

R. 4059

TD
635



CONSTRUCCION DEL MAPA DE LIGAMIENTO
DE *RHIZOBIUM TRIFOLII* RS176.

Trabajo realizado en los Departamentos de Microbiología de las Facultades de Biología y de Farmacia, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Ciencias, por el Licenciado

MANUEL MEGIAS GUIJO

Sevilla, Noviembre de 1980

Codirector

Director y Ponente

Prof. A.J. Palomares Díaz

Prof. J. Pérez Silva

A mis padres porque sin su esfuerzo no hubiese llegado hasta aquí, a María sinceramente y, especialmente, a mi hijo que con sus sonrisas me ha alegrado la escritura de la Tesis.

RESUMEN

En este trabajo se han estudiado diversos factores que influyen en la letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina en *Rhizobium trifolii*. Con las condiciones consideradas como óptimas se ha investigado sobre la obtención de mutantes auxotróficos y de resistencia a antibióticos. Asimismo, se ha estudiado la transferencia y localización de los genes en un mapa de ligamiento. Se concluye que:

- 1) Se ha seleccionado como sistema de movilización de genes cromosómicos en *Rhizobium trifolii* el plásmido R68.45 ya que presenta una frecuencia de trasmisión y estabilidad mucho mayor que los otros tres sistemas ensayados.
- 2) Dado que la frecuencia de trasmisión de todos los caracteres probados es similar y que la mayoría de los trasconjugantes obtenidos son del tipo R^+ , se puede deducir el que la transferencia mediada por el plásmido R68.45 se asemeja al sistema F' de *Escherichia coli*.

3) Se ha construido un mapa circular de ligamiento del cromosoma de *Rhizobium trifolii*, conteniendo 17 marcadores.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	1
1. PLASMIDOS.....	4
2. FACTORES R.....	8
2.1. <i>Naturaleza molecular</i>	12
2.2. <i>Replicación</i>	14
2.3. <i>Integración en el cromosoma bacteriano</i>	16
2.4. <i>Composición funcional</i>	17
2.5. <i>Composición génica</i>	18
2.6. <i>Movilización del cromosoma del huésped por los plásmidos R</i>	21
3. LOS PLASMIDOS DE RHIZOBIUM.....	22
4. GENETICA DE LA CONJUGACION.....	25
4.1. <i>Genes que dirigen la transferencia del cromosoma</i>	28
4.2. <i>Sistemas de transferencia</i>	31
4.2.1. <i>Sistema F</i>	32
4.2.2. <i>Sistema I</i>	32
4.2.3. <i>Sistema N</i>	33
4.2.4. <i>Sistema P</i>	33
5. TRASFERENCIA GENETICA EN RHIZOBIUM	35

5.1. <i>Trasferencia mediada por factores F'</i>	39
5.2. <i>Trasferencia mediada por factores R</i>	39
5.2.1. <i>Movilización de factores R de grupos de incompatibilidad distintos de P</i>	39
5.2.2. <i>Movilización de factores R del grupo de incompatibilidad P</i>	40
5.2.2.1 <i>El factor RP4</i>	43
5.2.2.2 <i>El factor R68.45</i>	44
6. <i>CONSTRUCCION DE MAPAS GENETICOS EN EL GENERO RHIZOBIUM</i>	46
RESULTADOS.....	50
1. <i>CONDICIONES OPTIMAS PARA EL AISLAMIENTO DE MUTANTES EN RHIZOBIUM TRIFOLII</i>	50
1.1. <i>Generalidades</i>	50
1.2. <i>Ensayos mutagénicos</i>	51
1.2.1. <i>Ensayos con nitrosoguanidina</i>	51
1.2.2. <i>Ensayos con ácido nitroso</i>	56
1.2.3. <i>Ensayos con Metanosulfonato de etilo</i> ...	58
1.2.4. <i>Ensayos con luz ultravioleta</i>	60
1.3. <i>Resumen</i>	62
2. <i>CONSTRUCCION DEL MAPA DE RHIZOBIUM TRIFOLII</i>	67
2.1. <i>Trasferencia de factores R por conjugación de E. coli y P. fluorescens a R. trifolii</i>	67
2.2. <i>Trasferencia intraespecífica del factor R68.45 y análisis de la movilización de un solo gen cromosómico en R. trifolii</i>	70

2.3. Estudio de algunas características de los cruzamientos intraespecíficos de <i>R. trifolii</i> mediados por el factor R68.45.....	72
2.3.1. Alcance de la transferencia genética..	73
2.3.2. Incidencia del carácter R ⁺ entre los trasconjugantes.....	75
2.4. Construcción del mapa de ligamiento de <i>R. trifolii</i> RS176 por conjugación mediada por el factor R.68.45.....	76
2.4.1. Estudio de los porcentajes de ligamiento entre pares de marcadores.....	77
2.4.2. Análisis de "tres factores" en algunos cruzamientos.....	90
2.4.3. Ordenación general de los genes del cromosoma.....	95
DISCUSION.....	98
APENDICE I. MATERIALES.....	119
1. NOMENCLATURA GENETICA.....	119
2. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	120
2.1. No originales.....	122
2.2. Originales.....	122
3. PRODUCTOS QUIMICOS.....	124
3.1. Antibióticos.....	124
3.2. Otros productos.....	124
4. TAMPONES.....	125

