

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

FUNCIONALIDAD DE PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS DE *R. tropici* EN DISTINTOS FONDOS GENÉTICOS

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO ROGEL HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ESPERANZA

MARTÍNEZ ROMERO

MÉXICO, D. F.



SEPTIEMBRE 2005.

COORDINACIÓN

m347770



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

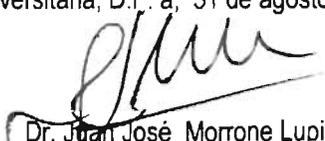
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de agosto del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Rogel Hernández Marco Antonio** con número de cuenta **501048848** con la tesis titulada: "**Funcionalidad de plásmidos simbióticos de R. tropici en distintos fondos genéticos**", bajo la dirección del(a) **Dra. Esperanza Martínez Romero**.

Presidente: Dr. José Luis Puente  
Vocal: Dra. Mónica Rosenblueth Laguette  
Secretario: Dra. Esperanza Martínez Romero  
Suplente: Dr. Rafael Camacho Carranza  
Suplente: Dr. Mario Soberón Chávez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 31 de agosto del 2005



Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

La presente tesis se realizó dentro del programa de Ecología Genómica en el Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Esperanza Martínez Romero.

Esta tesis fue realizada en parte por el apoyo del proyecto de DGAPA, PAPIIT IN205802-3 UNAM. Responsable del proyecto, Dra. Esperanza Martínez Romero.

Comité Tutorial:

Dra. Esperanza Martínez Romero.

Dr. Miguel Angel Carlos Cevallos Gaos.

Dr. Mario Soberón Chavez.

## AGRADECIMIENTOS.-

Agradezco a mis padres, la Sra. Ma. Isabel Hernández Hernández y al Sr. Estanislao Rogel por su apoyo moral durante la realización de esta tesis, y a mis hermanos.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero por la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio.

Al Dr. M. Hynes, Dr. Ismael Hernández Lucas, Dr. Pablo Vinuesa y a la Dra. Diana S. Leal K. por las cepas que me proporcionaron para la realización de este trabajo.

A los Dres. del Comité Tutoral durante el desarrollo de la tesis y al Jurado de Tesis por sus valiosos comentarios.

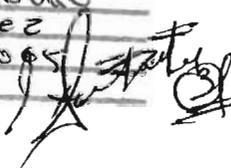
A mis amigos, compañeros de trabajo y a Aline gracias por todo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marco Antonio

Rogel Hernández

FECHA: 12/09/2005

FIRMA: 

## RESUMEN DE TESIS.-

### “Funcionalidad de plásmidos simbióticos de *R. tropici* en distintos fondos genéticos”

Las bacterias de rhizobia son capaces de formar nódulos y fijar nitrógeno en diferentes leguminosas. Estas bacterias pertenecen a la subclase  $\alpha$  de las *Proteobacterias* (Ludwing et al., 1998). Dentro de este grupo bacteriano existen otras bacterias que naturalmente no nodulan ni fijan nitrógeno tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* y *Ensifer adhaerens*, pero mediante la transferencia de un plásmido simbiótico (pSym) de *R. tropici* son capaces de adquirir características de simbiontes mutualistas (Martínez et al., 1987, Rogel et al., 2001). En este trabajo se propuso transferir el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 a *Brucella melitensis* 16M, *Ochrobactrum anthropi* 24566, *O. anthropi* 33786, *Sinorhizobium meliloti* SmA818 y *S. meliloti* SmA146, de las cuales solamente *S. meliloti* es capaz de nodular y fijar nitrógeno naturalmente. El género de *Brucella* que es un patógeno de mamíferos se encuentra relacionado filogenéticamente al grupo de rhizobia, por lo que resultó interesante transferirle el pSym de *R. tropici*, al igual que *O. anthropi* que es el pariente más cercano de *B. melitensis*. *S. meliloti* es uno de los simbiontes más estudiados por lo que también resultó interesante transferirle el pSym de *R. tropici* y en este caso para evitar alguna incompatibilidad funcional con el plásmido simbiótico residente se utilizaron bacterias curadas parcial y totalmente de su pSym.

El pSym de *R. tropici* CFN299 fue marcado con un transposón (Tn5mob) que es resistente a neomicina, la transferencia de este plásmido hacia los tres diferentes géneros se realizó mediante una cruce biparental, la selección de las transconjugantes se realizó en un medio de cultivo selectivo donde no crece la cepa donadora con la adición de neomicina. Mediante la técnica de Eckhardt se pudo observar el pSym transferido en *O. anthropi* y *S. meliloti*, la presencia del plásmido simbiótico en *Brucella* se detectó mediante la resistencia al antibiótico. Se realizaron ensayos de nodulación en plantas de frijol en los cuales las transconjugantes de *Brucella* llegan a formar esporádicamente algún pseudonódulo, las transconjugantes de *Sinorhizobium* sí forman nódulos que en su mayoría no están bien definidos pero no fijan nitrógeno, y las transconjugantes de *Ochrobactrum* sí forman nódulos fijadores de nitrógeno por lo que se decidió realizar una caracterización un poco más fina de las transconjugantes de *O. anthropi* 24566 que son las que mejor fijan nitrógeno. Se seleccionaron 3 transconjugantes de *O. anthropi* 24566 que se denominaron genotipo 1, genotipo 2 y genotipo 3 de acuerdo al patrón de plásmidos que presentaba cada una de ellas. El genotipo 1 es el que mejor fijó nitrógeno y es en el cual se puede observar que el pSym de *R. tropici* conserva el tamaño original. En los genotipos 2 y 3 se pueden observar posibles rearreglos entre plásmidos.

En otros experimentos, con la utilización de un transposón que lleva un gen reportero (*gusA*) se marcó a *O. anthropi* 24566 previo a la transferencia del pSym de *R. tropici* para poder medir la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa en nodulación y poder descartar la posibilidad de que los nódulos estuvieran siendo generados por contaminantes de la cepa donadora. Se obtuvo una transconjugante de *O. anthropi* 24566 *gusA*+ constitutiva, (en presencia del sustrato X-gluc ésta se torna de color azul) y otra *gusA*- constitutiva (que continúa siendo blanca en presencia del sustrato), se procedió al aislamiento de los bacteroides en PYX-gluc que es un medio de cultivo no selectivo y donde pueden crecer tanto las transconjugantes como la cepa donadora.

Todos los aislados que se obtuvieron de la transconjugante gusA+ constitutiva se tornaron azules y los aislados que se obtuvieron de la transconjugantes gusA- continuaban blancas y con el fenotipo característico de *O. anthropi*. De estos mismos aislados se seleccionaron algunos al azar y se les realizó un PCR mediante la técnica de PCR-BOX, que nos genera una huella genómica, dicha huella genómica corresponde al patrón que se genera de *O. anthropi* 24566. No se pudo amplificar los genes *nod* y *nifH* a partir de ADN de *O. anthropi* pero la secuencia del gen 16 S ribosomal nos confirma que las bacterias con las que trabajamos sí corresponden al género de *Ochrobactrum*. Diferentes transconjugantes de *O. anthropi* 24566 se inocularon en plantas de *Leucaena* que es un hospedero natural de *R. tropici*, en dichas plantas las transconjugantes son capaces de formar nódulos pero no fijan nitrógeno.

Mediante microscopía electrónica se pudo observar que las transconjugantes de *O. anthropi* 24566 sí son capaces de transformarse a bacteroides pero no acumulan poly- $\beta$ -hydroxibutirato (PHB) como se puede observar en los bacteroides de *R. tropici* CFN299.

## INDICE.-

	Pag.
Introducción	1
Objetivos	11
Justificación	11
Materiales y Métodos	13
Resultados	22
Discusión	42
Conclusiones	46
Apéndice “A”	47
Apéndice “B”	48
Referencias Bibliográficas	49

## INTRODUCCIÓN.-

### Generalidades de *Rhizobium*.-

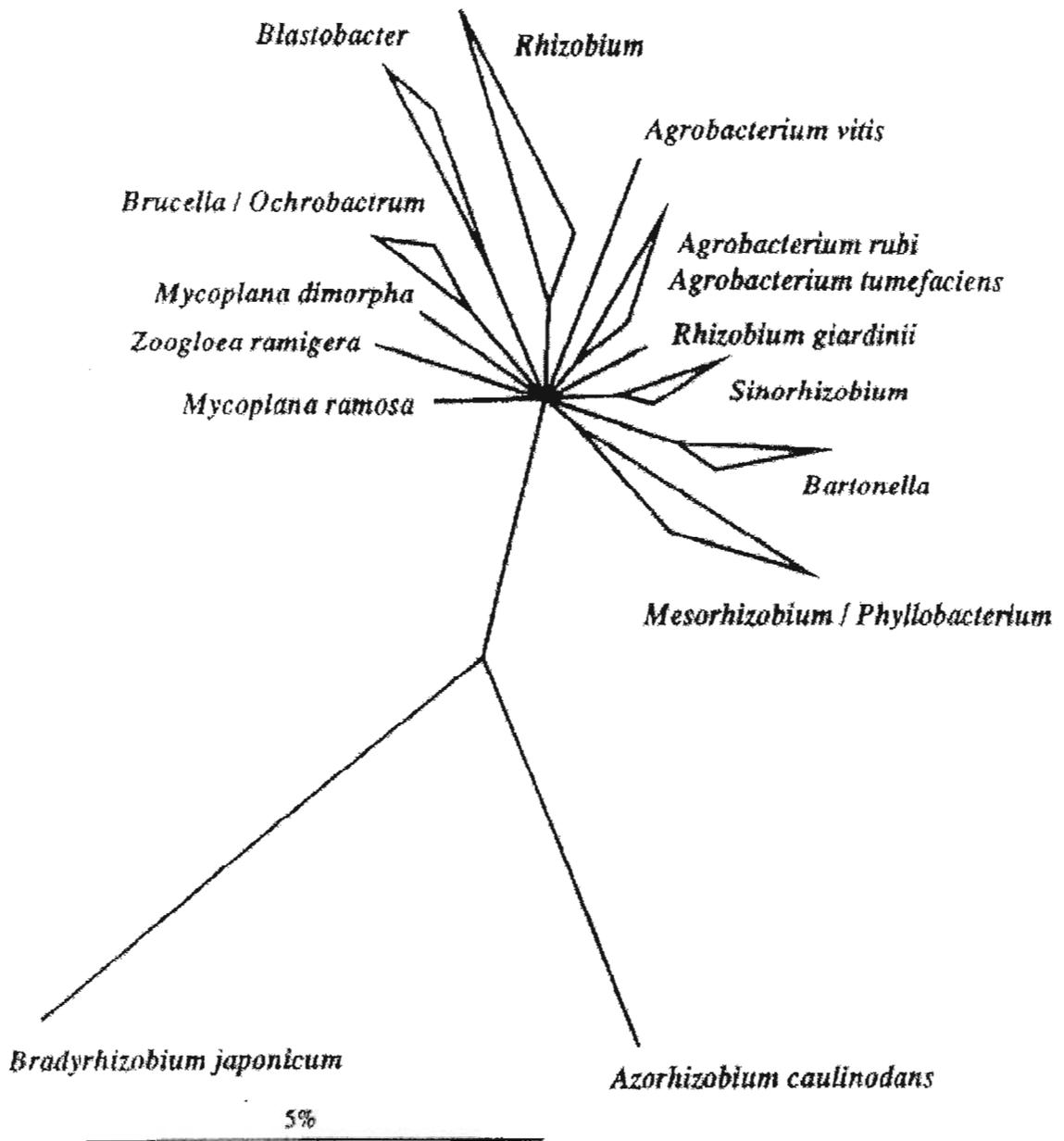
Las bacterias designadas rhizobia comprenden 6 géneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) con cerca de 30 especies (Martínez-Romero et al., 2000) (tabla 1 pág. 2), sin embargo esta lista sigue en aumento conforme se identifican y caracterizan nuevos microorganismos así como sus hospederos. La taxonomía actual se basa en pruebas tradicionales como son: características fenotípicas, microbiológicas y bioquímicas, además, pruebas moleculares que permiten establecer filogenias (Fig. 1, pág. 3, Ludwig et al., 1998). Cada especie tiene huéspedes preferentes para nodular y casi todas las plantas que son noduladas son leguminosas. *Sinorhizobium meliloti* que nodula alfalfa es la simbiosis más estudiada y en la actualidad ya se conoce la secuencia del genoma de esta especie (Galibert et al., 2001) así como la secuencia genómica de *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al., 2000) y *Bradyrhizobium japonicum* (Kaneko et al., 2002)

La interacción de *Rhizobium* con la planta consiste en un proceso simbiótico en el que la bacteria reconoce señales de la planta (flavonoides) y ésta a su vez produce compuestos específicos (factores de nodulación) que estimulan la formación del nódulo. Dentro del nódulo, intracelularmente, la bacteria se transforma o diferencia a bacteroide que es la forma activa para fijar nitrógeno, el cual es asimilado por la planta; el beneficio que obtiene la bacteria son fuentes de carbono derivadas de la fotosíntesis de la planta.

*Agrobacterium* es un género muy cercano a *Rhizobium* y se ha sugerido que se transfiera al género *Rhizobium*, sin embargo, ya que las especies de *Agrobacterium* son patógenos (que forman tumores) mientras que las de *Rhizobium* son simbioses mutualistas, se ha mantenido un tanto arbitrariamente la separación de estos géneros. Muchas de las bacterias pertenecientes a rhizobia poseen plásmidos en diferentes cantidades y tamaños que van desde las 100 kilobases (kb) hasta megaplásmidos de 1.5 megabases (Mb) aproximadamente. En todos los casos donde existen plásmidos, uno de ellos se le conoce como plásmido simbiótico (pSym) por poseer la información necesaria para que se lleve a cabo la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en su hospedero correspondiente; para las bacterias que no poseen plásmidos esta información se encuentra organizada dentro del cromosoma como islas simbióticas.

