britain. *Nat. Med.* **1**: 661-666.

- Suwanto, A., and S. Kaplan, S.** 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragment identification, and gen localization. *J. Bacteriol.* **171**: 5840-5849.
- Tabacchioni, S. A. Bevivino, L. Chiarini, P. Visca, and M. Del Gallo.** 1993. Characteristics of two rhizosphere isolates of *Pseudomonas cepacia* and their potential plant-growth-promoting activity. *Microb. Rel.* **2**: 161-168.
- Tan, Z., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek.** 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gen pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* **5**: 1009-1015.
- Thanassi, D. G., and S. J. Hultgren.** 2000. Assembly of complex organelles: pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. *Methods* **1**: 111-126.
- Thomashow, L. S., D. M. Weller, R. F. Bonsall, and L. S. Pierson III.** 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 908-912.
- Torsvik, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae.** 1992. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 782-787.
- Trân Van, V., O. Berge, S. Ngô Ké, J. Balandreau, and T. Heulin.** 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* **218**: 273-284.
- Trân Van, V., P. Mavingui, O. Berge, J. Balandreau, and T. Heulin.** 1994. Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfaté acide du Viêt-nam. *Agronomie* **14**: 697-707.
- Uhlín, B. E., M. Baga, M. Goransson, F. P. Lindberg, B. Lund, M. Norgren, and S. Normark.** 1985. Genes determining adhesion formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **118**: 163-178.
- Vandamme, P., D. Henry, T. Coenye, S. Nzula, M. Vancanneyt, J. J. LiPuma, D. P. Speert, J. R. W. Govan, and E. Mahenthiralingam.** 2002a. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **33**: 143-149.

- Vandamme, P., B. Holmes, T. Coenye, J. Goris, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, and J. R. W. Govan.** 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to and old story. Res. Microbiol. **154**: 91–96.
- Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters, and J. R. W. Govan.** 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 1188-1200.
- Vandamme, P., J. Goris, W-M. Chen, P. de Vos, and A. Willems.** 2002b. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. **25**: 507-512.
- Vandamme, P., E. Mahenthiralingam, B. Holmes, T. Coenye, B. Hoste, P. De Vos, D. Henry, and D. P. Speert.** 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J. Clin Microbiol. **38**: 1042–1047.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. **60**: 407-438.
- Verma, S. C., J. K. Ladha, and A. K. Tripathi.** 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J. Biotechnol. **91**: 127-141.
- Vermis, K., T. Coenye, J. J. LiPuma, H. J. Nelis, and P. Vandamme.** 2003. *Burkholderia dolosa* sp. nov., a formal name for *Burkholderia cepacia* genomovar VI. [WWW document] URL <http://allserv.rug.ac.be/~tcoenye/cepacia/abstractsLondon2003.pdf>.
- Viallard, V., I. Poirier, B. Couroyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Ophel-Keller, and J. Balandreau.** 1998. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 549-563.

- Vidaver, A. K., M. P. Doyle, P. J. Gerone, C. F. Gonzalez, P. Hall, J. C. Hunter-Cevera, R. Loria, R. L. Newsome, S. H. Shore, and T. Wilkins. 1999. *Burkholderia cepacia*-friend or foe? ASM News **65**: 587.
- Woods, D. E., and P. A. Sokol. 2000. The genus *Burkholderia*. Martin Dwoekin (ed.), *In. The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Inc., New York, N.Y. [On line]. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/index.htm>
- Wigley, P., and N. F. Burton. 2000. Multiple chromosomes in *Burkholderia cepacia* and *B. gladioli* and their distribution in clinical and environmental strains of *B. cepacia*. J. Appl. Microbiol. **88**: 914-918.
- Wise, M. G., L. J. Shimkets, and J. V. McArthur. 1995. Genetic structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1791-1798.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, Y. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. **39**: 1251-1275.
- Zhang, H., S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCA. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**: 743-749.