4.1. <i>Tampón tris-maleato</i>	125
4.2. <i>Tampón M9</i>	125
4.3. <i>Tampón fosfato</i>	126
4.4. <i>Tampón acetato</i>	126
5. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.....	127
6. SOLUCION NUTRITIVA PARA <i>TRIFOLIUM ALEJANDRI-</i> <i>NUM</i>	129
APENDICE II. METODOS.....	131
1. PRUEBA DE NODULACION.....	131
2. AISLAMIENTO DE <i>RHIZOBIUM</i> A PARTIR DE NODULOS..	132
3. CULTIVO DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO....	133
4. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS.....	133
5. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA.....	133
5.1. <i>En tampón</i>	134
5.2. <i>En medio de cultivo</i>	134
6. TRATAMIENTO CON METANOSULFONATO DE ETILO.....	135
7. TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA.....	135
8. TRATAMIENTO CON ACIDO NITROSO.....	136
9. AISLAMIENTO DE MUTANTES.....	136
9.1. <i>Aislamiento de mutantes resistentes a anti-</i> <i>bióticos y a análogos de aminoácidos</i>	136
9.2 <i>Aislamiento, caracterización y purificación</i> <i>de los mutantes auxotrofos</i>	137
9.3. <i>Selección de mutantes auxotróficos por el méto-</i> <i>do de la penicilina</i>	138

10. CONJUGACION ININTERRUMPIDA.....	140
APENDICE III. BIBLIOGRAFIA.....	142
AGRADECIMIENTOS.....	165

INTRODUCCION

Desde hace bastante tiempo se conoce el fenómeno de la fijación de nitrógeno por las raíces de las plantas leguminosas. También se conocía el hecho de que para que tenga lugar este fenómeno es preciso que las raíces posean unos abultamientos a los que se llamó posteriormente, "nódulos". Fueron Hellriegel y Wilfart quienes, en 1888, descubrieron en los nódulos la presencia de unas bacterias, posteriormente clasificadas dentro del género *Rhizobium*, a las que se atribuyó la fijación de nitrógeno.

Actualmente las bacterias del género *Rhizobium* siguen teniendo una importancia capital en la agricultura (se calcula que anualmente son capaces de fijar unas 85×10^6 toneladas de nitrógeno), por lo que son muchos los grupos de investigadores dedicados a su estudio, tanto desde el punto de vista puramente básico, como el aplicado.

El género *Rhizobium* incluye seis especies: *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. lupini* y *R. japonicum* y el grupo *cowpea* (rizobios de cre

cimiento lento aislados de leguminosas tropicales). Cada uno de ellos infecta específicamente a un grupo de plantas, tanto leguminosas como no leguminosas. No obstante y debido a que los criterios de clasificación son muy discutibles, actualmente existe gran controversia en cuanto a la sistemática de este género (Graham, 1964; De Ley y Russell, 1965; Graham, 1976; Akkermans et al., 1978).

En cuanto a los aspectos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la simbiosis, puede decirse que avanzan con más rapidez que el resto de los estudios y que son muy numerosos los trabajos aparecidos en estos campos. Como revisiones actuales sobre estos temas y sobre *Rhizobium* en general se recomiendan las de Shanmugam y Valentine (1975), Yates (1976), Dénarié y Truchet (1979) y Brewin et al. (1980) y los libros correspondientes a los Symposium sobre fijación de nitrógeno de Pullman (1974), de Salamanca (1976) y Madison (1978), los volúmenes 6 y 7 del Internacional Programme (editados respectivamente por Stewart y Nutman, 1976) y el compendio "A Treatise on Dinitrogen Fixation" (editado por Hardy y Silver, 1977).

En contraste con la bioquímica y la fisiología, es poco lo que se sabe sobre la genética de estas bacterias,

quizás debido a las dificultades técnicas que presentan. En efecto, el hecho de que estas bacterias no conjuguen o lo hagan muy mal ha impedido el desarrollo normal de su genética. Ultimamente y gracias al descubrimiento - de que plásmidos de tipo R procedentes de otros géneros bacterianos pueden mediar en la transferencia de material genético en el género *Rhizobium*, se está avanzando mucho en este campo y cada vez es mayor el número de grupos científicos dedicados a él. No obstante, hasta ahora sólo se ha profundizado en el estudio de las especies, *R. lupini*, *R. leguminosarum* y *R. meliloti* (Casadesús y Olivares, 1979; Dénarié y Truchet, 1979; Beringer, 1980).

Con esta Tesis se ha pretendido sentar las bases - para el estudio de otra de las especies, *R. trifolii*, - muy importante por ser específica de plantas de gran interés forrajero. Concretamente, se ha abordado la construcción del mapa de ligamiento de esta especie. Para ello se han empleado, según se indicó anteriormente, -- plásmidos R. La utilización de estos plásmidos en *Rhizobium* se considera tan interesante, que se ha querido dedicar la mayor parte de esta Introducción a su estudio.