**Tabla 1 Taxonomía de rhizobia.-**

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Huésped</b>
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i> <i>B. japonicum</i> <i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. loti</i> <i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarium</i> <i>M. tianshanense</i>	<i>Amorpha fruticosa</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Astragalus</i> <i>Lotus</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia, Leucaena</i> <i>Glycyrrhiza, Sophora, Glycine</i> <i>y otras</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i> <i>R. galegae</i> <i>R. gallicum</i> <i>R. giardinii</i> <i>R. hainanense</i>  <i>R. huautlense</i> <i>R. leguminosarum</i> <i>R. mongolense</i>  <i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Mimosa affinis</i> <i>Galega</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Stylosanthes, Centrosema,</i> <i>Desmodium, Tephrosia</i> <i>Sesbania herbacea</i> <i>Vicia, Trifolium</i> <i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i> <i>Vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i> <i>S. fredii</i> <i>S. kostiense</i> <i>S. medicae</i> <i>S. meliloti</i> <i>S. saheli</i> <i>S. terangae</i> <i>S. xinjiangense</i>	<i>Acacia senegal, Prosopis chilensis</i> <i>Glycine max</i> <i>Acacia senegal, Prosopis chilensis</i> <i>Medicago spp</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Sesbania</i> <i>Sesbania, Acacia</i> <i>Glycine max</i>



**Figura 1.-** Grupo de rhizobia. Este árbol filogenético está basado en los resultados de un análisis de las secuencias del 16S rRNA de miembros de los grupos de rhizobia, azorhizobia, bradyrhizobia y algunos representantes de otros grupos de la subclase  $\alpha$ . Ludwing et al., 1998.

## Características de *Rhizobium tropici*.-

*Rhizobium tropici* (tro'pi. ci. Gr. n. *tropikos*, tropicos; N. L. gen. n. *tropici*, de los trópicos). Estas bacterias son aeróbicas, Gram-negativas, no forman esporas, tienen forma de barras flageladas que van de 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  por 1.5 a 2  $\mu\text{m}$ . Las colonias son circulares, convexas, semitranslúcidas y usualmente crecen de 2 a 4 mm de diámetro por un periodo de incubación de 2 a 4 días en medio de cultivo PY. Crecen en YM y PY, algunas crecen en LB. El pH óptimo para su crecimiento está dentro del rango de 5 a 7, crecen a 30 °C, pero pueden llegar a crecer hasta 40 °C. (Martínez-Romero et al., 1991).

Existen 2 grupos de *R. tropici* denominados Tipo A y tipo B. *R. tropici* tipo A en particular la cepa CFN299 contiene 4 plásmidos de 180, 220, 500 y 1500 kb aproximadamente, de los cuales el de 500 kb es el plásmido simbiótico; este plásmido cuando es transferido a otras bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* (curado del plásmido Ti que le confiere la patogenicidad), adquiere características de simbionte mutualista, aunque la fijación biológica de nitrógeno es muy baja, 10 al 25 % por planta comparado contra la cepa donadora de *R. tropici* CFN299 (Martínez et al., 1987). Otra bacteria a la cual se le transfirió este plásmido simbiótico es *Ensifer adhaerens* (actualmente conocido como *Sinorhizobium adhaerens*) la cual adquirió las mismas características de simbionte mutualista con una fijación biológica de nitrógeno baja con respecto a *R. tropici* CFN299 que es también la cepa donadora (Rogel et al. 2001). En la actualidad se está secuenciando el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299.

Existen otras bacterias que están filogenéticamente relacionadas con rhizobia como es el caso de *Brucella melitensis* que es un patógeno de mamíferos (Fig. 1). A su vez, *Ochrobactrum* que es el género bacteriano más cercano a *B. melitensis*, posee una enorme diversidad y además es un patógeno oportunista de humanos, esta bacteria se le puede encontrar en diferentes sustratos como son: suelo, agua, trigo, sangre, etc. Ngom et al. (2004) reportaron el aislamiento de un *Ochrobactrum* de nódulos de una planta llamada *Acacia mangium*; esta bacteria fija nitrógeno en esta leguminosa (Ngom et al., 2004). En otro artículo más reciente se reporta el aislamiento de *Ochrobactrum* de una planta llamada *Lupinus albus* al cual mediante un estudio polifásico incluyendo

características fenotípicas, quimiotaxonomía y características moleculares se le propone como una nueva especie (*Ochrobactrum lupini* sp. nov.). Esta nueva especie es la más cercana a *Ochrobactrum anthropi* mediante el análisis de los genes 16S y 23S ribosomales, sin embargo, el análisis de los genes *nodD* y *nifH* indica que esta nueva especie está más relacionada con bacterias del género de *Rhizobium* y *Mesorhizobium* respectivamente lo que hace pensar que estos genes fueron obtenidos mediante transferencia horizontal (Trujillo et al., 2005).

### **Generalidades de *Brucella* spp.-**

Las brucelas son cocobacilos aerobios, Gram-negativos; no-móviles y no forman esporas. Son parásitos de animales y humanos que también se les ha encontrado en artrópodos y se localizan intracelularmente. *Brucella melitensis* típicamente infecta cabras; *Brucella suis*, cerdos; *Brucella abortus*, ganado vacuno; *Brucella canis*, perros; *Brucella ovis*, ovejas; *Brucella "marina"*, delfines y ballenas y *Brucella neotomae*, rata del desierto. Estudios de hibridación genómica muestran que la homología de ADN entre las especies de *Brucella* es mayor al 90%. Esto ha llevado a proponer a *Brucella* como un género con una sola especie (Verger et al., 1985). Los datos derivados de nuestro laboratorio utilizando análisis de enzimas metabólicas apoyan esta propuesta (Gándara et al. 2001). En la actualidad ya se ha determinado la secuencia de los genomas de las cepas de *Brucella melitensis* 16M (DeIVecchio et al., 2002), *Brucella suis* 1330 (Paulsen et al., 2002) y *Brucella abortus* 9-941 (Halling et al., 2005).

### **Patogénesis y patología.-**

Hace cerca de un siglo, Bruce aisló por primera vez *Brucella* del bazo de un paciente con fiebre de Malta (Bruce, 1888). La enfermedad en humanos, también conocida como brucelosis, se caracteriza por una fase septicémica aguda que, si no se trata, puede ser seguida por un estado crónico que puede extenderse por muchos años ya que llega a localizarse en diferentes órganos (López-Merino, 1991).

A pesar de que cada especie de *Brucella* tiene un huésped preferente, todas pueden infectar una gran variedad de animales incluyendo a los humanos. Las rutas de infección comunes en el humano son el tracto intestinal (ingestión de leche infectada), membranas mucosas conjuntivas (gotas), y piel (contacto con tejidos infectados de animales). El microorganismo avanza desde la vía de entrada, por los canales linfáticos y los nodos linfáticos regionales, a los ductos torácicos y el torrente sanguíneo, que lo distribuye a los órganos parenquimatosos. En tejido linfático, hígado, bazo, médula ósea y otras partes del sistema retículo-endotelial se forman nódulos granulomatosos que pueden desarrollar abscesos. En tales lesiones, las *Brucellas* son principalmente intracelulares, encontrándose en macrófagos (células fagocíticas mononucleares). Ocasionalmente ocurre osteomielitis, meningitis o coleocistitis. La reacción histológica principal en la brucelosis consiste en la proliferación de las células mononucleares, exudación de fibrina y fibrosis. Los granulomas consisten de células gigantes y epiteliales, con necrosis central y fibrosis periférica.

Las personas con brucelosis activa reaccionan más marcadamente (fiebre, mialgia) a inyecciones de endotoxina de *Brucella* que las personas normales. La sensibilidad a la toxina puede, por lo tanto, jugar un papel en la patogénesis.

Las membranas fetales de muchos animales contienen eritriol, un factor de crecimiento de *Brucella*. Esto puede explicar la susceptibilidad particularmente alta de los animales. Eritriol, también es un factor de crecimiento en *Agrobacterium rhizogenes*.

### **Relaciones filogenéticas de *Brucella*.**

Anteriormente se consideraba que bacterias como *Bordetella bronchiseptica* y *Eikenella corrodens* estaban relacionadas con *Brucella*, pero con las filogenias modernas basadas en métodos moleculares, las relaciones entre estas bacterias se han rectificado. En el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7ª edición, *Brucella* estaba considerada como miembro de la familia *Brucellaceae*, junto con otros siete géneros; varios de estos géneros se han ubicado en la familia *Pasteurellaceae*, o *Alcaligenaceae*. Sobre la base del análisis numérico de las características fenotípicas, Jonson y Sneath propusieron que el número de géneros en la familia *Brucellaceae* debía ser reducido a 3, *Brucella*, *Bordetella* y *Alcaligenes*. Esta propuesta no fue incorporada

en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8ª edición, o en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* donde la familia *Brucellaceae* no fue mencionada. En ambos volúmenes de referencia, *Brucella* era un género *incertae sedis* en la sección que incluye los bastones y cocos Gram-negativos. En una nota preliminar, De Ley et al. (1987) reportaron que *Brucella* pertenece a la superfamilia IV de ácidos ribonucléicos ribosomales (rRNA), en particular a la rama de rRNA que contiene el grupo CDC Vd de *Rhizobium* de rápido crecimiento, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Mycoplana* y "Achromobacter". Similaridades en el cistrón rRNA entre *Rhizobium* de rápido crecimiento, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* y *Mycoplana* fueron descubiertas previamente por el grupo de investigación de Gent (De ley et al., 1987).

Las *Brucellas* son un grupo antigénicamente muy homogéneo (Díaz et al., 1966, 1968). Basándose en semejanzas antigénicas y la comparación del lípido A se encontró un parecido entre *Brucella* y bacterias del grupo  $\alpha$ -2 de *Proteobacteria*, en especial con *Bradyrhizobium* (Moreno et al. 1990). Recientemente, la explosión de la información sobre secuencias del gen 16S rRNA ha permitido establecer relaciones más confiables del parentesco entre bacterias (Woese 1987 et al.,) y así se define que *Brucella* es una  $\alpha$ -*Proteobacteria* cercana a *Agrobacterium* y a *Rhizobium* (Ludwing et al., 1998). Sin embargo, aún con estos métodos moleculares basados en los genes ribosomales, la posición fina con respecto a otros miembros del grupo  $\alpha$ -*Proteobacteria* no se puede establecer claramente y parece que *Brucella* es anómala en su posición filogenética con ciertos genes (Vinuesa, comunicación personal).

Gándara et al., (2001) publicó un trabajo sobre la diversidad de *Brucella* basado en la metodología de electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE), en la cual también se incluyen algunas cepas de *O. anthropi* y de la familia rhizobia; lo que se encontró es que existe una diversidad genética muy limitada en los aislados de *Brucella* (Gándara et al., 2001); por el contrario, mediante esta metodología se puede observar una gran diversidad de las bacterias de rhizobia como es el caso de *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991). La hipótesis que se contempla en este trabajo es que tanto *Brucella* como *Rhizobium* tienen un ancestro común. Una característica común entre *R. tropici* y *Brucella* es su capacidad para sobrevivir en condiciones de acidez. *R. tropici* es capaz de crecer en condiciones altas de acidez comparada con otras especies de *Rhizobium* y *Brucella* puede sobrevivir al pH gástrico ácido. Cabe señalar que cuando se analiza la

secuencia parcial de citrato sintasa de *Brucella*, en el banco de datos (NCBI) *R. tropici* es la que comparte el mayor porcentaje de similitud a nivel de nucleótidos, probablemente porque es una región más conservada ya que en los árboles filogenéticos basados en el gen completo de citrato sintasa no se ve una cercanía de *Brucella* con *R. tropici* (Hernández-Lucas et al., 2004).

### **Generalidades de *Ochrobactrum anthropi*.**

Las bacterias de *O. anthropi* son en forma de barra, aeróbicas, Gram negativas, no pigmentadas y mótils por tener flagelos peritricos, producen ácido a partir de varios carbohidratos y reduce tanto el nitrato como el nitrito (Colmes et al., 1988).

*O. anthropi* fue propuesto como nuevo género y nueva especie en 1988 por B. Holmes por medio de diferentes análisis tanto fenotípicos como genotípicos, demostrando que los parientes más cercanos a este nuevo género son *Brucella*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*, *Mycoplana* y *Rhizobium*; todos estos grupos bacterianos pertenecen a la familia IV de rRNA.

### **Características fisiológicas de *O. anthropi*.**

Estas bacterias crecen a 37 °C y a temperatura ambiente (18-22 °C), crecen en Agar MacConkey, producen catalasa oxidasa, también son capaces de producir ácido en un medio de sal amonio bajo condiciones aeróbicas a partir de glucosa, arabinosa, etanol, fructosa, ramnosa y xilosa y crecen en  $\beta$ - hidroxibutirato.

Velasco et al., en 1998 realizó una evaluación de las relaciones de *Brucella* spp y *O. anthropi* mediante diferentes metodologías: perfil de proteínas totales, westernblot, inmunolectroforesis y análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. En este trabajo también se describe y propone una nueva especie de *O. anthropi* (*O. intermedium* sp. nov.) estrechamente relacionada con *Brucella* spp.

Con la utilización de las metodologías de perfil de proteínas totales westernblot e inmunolectroforesis se pueden obtener diferentes dendrogramas que nos muestran dichas relaciones filogenéticas, sin embargo, para realizar un estudio más fino se

requiere del análisis de la secuencia de diversos genes entre los cuales el más utilizado es el del 16S ribosomal. La utilización de diferentes programas que realizan diferentes algoritmos como son neighbour-joining (NEIGHBOR), Fitch-Margoliash (FITCH), maximum-parsimony (DNAPARS) and maximum-likelihood (DNAML), se pueden obtener árboles evolutivos. En este caso Velasco muestra un árbol evolutivo donde se pueden observar las relaciones entre *Brucella*, *Ochrobractrum* y varios miembros de la subclase  $\alpha$ -2, de la clase *Proteobacteria* utilizando el algoritmo de neighbour-joining basado en las cercanías de las secuencias completas de rDNA del 16S. (Fig. 2 pág. 10, Velasco et. al. 1988).

### **Transferencia lateral de información genética.-**

Las herramientas moleculares que en la actualidad existen ayudan a delimitar más claramente los grupos bacterianos y, si se da o no entre ellos, la transferencia lateral de información genética. Podríamos pensar que la transferencia lateral se da sólo entre microorganismos de la misma especie o género pero en un nicho ecológico donde existen un sin número de microorganismos de diferentes especies, géneros, familias e incluso reinos, la transferencia de información genética entre ellos es factible, tal es el caso estudiado entre *Agrobacterium tumefaciens* y su hospedero en donde la bacteria transmite el plásmido Ti a la planta (Gelvin, 2000). En la actualidad se conocen muchos ejemplos comprobados acerca de la transferencia de información genética que se da entre diferentes bacterias en el medio ambiente (Davison, 1999).

Sullivan et al., (1995) demostraron la transferencia lateral de una isla simbiótica de 105 Kb de *Mesorhizobium loti* hacia bacterias no simbióticas del suelo que pertenecen a las especies de *M. loti* y *M. huakuii*; estos hallazgos sugieren que la diversidad que se da en las poblaciones de cepas nodulantes de *M. loti* surge por transferencia lateral de genes simbióticos del cromosoma a partir de bacterias de rhizobia simbióticas hacia bacterias de rhizobia no simbióticas en el campo (Sullivan et al., 1995).

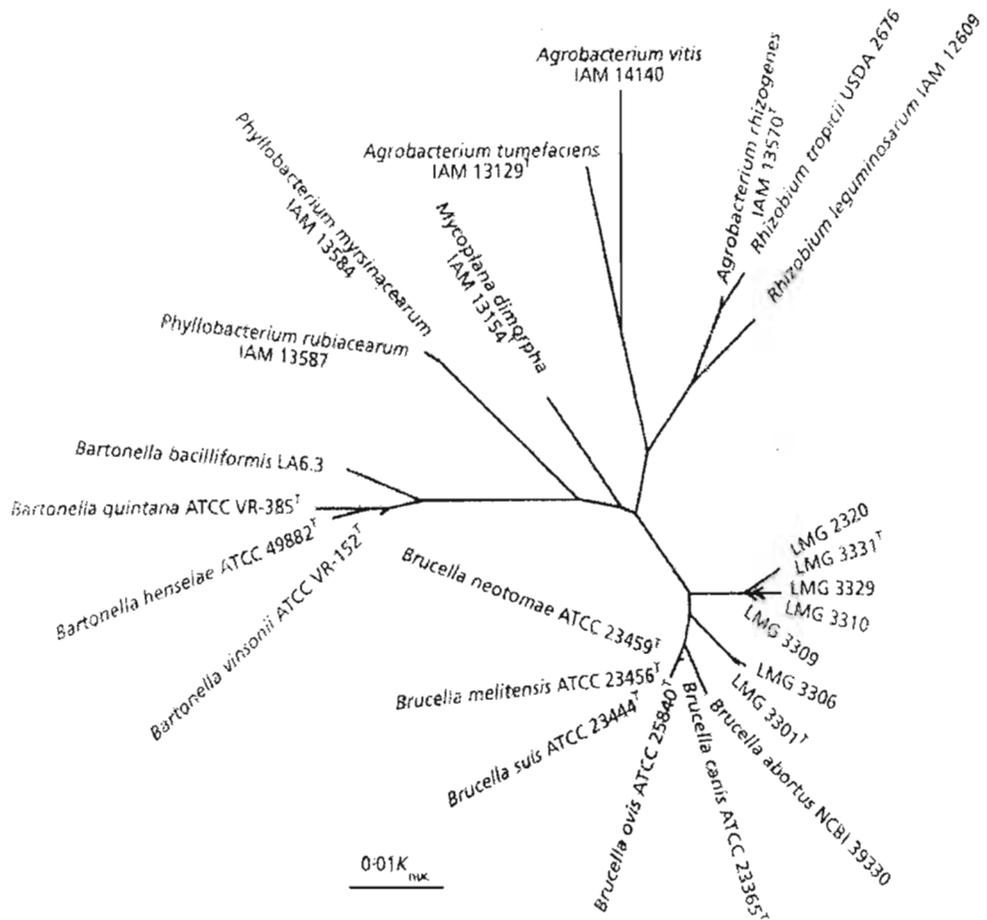


Fig. 2. Árbol evolutivo que muestra las relaciones de *Brucella*, *Ochrobactrum* y varios miembros de la subclase  $\alpha$ -2 de la clase *Proteobacteria*. Este árbol está basado en los métodos de distancia de Jukes-Cantor y neighbour-joining. Velasco et. al. 1988.

## OBJETIVOS.-

- Transferir el plásmido simbiótico (pSym) de *R. tropici* CFN299 a *Ochrobactrum anthropi* 24566, *O. anthropi* 33786, *Sinorhizobium meliloti* SmA146, *S. meliloti* SmA818 y *Brucella melitensis* 16M.

- Evaluar la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno de las bacterias receptoras del pSym de *R. tropici* CFN299, en plantas de frijol y de *Leucaena*.

## JUSTIFICACIÓN.-

La transferencia lateral de información genética entre bacterias se lleva a cabo tanto en el medio ambiente (Davison, 1999) como en el laboratorio (Martínez et al., 1987; Rogel et al., 2001); esto ha permitido la manipulación de la información genética para transformar otros microorganismos y poder expresar ciertos genes en diferentes fondos genéticos.

Conociendo que el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 es funcional cuando es transferido a otras bacterias como *A. tumefaciens* y *E. adhaerens* resulta interesante analizar si este plásmido cuando se transfiere a otras bacterias relacionadas a *R. tropici* pero que poseen funciones totalmente diferentes puede transformarlas en simbioses fijadores de nitrógeno.

Considerando la hipótesis de un ancestro común entre rhizobia y *Brucella* se podría pensar en transferir el pSym de *R. tropici* CFN299 a *B. melitensis* 16M para saber si es funcional en este fondo genético. En el reporte sobre la secuencia del genoma completo de *B. melitensis* se demostró que no posee plásmidos esta bacteria y hasta ahora no se ha podido demostrar la presencia de algún plásmido en las bacterias de *Brucella*, por lo que *O. anthropi* al ser el pariente más cercano a *B. melitensis* parece ser otro buen candidato para transferirle el pSym de *R. tropici* CFN299.

El hecho de que el pSym de *R. tropici* sea funcional en otros fondos genéticos, nos permite especular sobre ciertos determinantes genéticos que existen en dichos fondos genéticos que permiten la expresión de la información contenida en el pSym o

que aportan funciones adecuadas y necesarias para el proceso de nodulación. *Sinorhizobium meliloti* que nodula alfalfa, es una bacteria de la que se conoce la secuencia del genoma completo y que en la actualidad es la simbiosis más estudiada por lo que también resulta interesante transferirle el pSym de *R. tropici* CFN299 para ver si es funcional. En este caso para evitar incompatibilidad funcional con el plásmido simbiótico residente se utilizan cepas a las que se les ha eliminado su mega plásmido simbiótico, o las funciones simbióticas mediante una gran delección del mega plásmido simbiótico.

## MATERIALES Y MÉTODOS.-

### Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas se muestran en la tabla No. 2

**Tabla 2**

<b>Cepa</b>	<b>Características</b>	<b>Origen o referencia</b>
<i>O. anthropi</i> 24566	Cepa tipo CIP14970	Holmes et al. 1988
<i>O. anthropi</i> 33786	Cercana a 24566 por AFLP	Leal-Klevezas D. S. et al. 2005
<i>B. melitensis</i> 16M	Cepa tipo	ATCC
<i>S. meliloti</i> SmA818	Deletada del pSym	Oresnik I. J. et al. 2000
<i>S. meliloti</i> SmA146	Delección parcial del pSym	Oresnik I. J. et al. 2000
<i>R. tropici</i> CFN299Tn5mob-6	Tn5-mob en el pSym	Rogel et al. 2001
<i>E. coli</i> S17-1 $\lambda$ -pir pCAM140	Donadora del mTn5SSgusA40	Wilson K. J. et al. 1995
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ 303	pBac con 390kb del pSym de <i>R. tropici</i> CFN299	Hernández-Lucas (no publicado)
<i>E. coli</i> HB101	pRK2013 (plásmido ayudador en la transferencia)	Figurski 1979

Todas las cepas son crecidas a 30 °C en su medio de cultivo apropiado

**NOTA.-** Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias se encuentran en el apéndice A.

### Abreviaciones de los antibióticos y compuestos utilizados.-

Neomicina	Nm
Cloramfenicol	Cm
Espectinomicina	Sp
5-Br-4-Cl-3-indolyl-b-D-	
Glucuronic acid	X- gluc

Para el caso de los antibióticos, la concentración utilizada se representa con un número como subíndice, el cual indica microgramos por mililitro final. Para el caso del X-gluc, siempre se utilizan 5 mg por cada 100 ml de medio.

### Cruzas biparentales.-

La cepa utilizada para la transferencia del pSym es *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 (Rogel et al., 2001). Previo a la transferencia, las cepas se crecen en medios de cultivo líquidos por toda la noche a 30 °C. En PY: CFN299Tn5mob-6, *O. anthropi* 24566, *O. anthropi* 33786, *S. meliloti* SmA146 y *S. meliloti* SmA818. En LB: *B. melitensis* 16M; sólo para el caso de *B. melitensis* 16M; ésta cepa es lavada con agua estéril para quitar el medio de cultivo en el cual no crece la cepa donadora. Todas las cruzas se realizan en PY sólido utilizando 100 µl de cultivo tanto de la cepa donadora como de la receptora a 30 °C por 24 horas.

### Selección de cepas transconjugantes.-

Para seleccionar las cepas transconjugantes que obtuvieron el pSym se platea la cruz en el medio de cultivo LB con sus respectivos antibióticos de la siguiente manera:

Cepa receptora	Medio de selección
<i>O. anthropi</i> 24566	LB Nm <sub>300</sub> , Cm <sub>5</sub>
<i>O. anthropi</i> 33786	LB Nm <sub>300</sub> , Cm <sub>5</sub>
<i>S. meliloti</i> SmA146	LB Nm <sub>100</sub>
<i>S. meliloti</i> SmA818	LB Nm <sub>100</sub>
<i>B. melitensis</i> 16M	LB Nm <sub>60</sub>

Para el caso de *O. anthropi* la Nm se utiliza a esa concentración porque en LB Nm<sub>100</sub> las cepas de *O. anthropi* son capaces de crecer espontáneamente. La cepa donadora *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 es incapaz de crecer en LB.

Las transconjugantes son reseleccionadas en su medio de selección para obtener nuevamente colonias aisladas, este proceso se realiza por 3 veces a partir de una colonia aislada, para asegurarnos de no tener contaminantes de la cepa donadora.

### **Cruza triparental.-**

En este caso se utiliza la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  A303 como cepa donadora que contiene un Bac con 390 Kb del pSym de *R. tropici* CFN299, la cepa de *E. coli* HB101 que lleva el pRK2013 como ayudador y la cepa de *O. anthropi* 24566 como cepa receptora. Se utiliza un plásmido ayudador para poder transferir desde *E. coli* la construcción hacia *O. anthropi* 24566. La selección de esta transferencia se realiza por medio de la planta de frijol ya que ninguna de las cepas de *E. coli* que participan en la cruce son capaces de nodular.

### **Visualización de plásmidos a través de la técnica de Eckhardt modificado por M. Hynes (Hynes et al., 1990).**

Las bacterias se crecen en medio de cultivo líquido apropiado con su respectivo antibiótico hasta alcanzar una D.O. entre 0.4 y 0.6. Se toman 200  $\mu$ l del cultivo en tubos Eppendorf, se les adiciona 700  $\mu$ l de Sarkosyl al 0.3% preparado en Tris Boratos 1X (TB1X) frío.

#### **TB1X**

Tris base	10.8 g
EDTA	0.93 g
Acido Bórico	5.5 g
Agua	c.b.p. 1 L

Se agitan en un vortex rápidamente y se centrifugan 1 minuto a máxima velocidad, se desecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en 20 µl de solución E1 (La solución E1 contiene sacarosa al 10% en TB1X más RNAsa 0.4 mg/ml). Se adiciona un poco de lisozima a la solución E1 antes de resuspender las células, inmediatamente se procede a cargar el gel. El gel se prepara en buffer TB1X al 0.7 % de agarosa que contiene SDS al 1%. Se corre por 30 min. a 5 volts y 10 horas más a 70 volts (del polo – al polo +), se tiñe con bromuro de etidio y se observa bajo luz U.V.

### **Mutagenesis al azar de la cepa de *O. anthropi* 24566 con un gen reportero (mTn5SSgusA40).-**

Para realizar esta mutagénesis, se lleva a cabo una cruce biparental en LB sólido por 24 horas a 30°C entre la cepa donadora de *E. coli* pCAM140 que contiene el mTn5SSgusA40 y la cepa receptora *O. anthropi* 24566, la selección de las cepas receptoras (mutantes) se realiza en LBSp<sub>300</sub>, Nm<sub>30</sub>, X-gluc. La cepa donadora es sensible a Nm<sub>30</sub>. Una vez mutado *O. anthropi* 24566 se seleccionan colonias azules y blancas a las cuales se les transfiere el pSym de *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 por medio de una cruce biparental.

### **Ensayos de nodulación en plantas de frijol y de *Leucaena*.-**

Las semillas de frijol se esterilizan de la siguiente manera: 5min. en alcohol al 70%, 15 min. en hipoclorito de sodio al 1.5 %, se enjuagan con agua destilada estéril 8 veces y se ponen a germinar en agar agua al 0.75% a 30 °C durante 48 horas en oscuridad. Las semillas germinadas son transferidas a matraces que contienen agar en una solución nutritiva llamada Fahraeus (Ver apéndice “B”).

Las semillas de *Leucaena* son esterilizadas de la siguiente manera: 15 min. en ácido sulfúrico concentrado; se desecha el exceso de ácido y son lavadas con abundante agua; se continúa la esterilización como para las semillas de frijol, se germinan también por 48 horas a 30 °C en oscuridad y posteriormente son transferidas a matraces que contienen vermiculita más la solución nutritiva de Fahraeus. Los ensayos en plantas de frijol son de 21 días y de *Leucaena* son de 60 días.

#### **Reducción de acetileno.-**

Las plantas que son noduladas, son sometidas a una prueba de reducción de acetileno para medir la cantidad de nitrógeno que se está fijando por las bacterias nodulantes. Las raíces de las plantas son introducidas en frascos de un volumen de 30 ml y se tapan con tapones de látex; se les extrae un volumen de 600 µl de aire y se les adiciona 600 µl de acetileno, se incuban por una hora a 28 °C y se hace la medición de reducción de acetileno en un cromatógrafo de gases (marca Varian 3300). Con los datos obtenidos se obtienen las nanomoles de nitrógeno fijado por gramo de nódulo.

#### **Protocolo para medir la actividad de $\beta$ -glucuronidasa (prueba de GUS) a nódulos de frijol y de *Leucaena*.-**

Para realizar esta prueba los nódulos son sumergidos en una solución que se prepara de la siguiente manera:

Amortiguador fosfatos	10ml
EDTA 100 mM	10ml
Tween 20	10µl
SDS 10%	100µl
Triton X100	70µl
X-gluc	5mg (disuelto en 300 µl DMSO)
H <sub>2</sub> O	c.b.p.100ml

### **Amortiguador fosfatos preparado en agua.-**

	Pesar	Volumen	Concentración	Solución Stock final
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.38 g	50 ml	200 mM	39 ml
				+
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	7.16 g	100 ml	200 mM	<u>61 ml</u>
				100 ml

Los nódulos se incuban en la oscuridad a 37 °C por 24 horas, para observar la coloración azul en aquellos en los cuales se está expresando la  $\beta$ - glucuronidasa.

### **Aislamiento de bacterias a partir de nódulos.-**

Los nódulos son desprendidos de las raíces de la planta y son esterilizados en su superficie con alcohol de 96° por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 1.5 % por 3 a 4 minutos, son enjuagados 8 veces con agua tridestilada estéril, se les realiza un prueba de esterilidad y son aplastados en el medio correspondiente. Para platear los bacteroides de nódulos, estos son aplastados en YM líquido que contiene 30% de glicerol. Se utiliza este medio para proteger a los bacteroides de los cambios osmóticos.

### **Extracción de ADN de nódulos.-**

- 1.- Esterilizar los nódulos superficialmente y hacerles una prueba de esterilidad en PY y LB.
- 2.- Aplastarlos en tubos eppendorf con 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Milli Q estéril y tomar 3  $\mu$ l para sembrarlos en el medio de cultivo.
- 3.- Resuspenderlos en 300  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y adicionar 300  $\mu$ l de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1).
- 4.- Agitar en vortex fuertemente durante 20 seg.
- 5.- Centrifugar 10 min. a máxima velocidad y recuperar la fase acuosa en otro tubo.
- 6.- Adicionar 350  $\mu$ l de cloroformo, agitar 20 seg., centrifugar 5 min. y recuperar la fase acuosa.
- 7.- Adicionar 50  $\mu$ l de acetato de amonio 5M y 1 ml de etanol al 100%; dejar precipitar toda la noche a -80 °C.
- 8.- Centrifugar ½ hora a máxima velocidad y desechar el sobrenadante.
- 9.- Adicionar 700  $\mu$ l de etanol al 70% frío, agitar, centrifugar 10 min. y desechar el sobrenadante.
- 10.- Secar en centrifuga al vacío y resuspender en 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

### **Extracción de ADN bacteriano.-**

Para la extracción de ADN las bacterias son crecidas en 5 ml de PY o LB, por toda la noche y se realiza la extracción de acuerdo al protocolo del kit para extracción de ADN (Genomic Prep<sup>TM</sup> Cells and Tissue DNA Isolation Kit; Amersham Bioscience; Cat. No. 27-5237-01).

**Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), clonación y secuenciación del 16S rDNA, con los primers fD1 y rD1 (Weisburg et al., 1991).-**

**Condiciones de PCR**

Primer fD1 (10 pMol.)	1 $\mu$ l *
Primer rD1 (10 pMol.)	1 $\mu$ l *
dNTPs (10 mM)	0.8 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3 $\mu$ l
Buffer 10X	10 $\mu$ l
ADN	1 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l )	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	<u>82.7</u> $\mu$ l
	100 $\mu$ l

\*Con los primers fD1 y rD1 se obtiene un producto de PCR de 1.5 Kb aproximadamente.

**Programa de PCR para el 16S**

94 °C	3 minutos	1 ciclo
94 °C	1 minuto	
57 °C	1 minuto	
72 °C	2 minutos	30 ciclos
72 °C	5 minutos	1 ciclo

La clonación del 16S es necesaria para asegurarnos que una sola copia del gen se va a mandar a secuenciar y ésta se realiza en el vector (pCR 4-TOPO) de acuerdo al protocolo del Kit TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen Cat. No. K4575-40).

La clona que contiene el 16S se purifica utilizando el protocolo del kit (High Pure Plasmid Isolation Kit; Roche; Cat. No. 1754785).

La secuenciación se realiza con la utilización de un secuenciador automático. Posteriormente se analiza la secuencia mediante un Blast en el banco de datos NCBI.

## **BOX-PCR (Versalovic et al., 1994).-**

Esta técnica consiste en la realización de un PCR; utiliza primers complementarios a secuencias repetitivas de ADN que naturalmente se presentan distribuidas en la mayoría de los genomas bacterianos. Mediante esta técnica se produce una huella genómica que permite la diferenciación bacteriana a nivel de especies, subespecies y a nivel de cepas, en este caso se utilizó para la diferenciación de *O. anthropi* y *R. tropici*.

### **Condiciones de PCR**

Primer Box -A1R (10 pMol.)	1 µl *
dNTPs (10 mM)	3.125 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3.75 µl
Buffer 10X	2.5 µl
Taq polimerasa (5 U/ ul)	0.4 µl
DMSO	2.5 µl
ADN	1 µl
H <sub>2</sub> O	<u>10.725</u>
	25 µl

\* Con el primer Box-A1R se obtiene un patrón de bandeo característico para cada una de las especies bacterianas, incluso para cada uno de los miembros de una especie.

### **Programa de amplificación para BOX-PCR**

95 °C	3 minutos	1 ciclo
93 °C	45 segundos	
50 °C	1 minuto	
65 °C	1 minuto	30 ciclos
65 °C	16 minutos	1 ciclo

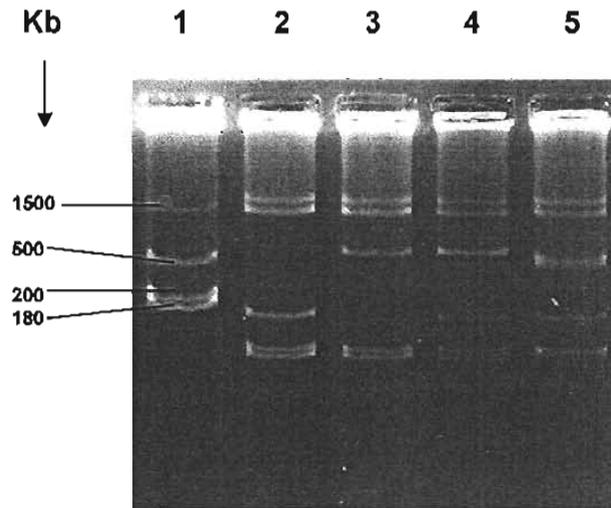
Los PCRs para amplificar el 16S o los Box se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems (PCR System 9700) y la visualización de los mismos se realizó en geles de agarosa al 1% y 1.5% respectivamente, teñidos con bromuro de etidio e iluminados con luz U.V.

## RESULTADOS.-

De la cruce biparental para transferir el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 a las tres diferentes especies bacterianas (*B. melitensis*, *S. meliloti* y *O. anthropi*), se obtuvieron transconjugantes que fueron capaces de crecer en LB Nm<sub>60</sub>; Nm<sub>100</sub> y (Nm<sub>300</sub>. Cm<sub>5</sub>) respectivamente; después de la purificación en el medio selectivo a las transconjugantes de *S. meliloti* y *O. anthropi* se les realizó un Eckhardt para poder visualizar los patrones de plásmidos y la presencia del pSym. Como se puede observar en las figuras 3a, 3b, 3c y 3d (págs. 23 y 24), sí se pudieron obtener transconjugantes con el plásmido del tamaño que corresponde al pSym, sin embargo, en otras transconjugantes se pueden observar plásmidos de diferentes tamaños. Para algunos casos, se podría tratar de plásmidos que provienen de la CFN299, pero en otros, son plásmidos de diferentes tamaños que no corresponden a los plásmidos originales ni de la cepa donante ni de la receptora, esto nos sugiere, que pudieran ser cointegrados de diferentes plásmidos. Para el caso de las transconjugante de *B. melitensis*, éstas sólo se monitorearon por medio de los antibióticos. A continuación se enlistan los nombres de las transconjugantes y de dónde se derivaron.

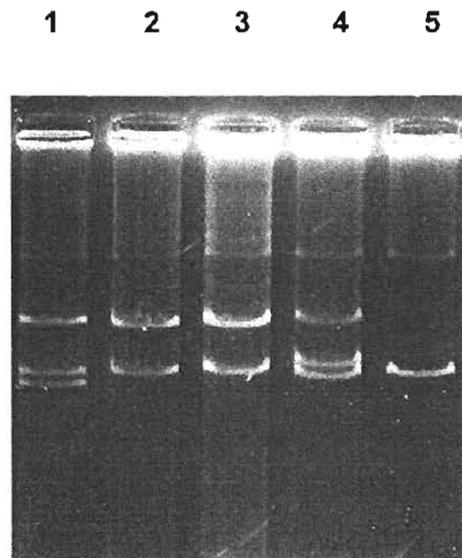
Transconjugantes	Derivación
Genotipo 1	<i>O. anthropi</i> 24566
Genotipo 2	<i>O. anthropi</i> 24566
Genotipo 3	<i>O. anthropi</i> 24566
33786-1	<i>O. anthropi</i> 33786
33786-2	<i>O. anthropi</i> 33786
818-2	<i>S. meliloti</i> SmA818
818-3	<i>S. meliloti</i> SmA818
146-31	<i>S. meliloti</i> SmA146
146-33	<i>S. meliloti</i> SmA146
16M-1	<i>B. melitensis</i> 16M

**Transconjugantes de *O. anthropi* 24566**



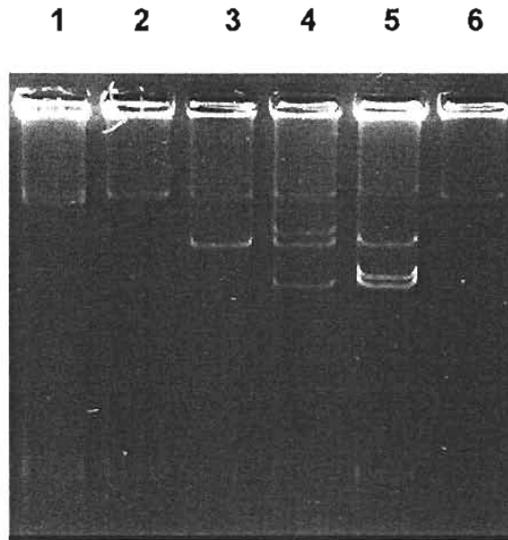
**Fig. 3a-** Carril 1, *R. tropici* CFN299 (con los pesos moleculares aproximados de sus plásmidos); 2, *O. anthropi* 24566 ; 3, genotipo 2 ; 4, genotipo 3 ; 5, genotipo 1.

**Transconjugantes de *O. anthropi* 33786**



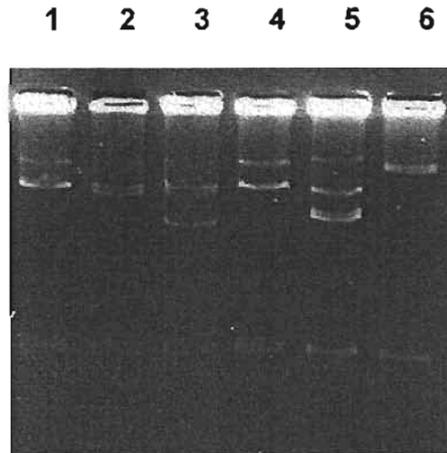
**Fig 3b.-** Carril 1, 33786-1 ; 2, 33786-2 ; 3, 33786-2 ; 4, *R. tropici* CFN299 ; 5, *O. anthropi* 33786.

**Transconjugantes de *S. meliloti* SmA818**



**Fig. 3c.-** Carril 1, *S. meliloti* 2011; 2, *S. meliloti* SmA818; 3, 818-2; 4, 818-3; 5, *R. tropici* CFN299; 6, *S. meliloti* SmA818.

**Transconjugantes de *S. meliloti* SmA146**



**Fig. 3d.-** Carril 1, *S. meliloti* SmA146; 2, 146-31; 3, 146-33; 4, *S. meliloti* SmA146; 5, *R. tropici* CFN299; 6, *S. meliloti* 2011.

## Pruebas de nodulación.-

Las transconjugantes de *S. meliloti* SmA146 y SmA818 que adquirieron el pSym fueron capaces de producir nódulos blancos (fig. 4, pág. 27), muchos de ellos no muy bien definidos e ineficientes para la fijación biológica de nitrógeno al ser inoculadas en plantas de frijol. Las transconjugantes de *B. melitensis* 16M que adquirieron el pSym, no forman nódulos y esporádicamente se puede observar algún pseudonódulo en plantas de frijol. Las transconjugantes de *O. anthropi* 33786 y 24566 que adquirieron el pSym, son capaces de nodular y fijar nitrógeno en plantas de frijol, sin embargo, las transconjugantes de *O. anthropi* 33786 a pesar de formar nódulos fijadores de nitrógeno, en muchos casos producían nódulos blancos y muy bajos niveles de fijación de nitrógeno (datos no mostrados), por lo que se optó por continuar trabajando para el resto de los experimentos sólo con las transconjugantes derivadas de *O. anthropi* 24566, que forman nódulos más eficientes (fig. 5, pág. 28) y que se denominaron genotipo 1, genotipo 2 y genotipo 3 de acuerdo con los diferentes patrones plasmídicos que se pueden observar mediante la técnica de Eckhardt (Fig. 3a, pág. 23)

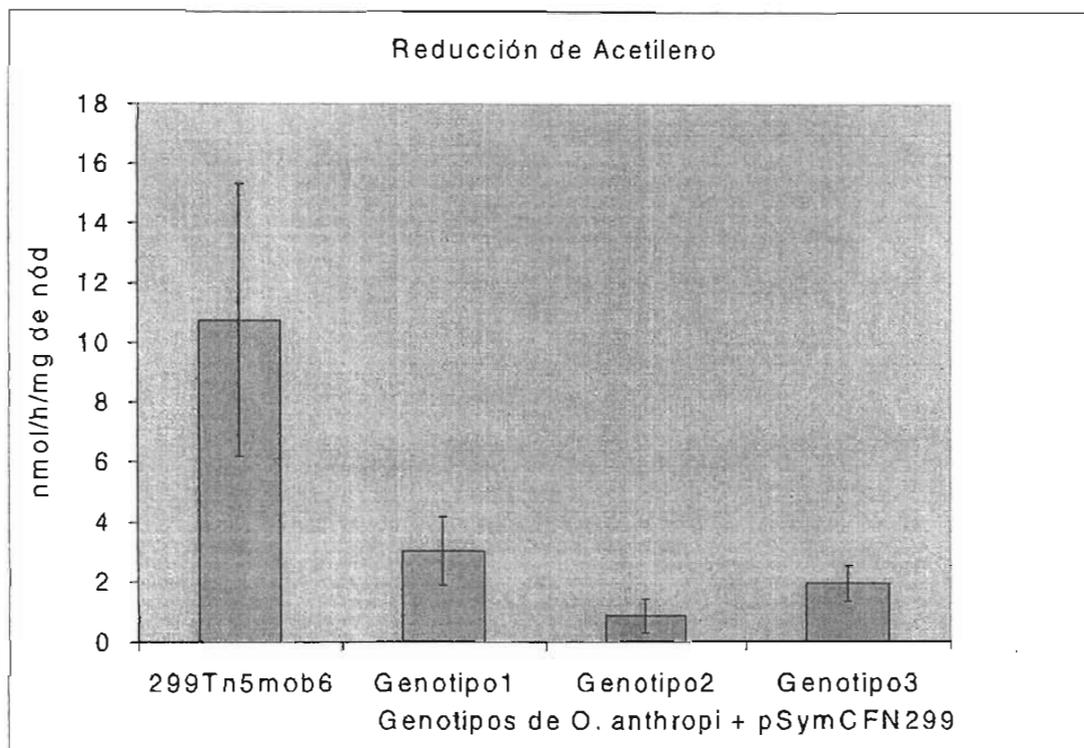
De estos tres genotipos el que mejor fija nitrógeno es el genotipo 1 (Tabla 2, gráfico 1 pág. 26). Cabe señalar que en este genotipo se puede observar claramente que los tamaños de los plásmidos originales de *O. anthropi* 24566 y del pSym se conservan comparado con los plásmidos que se observan en los genotipos 2 y 3 que sugieren rearrreglos de ADN entre ellos (Fig. 3a pág. 23). Los controles negativos para los experimentos de nodulación son las cepas de las tres especies, *S. meliloti* SmA818 y SmA146, *B. melitensis* 16M y *O. anthropi* 24566 y 33786 a las cuales no se les transfirió el pSym de *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 y de las cuales no se obtuvieron nódulos en plantas de frijol.

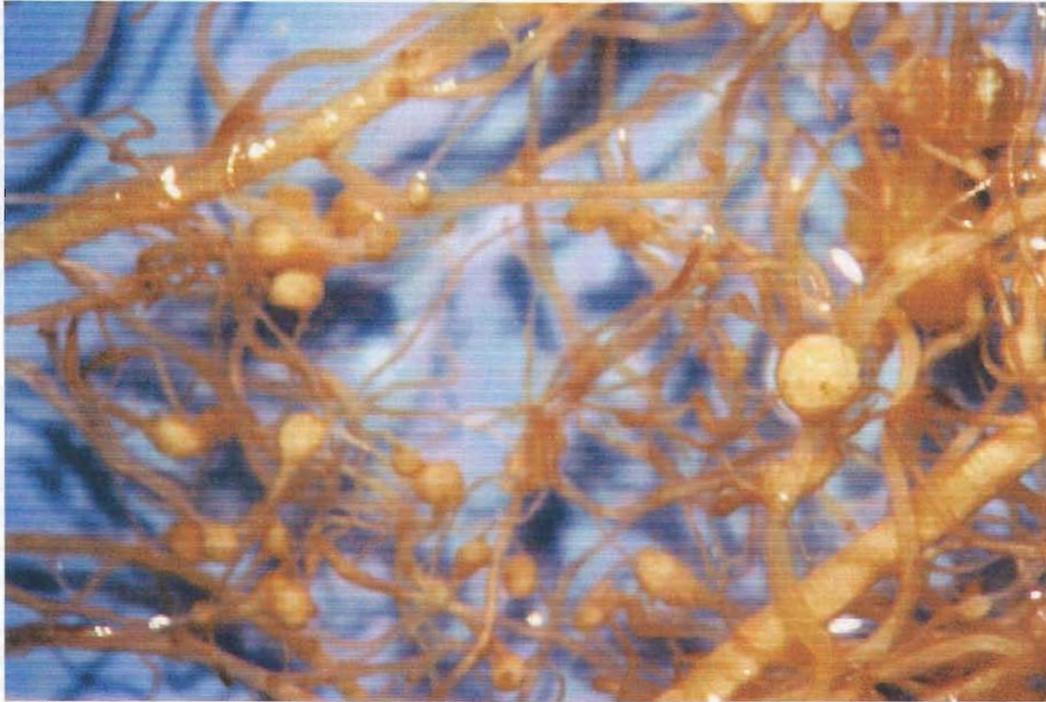
**Tabla 2.**

Resultados de la reducción de acetileno para los genotipos 1, 2 y 3 a los 21 días en plantas de frijol.

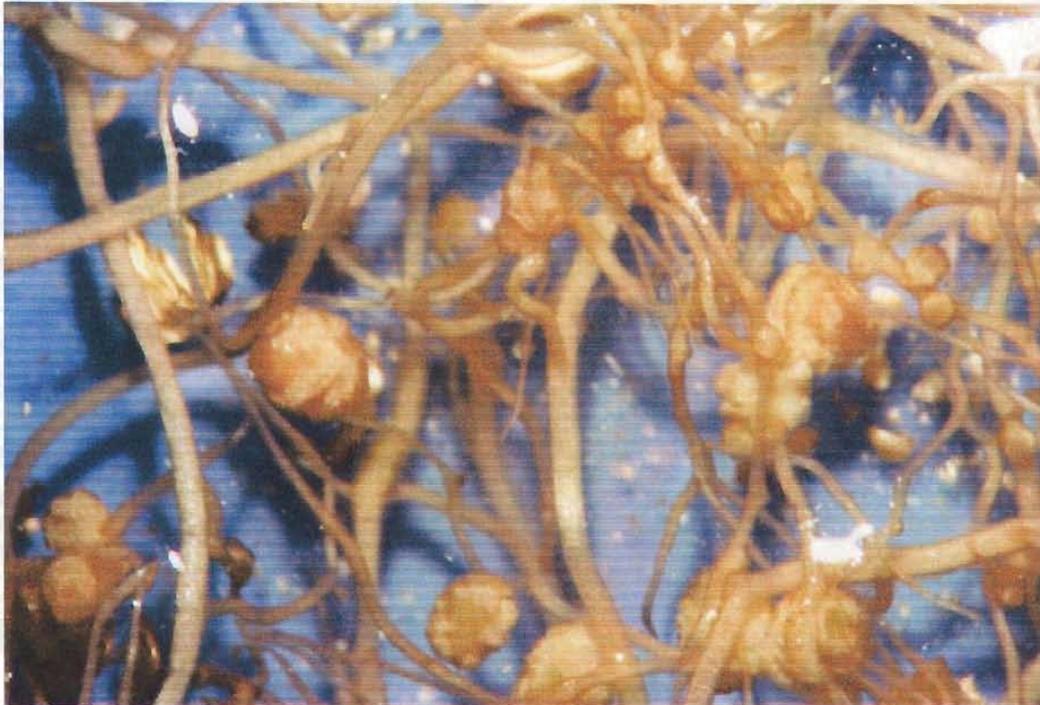
Cepas	Promedio ajustado (área bajo la curva/peso de nódulos)	% de fijación de nitrógeno
Genotipo 1	5480	47%
Genotipo 2	1420.9	12%
Genotipo 3	1698.4	14%
299 Tn5mob-6	11552	100%

**Gráfico 1**



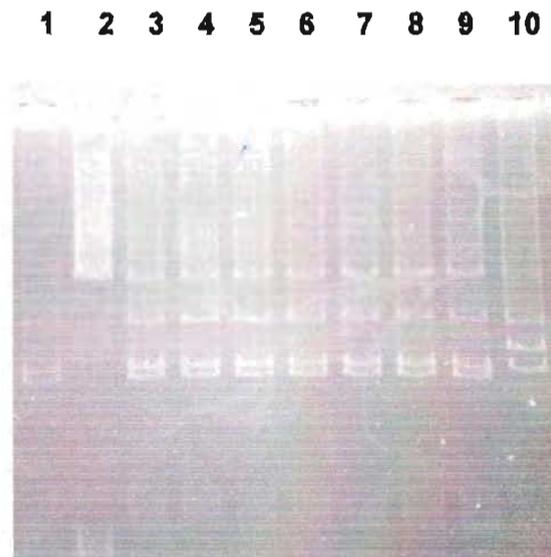


**Fig 4.-** Nódulos que produce la transconjugante de *S. meliloti* 818-2, blancos y muchos de ellos no están bien definidos, los nódulos de las transconjugantes de *S. meliloti* 818-3, 146-31 y 146-33 son similares a estos.



**Fig 5.-** Nódulos que produce la transconjugante de *O. anthropi* genotipo 1, rojos y muy parecidos a los de la CFN299Tn5mob-6, los nódulos de las transconjugantes de *O. anthropi* genotipo 2, genotipo3 e incluso los nódulos eficientes de las transconjugantes de *O. anthropi* 33786-1 y 33786-2 son similares a estos.

*O. anthropi* 24566 también es capaz de nodular y fijar nitrógeno cuando se le transfiere a partir de *E. coli* una construcción en pBac que contiene solo 390 kb del pSym de *R. tropici* CFN299. Dado que la selección de las transconjugantes se realizó mediante la planta de frijol, y sabiendo que las *E. coli* que participan en esta transferencia no son capaces de nodular, se puede comprobar de esta manera que las transconjugantes de *O. anthropi* 24566 son realmente las responsables de la nodulación y no una contaminación de la cepa donadora. Las bacterias aisladas a partir de estos nódulos son capaces de crecer en LB y LBSp<sub>200</sub> y el fenotipo corresponde a la bacteria de *O. anthropi* 24566. Mediante un Eckhardt se comprobó que el patrón de plásmidos de estos aislados corresponde al patrón original de *O. anthropi* 24566 más la construcción del pBac (fig. 6, pag. 29).



**Fig. 6.-** Carril 1, *O. anthropi* 24566; 2, *E. coli* A303; 3-10, transconjugantes aisladas de frijol que corresponden a *O. anthropi* 24566 con el pBac que proviene de la cepa de *E. coli* A303. Solo en el carril 10 se observan posibles rearrreglos de plásmidos para esta transconjugante.

Las transconjugantes de *O. anthropi* 24566 (genotipo 1, genotipo 2 y genotipo 3) se inocularon en plantas de *Leucaena* para ver si eran capaces de nodular y fijar nitrógeno como en las plantas de frijol, ya que esta otra planta es uno de los hospederos naturales de *R. tropici*. Los resultados que se obtuvieron es que las transconjugantes sí son capaces de nodular (fig. 7 pag. 30), pero no son capaces de fijar nitrógeno en estas plantas.

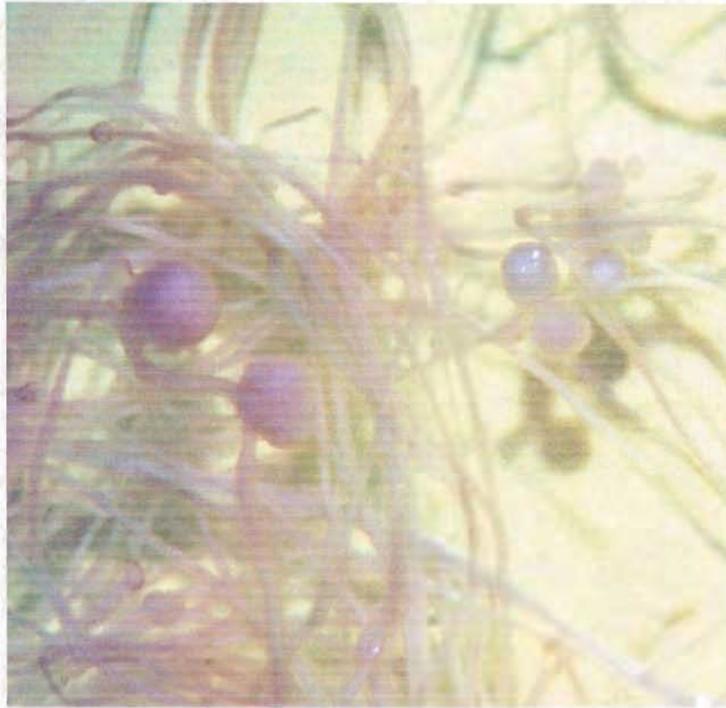


**Fig. 7.-** Nódulos que produce la transconjugante de *O. anthropi* genotipo 1 en plantas de *Leucaena*; los nódulos que producen las transconjugantes de *O. anthropi* genotipo 2 y genotipo 3, son similares a estos.

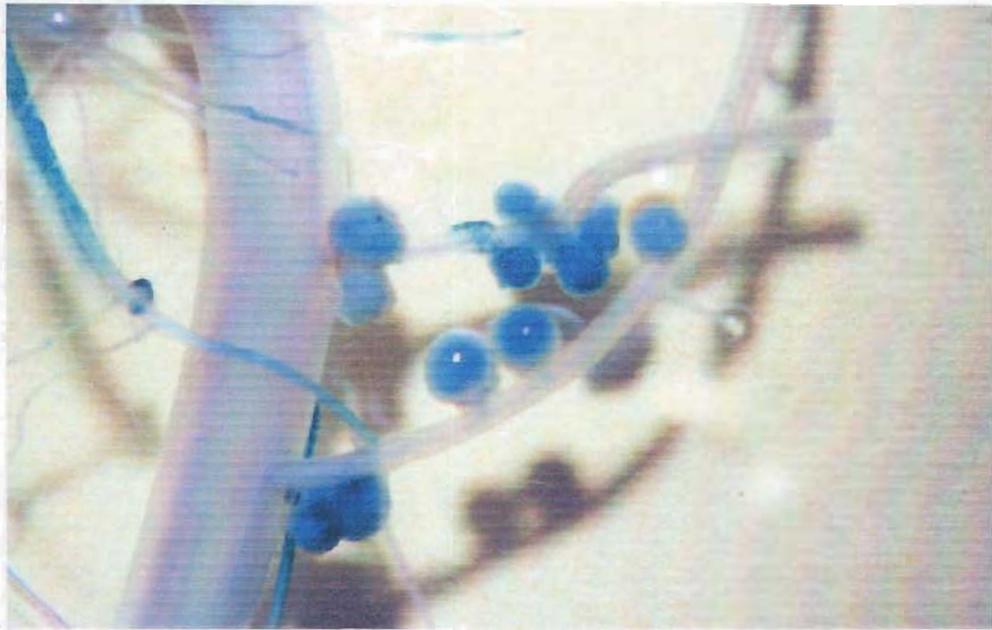
### Monitoreo de *O. anthropi* 24566 por medio de un gen reportero (mTn5SSgusA40)

Para distinguir adecuadamente a *O. anthropi* 24566 primero se mutagenizó al azar con un gen reportero (mTn5SSgusA40); posteriormente, se seleccionaron 2 colonias que no expresaran la  $\beta$ -glucuronidasa (blancas) y 2 que sí la expresaran (azules) constitutivas para el medio de cultivo (LBSp<sub>300</sub>X-gluc). A estas colonias se les transfirió el pSym y se les denominó B1-1 y B1-2 para las blancas y A1-1 y A1-2 para las azules. Se procedió a la realización de ensayos de nodulación en plantas de frijol y de *Leucaena*. A los nódulos que se obtuvieron se les realizó la prueba de Gus (protocolo para medir la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa); los nódulos de las transconjugantes B1-1 y B1-2 continuaron siendo blancos y los nódulos de las transconjugantes A1-1 y A1-2 se tiñeron de color azul (Fig. 8 y 9 págs. 32 y 33); los nódulos que se producen por *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 son blancos para la prueba de Gus (datos no mostrados). Si se realiza un ensayo de nodulación con una mezcla de mutantes de *O. anthropi* 24566 que expresen o no la  $\beta$ -glucuronidasa, y a las cuales se les transfirió el pSym se obtienen nódulos blancos y azules en la misma planta (Fig 10 pág. 34).

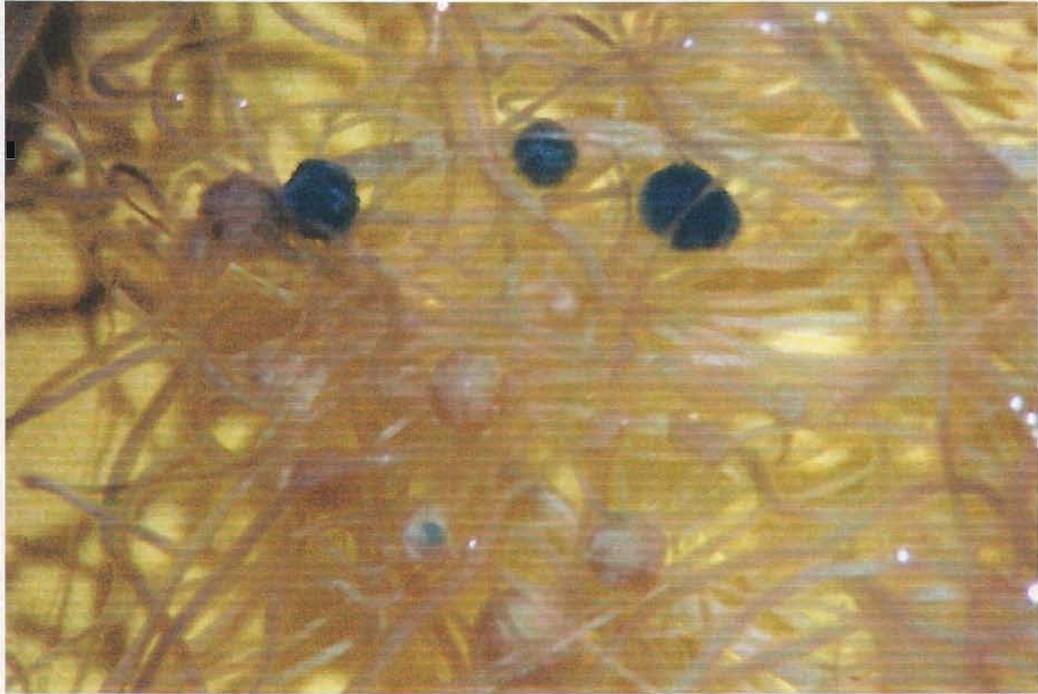
En cuanto a los ensayos de nodulación en *Leucaena*, los nódulos que se obtuvieron con las transconjugantes A1-1, no se tiñeron tan bien como lo hacen los nódulos en frijol con la prueba de Gus (Fig11, pág. 35). Este dato nos sugiere que la bacteria tiene problemas para invadir las células de la planta.



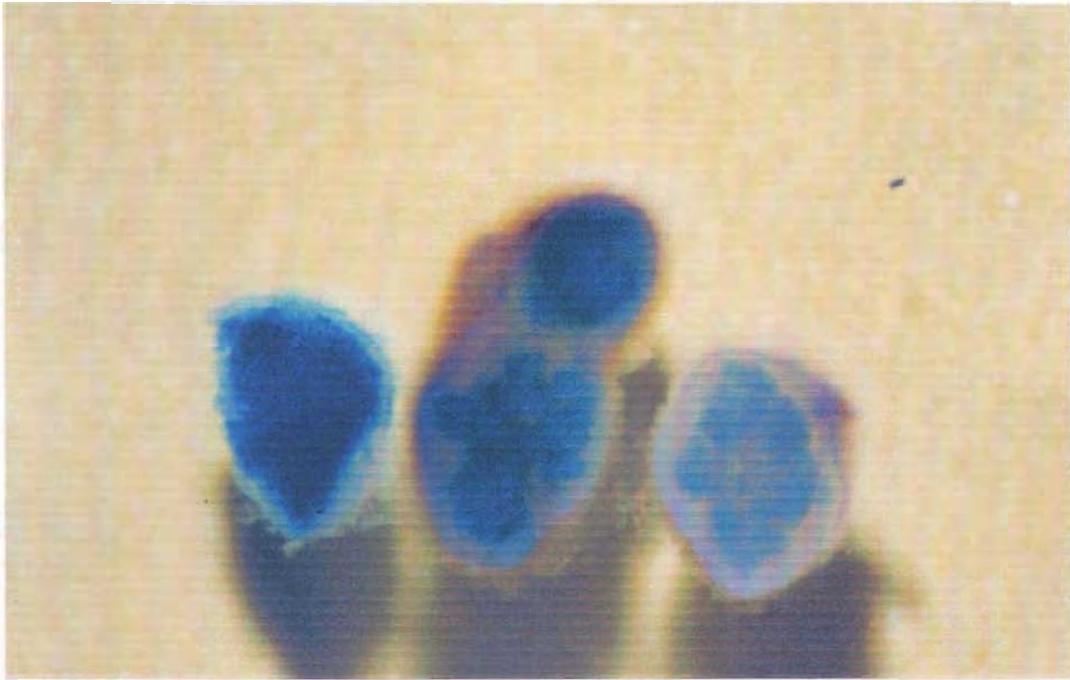
**Fig 8.-** Nódulos de frijol producidos por la transconjugante de *O. anthropi* B1-1 que a pesar de tener el gene de la  $\beta$ -glucuronidasa no se tiñen de azul con la prueba de Gus. Los nódulos de la transconjugante de *O. anthropi* B1-2 también son blancos con esta prueba.



**Fig. 9.-** Nódulos de frijol producidos por la transconjugante de *O. anthropi* A1-1 que se tifen de azul con la prueba de Gus. Los nódulos de la transconjugante de *O. anthropi* A1-2 también son azules con la prueba de Gus.



**Fig. 10.-** Nódulos de una planta de frijol producidos por una mezcla de transconjugantes de *O. anthropi* 24566 mutagenizadas inicialmente con el mTn5SSgusA40 en donde unas expresan el gene de la  $\beta$ -glucuronidasa (nódulos azules) y otras no lo expresan (nódulos blancos), estos nódulos están teñidos con la prueba de Gus.



**Fig. 11.-** Nódulo de frijol a la izquierda y dos nódulos de *Leucaena* a la derecha. Inoculados con la transconjugante de *O. anthropi* A1-1 y teñidos con la prueba de Gus. La coloración azul es más intensa en el nódulo de frijol que en los de *Leucaena*.

En otro experimento de nodulación en plantas de frijol con las transconjugantes de *O. anthropi* A1-1, B1-1 y *R. tropici* CFN299Tn5mob-6, se aislaron las bacterias de los nódulos. Todos los nódulos colectados para cada cepa, se maceraron en un solo tubo y a partir de ese macerado se realizaron diluciones para platear (sembrar) en PY X-gluc. Como era de esperarse todos los aislados de A1-1 son azules mientras que los aislados de la B1-1 y CFN299Tn5mob-6 son blancos. A continuación se muestran los números de los aislados.

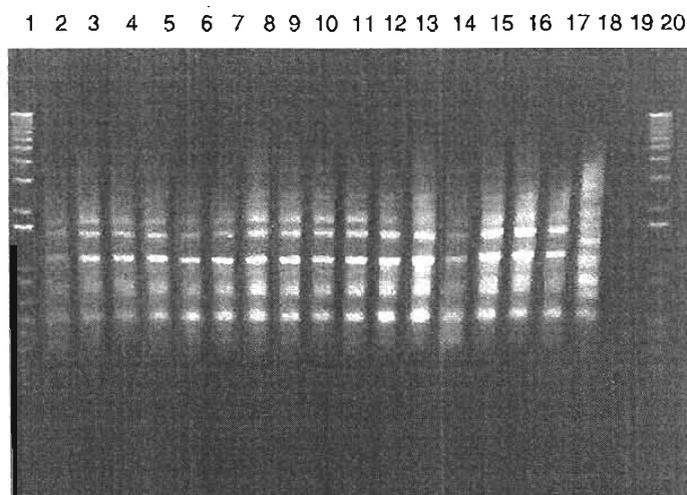
Cepa	# de plantas	# de nódulos	# de aislados	Color
A1-1	2	22	2830	Azul
B1-1	1	5	300	Blanco
CFN299Tn5mob-6	1	8	500	Blanco

La selección de las transconjugantes se realizó en este medio de cultivo porque no es selectivo, es decir que en este medio crecen tanto *O. anthropi* como *R. tropici*; se le adiciona X-gluc porque de este modo podemos verificar que todos los aislados de los nódulos producidos por la transconjugante A1-1 fueran azules, lo que nos indica que efectivamente la transconjugante de *O. anthropi* es la nodulante. La cepa de *O. anthropi* que se utilizó como receptora en este caso se marcó con el gen reportero *gusA* antes de adquirir el pSym de *R. tropici*, por lo tanto, el que se obtengan sólo bacterias azules de nódulos fijadores de nitrógeno indica que se trata de *O. anthropi* nodulantes. Este otro experimento nos señala que no hay contaminaciones por parte de *R. tropici* CFN299Tn5mob-6.

## Huella genómica producida con BOX-PCR.-

Se seleccionaron colonias al azar de los aislados anteriores y se les realizó un PCR con la técnica de BOX-PCR, mediante esta técnica se pueden obtener huellas genómicas características para cada especie bacteriana. Es una herramienta molecular que nos ayuda al agrupamiento bacteriano por comparación de patrones que se generan.

Los patrones generados mediante la técnica de BOX-PCR, nos muestran claramente que el ADN que se extrajo de las bacterias que produjeron nódulos por las transconjugantes A1-1 y B1-1, son iguales al patrón generado a partir de ADN de *O. anthropi* 24566, esto se compara contra el patrón del ADN extraído de las bacterias aisladas de nódulos producidos por *R. tropici* CFN299Tn5mob-6, (fig. 12 pág. 37)



**Fig. 12.-** Patrones electroforéticos de fragmentos de ADN producidos con BOX-PCR. Carril 1, marcador molecular 1Kb plus; 2-11, A1-1; 12-16, B1-1; 17, *O. anthropi* 24566; 18, CFN299Tn5mob-6; 19, control negativo; 20, 1 Kb plus.

Cuando se realiza esta misma técnica de BOX-PCR con ADN extraído directamente de los nódulos de frijol, los resultados son muy similares.

Los patrones producidos de los nódulos de las transconjugantes de *O. anthropi* son iguales entre sí, pero diferentes a los de *R. tropici* (datos no mostrados); sin embargo, cuando estos se comparan con los patrones obtenidos de ADN de las cepas, se pueden observar pequeñas diferencias, esto debido a que del nódulo se extrae tanto ADN de los bacteroides como de la planta.

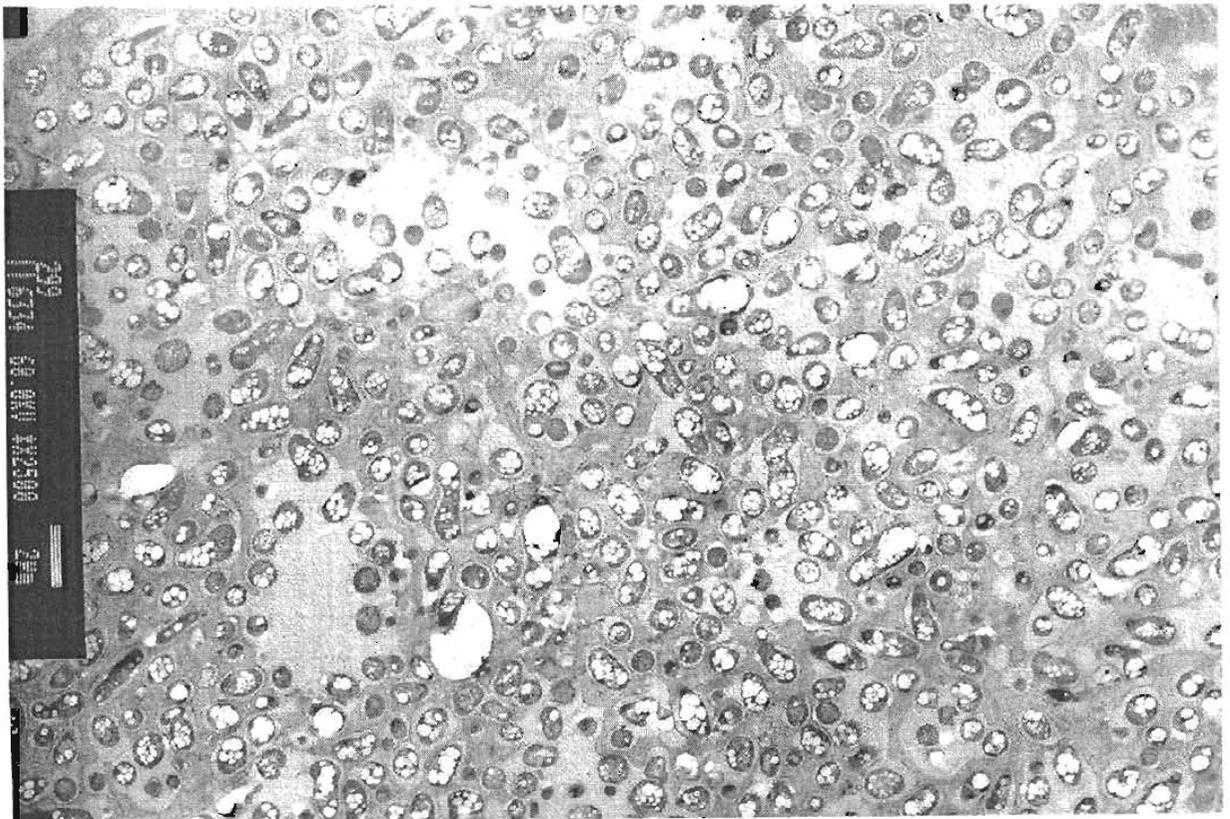
### **Secuenciación del 16S rDNA de *O. anthropi* 24566 y 33786.-**

Una de las técnicas muy utilizada para poder reconocer a ciertos grupos bacterianos, es la secuenciación del 16S rDNA por ser un gen muy conservado y universal. Con la secuencia de este gen se puede realizar mediante un Blast una búsqueda en la base de datos (NCBI), para poder llegar a conocer a qué grupo bacteriano corresponde dicha secuencia. El análisis realizado con las secuencias del 16S de *O. anthropi* 24566 y *O. anthropi* 33786 nos indicó claramente que las cepas utilizadas son *Ochrobactrum anthropi*.

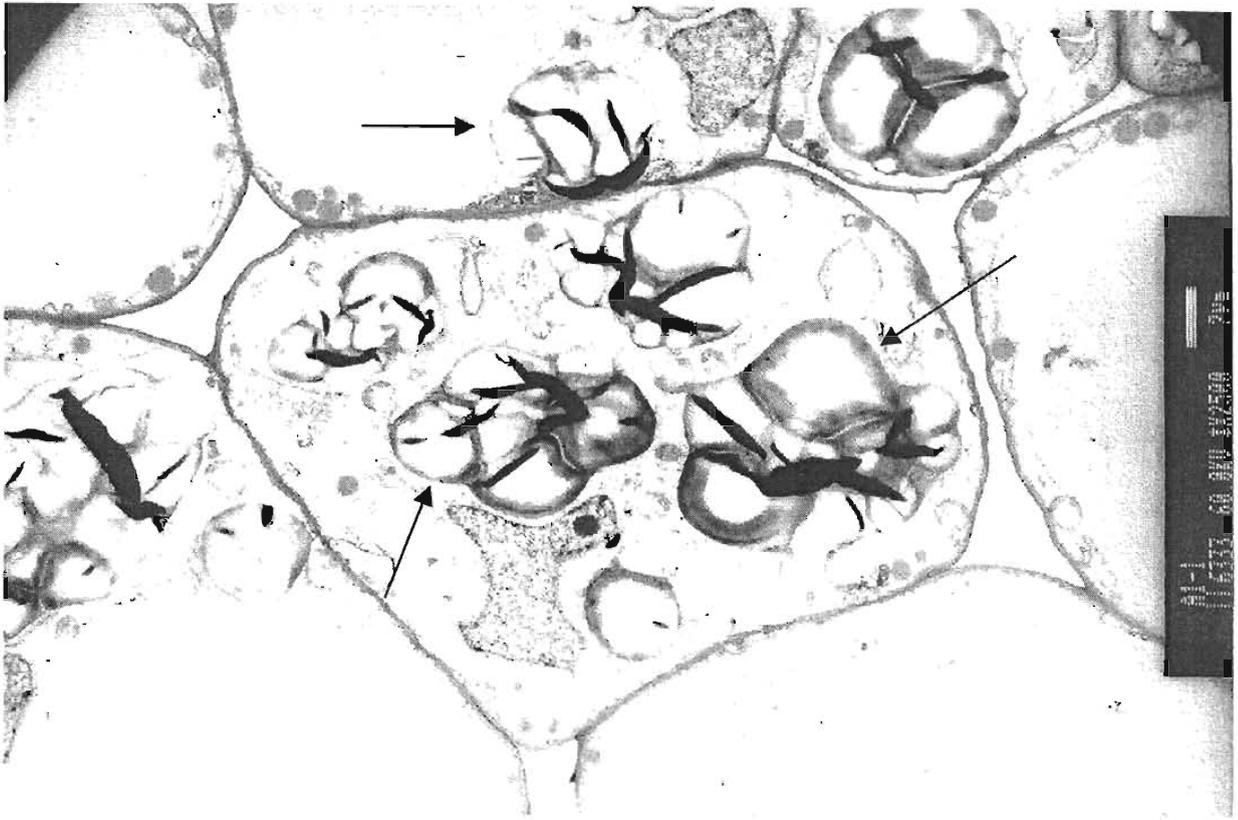
Mediante PCR de genes *nod* y *nifH* de las cepas de *O. anthropi* 24566 y 33786 no se pudo detectar ningún producto, sugiriendo que las cepas receptoras carecen de estos genes. Probablemente mediante una hibridación se podría detectar la presencia de estos genes, sin embargo, hay que recordar que cuando estas bacterias son inoculadas en plantas de frijol, no se obtienen nódulos.

### Microscopía electrónica.-

Mediante esta metodología y con nódulos de 21 días se pudo comprobar que las transconjugantes de *O. anthropi* (A1-1 y B 1-1) sí se diferencian a bacteroide, la diferencia es que *R. tropici* CFN299Tn5mob-6 almacena PHB en simbiosis y A1-1 y B1-1 no, además los bacteroides de A1-1 y B1-1 son más alargados que los que se producen con *R. tropici* CFN299Tn5mob-6. Otra diferencia es que en las células no infectadas por las transconjugantes de *O. anthropi* se producen amiloplastos (Figs. 13, 14, 15a y 15b pags. 39, 40 y 41).

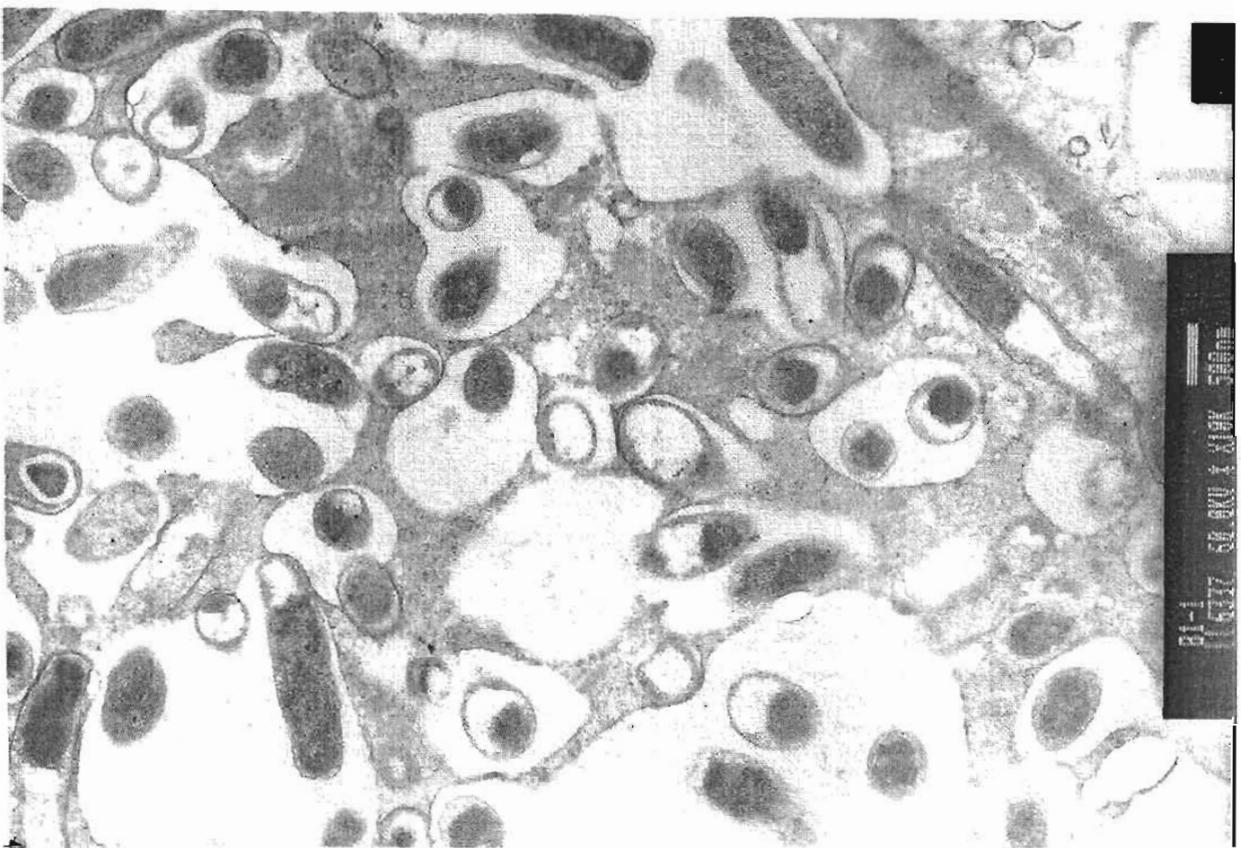
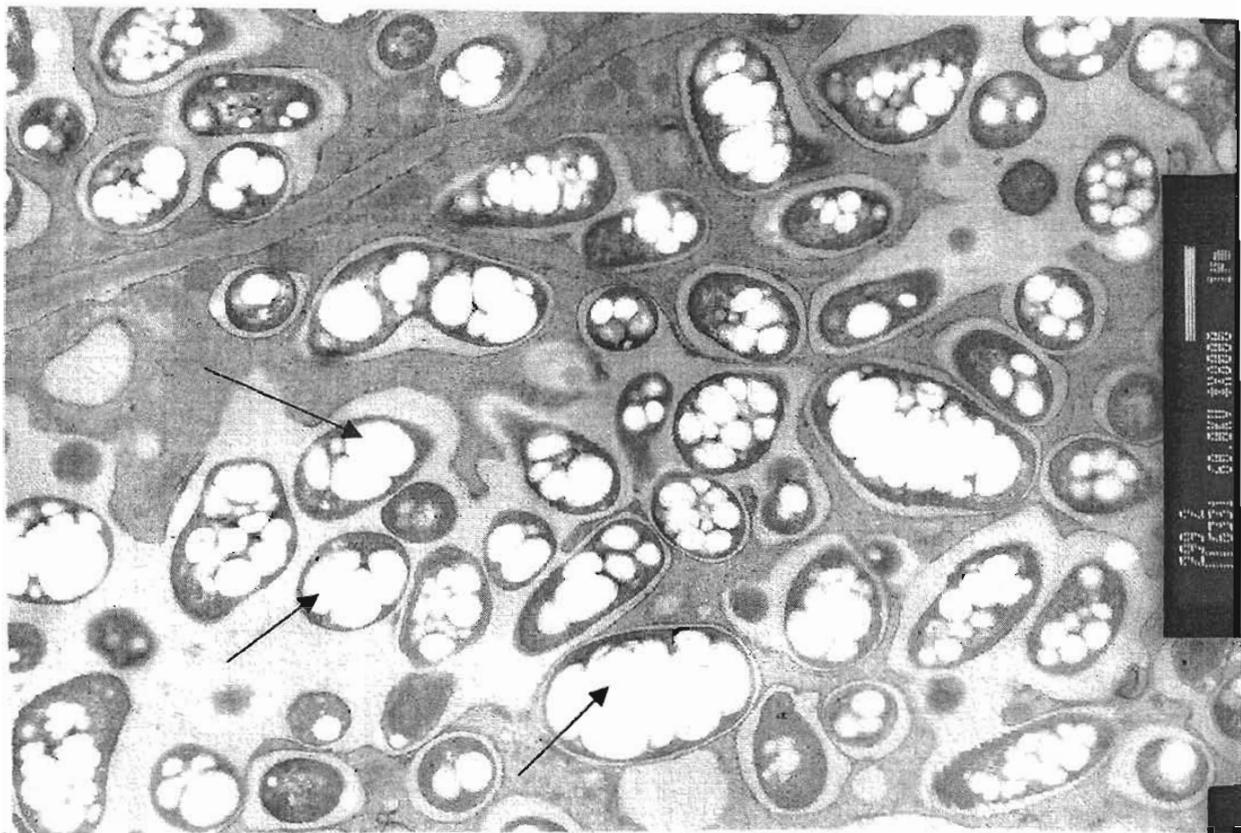


**Fig 13.-** Microscopía de nódulos producidos por *R. tropici* CFN299Tn5mob-6. 2,500 aumentos.



**Fig. 14.-** Microscopía de nódulos producidos por la tranconjugante de *O. anthropi* A1-1 donde se pueden apreciar los amiloplastos (señalados con las flechas). 2,500 aumentos.

**Figs. 15a y 15b.-** (siguiente página). Bacteroides de *R. tropici* CFN299 Tn5mob-6 (foto de arriba, 15a) en donde se indica con flechas la presencia del PBH. En la figura de abajo (15b) son bacteroides producidos por la transconjugante de *O. anthropi* B1-1. 10,000 aumentos para ambas fotos.



## DISCUSIÓN.-

*R. tropici* CFN299 (simbionte de frijol y de *Leucaena*) posee 4 plásmidos de 180, 220, 500 y 1500 kb aproximadamente, de los cuales el de más de 500 kb es el plásmido simbiótico (pSym) (Martínez et al., 1987). Se sabe que *S. meliloti* 1021 tiene dos megaplásmidos de 1340 y 1700 Kb con un cromosoma de 3540 kb (Honeycutt et al., 1993), en la cual el pSym es el plásmido más chico (Oresnik et al., 2000). Por otro lado *B. melitensis* 16M no posee ningún plásmido, sólo se identificaron dos cromosomas independientes de 2200 y 1150 kb (Michaux et al., 1993) de los que en la actualidad ya se conoce su secuencia (DelVecchio et al., 2002). Durante el desarrollo de este trabajo a *O. anthropi* 24566 se le han podido observar mediante la técnica de Eckhardt la presencia de tres plásmidos por debajo de las 200 Kb y dos megaplásmidos alrededor de las 1500 kb; para el caso de *O. anthropi* 33786 sólo se observó un plásmido de alrededor de 200 kb y dos megaplásmidos similares a los de *O. anthropi* 24566. En otras cepas de *O. anthropi* se han podido observar mediante la misma técnica plásmidos de diferentes tamaños y constantemente dos megaplásmidos (datos no mostrados).

Cuando el pSym de *R. tropici* CFN299 es transferido a bacterias relacionadas como *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium adhaerens* (Martínez et al. 1987, Rogel et al., 2001) éstas son capaces de formar nódulos y fijar nitrógeno en plantas de frijol. En 1983 Wong y colaboradores transfirieron el megaplásmido de *S. meliloti* a diferentes cepas de *Rhizobium* sp. y a *Agrobacterium tumefaciens*, en todos los casos las transconjugantes formaron estructuras como nódulos en las raíces de *Medicago sativa*; estas estructuras estaban principalmente compuestas por células meristemáticas pero no estaban invadidas de bacterias. En otro trabajo independiente se transfirieron 290 Kb del plásmido simbiótico de *S. meliloti* 2011 a *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido completo; los resultados fueron muy similares a los publicados por Wong, pero encontraron diferencias entre los número de nódulos producidos por la clona de 290 Kb y el plásmido completo, que sugiere que algunos genes que influencian la organogénesis del nódulo están localizados en regiones del pSym que no fueron clonadas dentro de las 290 Kb que fueron transferidas (Truchet et al., 1984).

Evidentemente los géneros bacterianos que se trabajaron para el estudio de la expresión del pSym están muy relacionados filogenéticamente a *Rhizobium* (Ludwing et al., 1998), pero existen otros grupos bacterianos que a pesar de formar parte del grupo de las rhizobiaceas son géneros con ciertas características muy diferentes a las de *Rhizobium*, tal es el caso de *B. melitensis* y *O. anthropi*, géneros que entre ellos están muy relacionados filogenéticamente (De Ley et al., 1987; Velasco et al., 1998; Holmes et al., 1988).

Para el estudio de la expresión del pSym de *R. tropici* CFN299, éste se transfirió a tres diferentes géneros bacterianos *Brucella melitensis*, *Sinorhizobium meliloti* y *Ochrobactrum anthropi*. Por medio de la selección con antibióticos y a través de la técnica de Eckhardt se pudo comprobar que el pSym se puede transferir y replicar dentro de estos tres diferentes géneros, sin embargo, parece ser que la expresión de los genes involucrados en la nodulación y en la fijación biológica de nitrógeno está limitada como se discute más adelante. Podemos suponer la posibilidad de que existan determinantes genéticos que permitan la expresión de la información contenida en el pSym de *R. tropici* CFN299 en base a los resultados obtenidos; a medida de que la divergencia entre las bacterias utilizadas como receptoras y *Rhizobium* es mayor, la expresión de la información genética del pSym es menor con excepciones. Si los genes contenidos en el pSym de *S. meliloti* no fueron capaces de expresarse en otras cepas de *Rhizobium* sp. ni en *Agrobacterium* (Wong et al., 1983; Truchet et al., 1984) y el pSym de *R. tropici* si (Martínez et al., 1987, Rogel et al., 2001) y considerando que los plásmidos evolucionan de manera independiente del cromosoma en donde se hospedan, podríamos especular que el pSym de *S. meliloti* coevolucionó junto con su cromosoma y se especializó para funcionar dentro de la bacteria que lo hospeda, mientras que el pSym de *R. tropici* es un mosaico de información proveniente de diferentes fuentes, uno de estos ejemplos es el gen de la citrato sintasa que se encontró en este plásmido, que se sugiere haber surgido por duplicación del cromosoma y que hasta entonces se había considerado como un gen exclusivo del cromosoma (Pardo et al., 1994). Cabe señalar que en el 2003 se publicó que la estructura del pSym de *R. etli* es un mosaico (González et al., 2003).

Cuando se transfiere el pSym de *R. tropici* CFN299 a *B. melitensis* 16M éste sólo es capaz de replicarse en este fondo genético pero la bacteria no produce nódulos en plantas de frijol; esto no resulta sorprendente ya que *B. melitensis* es un patógeno especializado en mamíferos.

A pesar de que *S. meliloti* está más cercano a *R. tropici* que *O. anthropi* (Ludwing et al., 1998) las transconjugantes de *S. meliloti* fueron capaces de formar nódulos en plantas de frijol pero no de realizar la fijación biológica de nitrógeno. El género de *Ochrobactrum* es muy diverso; las bacterias pertenecientes a este género se les ha podido aislar de trigo, tierra, heces, fluidos humanos y sangre (Velasco et al., 1998, Lebuhn et al., 2000), se le considera como un patógeno oportunista en humanos. En el 2004 Ngom A. y colaboradores aislaron un *Ochrobactrum* de nódulos de una leguminosa llamada *Acacia mangium* y en este año se publicó una nueva especie de *Ochrobactrum* (*O. lupini*), ya que fue aislado de *Lupinus honoratus*. Mediante la caracterización del 16S y 23S rRNA se encontró que estas bacterias pertenecen al género de *Ochrobactrum*, el análisis que se realizó de los genes *nodD* y *nifH* indican que se parecen a genes de las rhizobiaceas, lo que sugiere que estos genes se adquirieron por transferencia horizontal (Trujillo et al., 2005)

Por medio de la técnica de PCR no se pudo amplificar un producto de *nifH* ni de genes *nod* de las cepas de *O. anthropi*, pero el análisis de la secuencia del 16S rDNA obtenida mediante ésta técnica nos dice claramente que las cepas con las que estuvimos trabajando pertenecen al género de *O. anthropi*. Otra metodología que involucra el PCR es la generación de patrones de bandeo conocidos como huellas genómicas que son específicas para cada microorganismos dentro de una especie bacteriana (Versalovic et al., 1994); con la utilización de la técnica BOX-PCR, se pudo reconocer que los aislados de los nódulos de frijol producidos por las transconjugantes son *O. anthropi*, ya que tienen patrones idénticos al patrón de la cepa original receptora y diferentes a la huella genómica de *R. tropici*.

La microscopía electrónica es una herramienta de alta resolución y gran poder para el análisis de tejidos tanto animales como vegetales; mediante esta metodología se puede observar la diferenciación de bacteria a bacteroide dentro de los nódulos producidos por *Rhizobium*, entre otras estructuras como los amiloplastos o el almacenamiento de poly- $\beta$ -hydroxybutyrato (PHB) dentro de los bacteroides (Wong et al., 1983, Truchet et al., 1984, Cevallos et al., 1996). En el trabajo de Cevallos et al., describen una mutante de *R. etli* PHB-negativa, generada por la introducción de un interposón en el gen estructural de la síntesis de PHB; los bacteroides generados con esta mutante no almacenan PHB en simbiosis como lo hace la cepa silvestre, pero uno de los datos más relevantes es que la fijación biológica de nitrógeno es más alta en nódulos producidos por la mutante a los 38 días después de la inoculación que en los

nódulos de la cepa silvestre y además, el contenido total de nitrógeno en las plantas inoculadas con la mutante es mayor que en las plantas inoculadas con la cepa silvestre después de 38 días de la inoculación. En el trabajo que estamos presentando, en las fotos obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de nódulos de 21 días se puede observar que las transconjugantes de *O. anthropi* sí se diferencian a bacteroides, pero no almacenan PHB como lo hace *R. tropici* CFN299Tn<sup>5</sup>mob-6.

El poder conocer los determinantes genéticos que permiten la expresión de la información contenida en el pSym de *R. tropici* o que participen en simbiosis nos podría ayudar a entender la especificidad que tienen estos plásmidos en diferentes fondos genéticos. Estos determinantes genéticos se pueden encontrar en *O. anthropi* 24566 que permite la expresión de dicha información genética. La secuenciación del pSym de *R. tropici* CFN299 que en estos momentos se está realizando nos permitirá conocer más de este interesante plásmido simbiótico.

## CONCLUSIONES.-

El plásmido simbiótico de *R. tropici*CFN299Tn5mob-6 es capaz de transferirse sin la utilización de un plásmido ayudador, y replicarse en las cepas utilizadas como receptoras de las tres diferentes especies bacterianas, *B. melitensis*, *S. meliloti* y *O. anthropi*.

La transconjugante de *B. melitensis* 16M-1 que adquirió el plásmido simbiótico de *R. tropici*CFN299Tn5mob-6 esporádicamente produce algún pseudonódulo en plantas de frijol.

Las transconjugantes de *S. meliloti* (818-2, 818-3, 146-31 y 146-33) son capaces de formar nódulos en plantas de frijol, pero no son capaces de fijar nitrógeno.

Las transconjugantes de *O. anthropi* (genotipo 1, genotipo 2, genotipo3, 33786-1 y 33786-2) son capaces de formar nódulos en plantas de frijol y de fijar nitrógeno en estas plantas.

Las transconjugantes de *O. anthropi* (genotipo 1, genotipo 2 y genotipo 3) además de nodular y fijar nitrógeno en plantas de frijol, también son capaces de formar nódulos en plantas de *Leucaena* pero no fijan nitrógeno en estas plantas.

Las transconjugantes de *O. anthropi* A1-1 y B1-1 son capaces de transformarse a bacteroides como lo hace *R. tropici* CFN299Tn5mob-6, pero no son capaces de almacenar PHB a los 21 días.

## Apéndice “A”.

### Medios de Cultivo.

#### PY

Extracto de levadura	3 g
Peptona de caseína	5 g
Agua	c.b.p. 1 L

Ya esterilizado el medio de cultivo se le adiciona 1 ml de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que se prepara con 10.47 g. en 100 ml de agua (esterilizado por separado).

#### LB

Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
NaCl	10 g
Agua	c.b.p. 1L

#### YM

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	500 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
NaCl	100 mg
Manitol	10 g
Extracto de Levadura	0.4 g
$\text{H}_2\text{O}$	c.b.p. 1 L

Para los medios de cultivo sólidos se les adiciona 15 g de agar por litro.

## Apéndice "B".

<b>Fahraeus</b>	<b>Stock(g/l)</b>	<b>Vol. para 1L</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12g	10 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	15g	10 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10g	10 ml
CaCl <sub>2</sub>	10g	10 ml
Citrato Férrico	0.5g	10 ml
Trazas		1 ml

### Stock de Trazas

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2.03g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	220mg
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	80mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	80mg
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 1L

## BIBLIOGRAFÍA.-

Bruce, D. 1888. The micrococcus of malta fever. Practitioner. 40: 241-249

De Ley, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, A., Denijn, M., Vanhoucke, M. and Gillis, M. 1987. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:35-42.

Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid. 42: 73-91.

DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, Guy., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P. H., Hagijs, S., O'Callaghan, D., Letesson, J-J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., and Overbeek, R., 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*: PNAS. 99:443-448.

Díaz, R., Jones, L. M., and Wilson J. B. 1966. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. J. Bacteriol. 93:1262-1268

Díaz, R., Jones, L. M., and Wilson J. B. 1968. Antigenic relationship of the gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough brucellae. J. Bacteriol. 95:618-624.

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

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

Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, d., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dréano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Holding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernández-Lucas, I., Hong, A., Guisar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F-J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K-C., Batut, J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science, 293:668-672.

Gándara, B., López-Merino, A., Rogel, M.A. and Martínez-Romero, E., 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp., J. Clin. Microbiol. 39: 235-240.

Gelvin Stanton B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:223-256

Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z. Li, L-L., Kapur, V. Alt, D. P. and Olsen, S. C. 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J. Bacteriol. 187: 2715-2726.

Hernández-Lucas, I., Mavingui, P., Finan, T., Chain, P., and Martínez-Romero E. 2002. In vivo cloning strategy for *Rhizobium* plasmids. BioTechniques. 33:1-4

Hernández-Lucas, I., Rogel-Hernández, M. A., Segovia, L., Rojas-Jiménez, K. and Martínez-Romero, E. 2004. Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. System, Appl. Microbiol. 27: 703-706.

Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M. and Kersters, K., 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 406-416.

Honeycutt, R. J., McClelland, M. and Sobral, B. W. S. 1993. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. J. Bacteriol. 175:6945-6952

Hynes M. F. and McGregor N.F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Microbiol. 4:567-574.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kat, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, A. 2000. Complete genome structure of the nitrogen- fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Research, 7:331-338

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., and Tabata, S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. DNA Research, 9:189-197.

Leal-Klevezas, D. S., Martínez-de-la-Vega, O., Ramírez-Barba, E. J., Osterman, B., Martínez-Soriano, J. P. and Simpson, J. 2005. Genotyping of *Ochrobactrum* spp. by AFLP Analysis. J. Bacteriol. 187: 2537-2539.

Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., Hartmann, A. and Heulin, T. 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. 50:2207-2223.

Ludwing, W., Amann, R., Martínez-Romero, E., Schonhuber, W., Bauer, S., Neef, A. and Schleifer, K-H. 1998. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant and Soil*. 204: 1-19.

Martínez-Romero, E., Wang, E.T., López-Merino, A., Caballero-Mellado, J., Rogel, M. A., Gándara, B., Toledo, I., and Martínez-Romero, J., 2000. Ribosomal gene based phylogenies on trial: The case of *Rhizobium* and related genera. En: *Biology of Plant-Microbe Interactions Vol. 2*. De Wit, P. J. G. M., Biseeling, T., Stiekema, W. J. (Eds.) International Society for Plant-Microbe Interactions St. Paul Minnesota, U.S.A. pp. 59-64.

Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Gram., P. and Pardo, M. A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.

Martínez, E., Palacios, R., and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 2828-2834.

Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M-J., Bourg, G., Allardet-Servent, A., and Ramuz, M. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* 175:701-705.

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. and Mayer, H. 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and Lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 172:3569-3576.

Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S. and Abe, M., 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 17-27.

Oresnik, I. J., Liu, S.-L., Yost, C. K. and Hynes, M. F., 2000. Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* 182: 3582-3586.

Pardo, M.A., Lagunez, J., Miranda, J., Martínez, E. 1994. Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. Mol. Microbiol. 11:315-321

Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., Dodson, R. J., Umayam, L. e., Brinkac, L. M., Beanan, M. J., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Nelson, W. C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S. E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S. R., White, O., Salzberg, S. L., Hoover, D. L., Lindler, L. E., Halling, S. M., Boyle, S. M. and Fraser, C. M. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. PNAS. 99: 13148-13153.

Rogel, M. A., Hernández-Lucas, I., Kuykendall, L. D., Balkwill, D. L., and Martínez-Romero, E., 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. App. And Environ. Microbiol. 67: 3264-3268.

Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B. and Ronson, C. W. 1995., Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the enviroment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 8985-8989.

Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Julliot, J.-S. Camut, S. and Denarie, J. 1984. Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens* J. Bacteriol. 157:134-142.

Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuela, A-M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. and Velásquez, E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1318-1327.

Velasco, J., Romero, C., López-Goñi, I., Leiva, J., Díaz, R. and Morrión, I., 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 759-768.

Verger, J-M., Grimont, F., Grimont, P: A. D. and Grayon, M., 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 292-295.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J. and Lupski R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell Biol. 5:25-40.

Vincent, J. M., 1970 Manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook, no. 15. Blackwell, Oxford

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173: 697-703.

Wilson, J. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D. L. and Jefferson, R. A., 1995.  $\beta$ - Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. Microbiol. 141: 1691-1705

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. microbiological reviews. 51:221-271.

Wong, C. H., Pankhurst, C. E., Kondorosi, A. and Broughton, W. J. 1983. Morphology of root nodules and nodule-like structures formed by *Rhizobium* and *Agrobacterium* strains containing a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. The Journal of Cell Biology, 97:787-794.