1. PLASMIDOS

Los plásmidos son replicones que se heredan de forma estable en estado extracromosómico y que se encuentran en una gran variedad de bacterias tanto Gram (+) - como Gram (-). Las características distintivas de los plásmidos son: su separación física del cromosoma de la bacteria huésped y el mantenimiento estable de este estado extracromosómico. Algunos elementos plásmídicos, llamados anteriormente episomas, tienen la propiedad de integrarse de forma reversible en el cromosoma huésped. Los plásmidos en su estado natural son moléculas circulares de ADN de doble cadena, cerradas covalentemente, Helinski y Clewell (1971).

Los plásmidos pueden incluirse en dos grupos, conjugativos y no conjugativos, según lleven o no los genes que promueven su transferencia en la conjugación bacteriana (genes *tra*). Como se refleja en la Tabla I, los plásmidos no conjugativos o no autotrasferibles llevan los genes responsables de la replicación autónoma de estos elementos, pero carecen de los que promueven la transferencia tanto del mismo plásmido, como del cromosoma de la célula huésped. Si un plásmido de los de esta clase posee además genes responsables de la producción de bacteriocinas (antibióticos proteicos similares a los

producidos extracelularmente por *E. coli*), se denomina "plásmido bacteriocinogénico". Si estos genes adicionales lo que le confiere es resistencia a antibióticos, quimioterápicos o metales pesados, se denominan plásmidos de "resistencia" o plásmidos "R".

Otro tipo de plásmido es el conjugativo o autotrasferible, llamado también factor sexual. Estos elementos plásmídicos poseen genes funcionales que gobiernan su replicación autónoma y genes adicionales que promueven la transferencia de genes cromosómicos en los apareamientos bacterianos. Igual que en el caso de los plásmidos no conjugativos, el plásmido posee genes o regiones genéticas que produce específicamente bacteriocinas, resistencias a antibióticos o producción de enterotóxicas, el plásmido se designa como bacteriocinogénico, R o Ent, respectivamente. Actualmente, y dado el auge adquirido por los plásmidos, existen clasificaciones de plásmidos más completa que la expuesta, tal como la aportada por Holloway (1979).

No todos los elementos plasmidiales pueden coexistir establemente en una misma célula. Según este concepto los plásmidos se clasifican en varios grupos de incompatibilidad. En bacterias Gram (-) se han descrito unos 24 grupos distintos. En general, los miem-

TABLA I. Tipos de plásmidos y características principales, según Helinski (1976).

Clase de plásmido	Regiones genéticas que poseen	Tipo de plásmido	
No conjugativo	Replicación autónoma	Producción de bacteriocina	Plásmido bacteriocinogénico
		Resistencia a antibióticos	Plásmido R
Conjugativo (factores sexuales)	Replicación autónoma y transferencia (tra)	Regiones de cromosoma bacteriano	Plásmido F'
		Producción de bacteriocina	Plásmido bacteriocinogénico
		Resistencia a antibióticos	Plásmido R
		Producción de enterotoxinas	Plásmido Ent

bros de un mismo grupo de incompatibilidad no pueden coexistir establemente en una misma célula bacteriana. El grupo de incompatibilidad P resulta de particular utilidad para la construcción de mapas genéticos ya que presentan un amplio rango de huéspedes y son capaces de mantenerse estables en una gran variedad de bacterias Gram (-). No ocurre lo mismo con los de otros grupos, como ColE1, cuyo rango de huéspedes es relativamente pequeño.

Los plásmidos también pueden clasificarse según el número de copias presentes en una misma célula bacteriana, bien plásmidos con bajo número de copias por célula o plásmidos con alto número de copias por célula. El número de copias de plásmidos refleja el control plasmidial, que puede ser control estricto (bajo número de copias) o control relajado (alto número de copias). Los plásmidos con control relajado son, generalmente, de bajo peso molecular y no conjugativos, estando presente más de 10 copias por célula. Los plásmidos con control estricto son de alto peso molecular, conjugativos y suelen coexistir de una a tres copias del mismo en cada célula.

En estirpes silvestres de *Rhizobium* solo se han encontrado plásmidos bacteriocinogénicos, de resistencia

(R) y de control de algunas características simbióticas (Schwinghamer, 1975; Dunican et al., 1976; Nuti et al., 1977; Olivares et al., 1977; Bedmar y Olivares, 1979; Dénarié et al., 1979; Schwinghamer y Dennis, 1979; Spitzbarth et al., 1979) De ellos, solo los R son capaces de transferir material cromosómico, según se verá más adelante. Sin embargo y con el fin de construir mapas genéticos, se ha podido transferir plásmidos de tipo R y F' desde otras estirpes bacterianas a *Rhizobium* (Datta y Hedges, 1972; Mergeay et al., 1973).

Debido a la baja eficiencia de transmisión de los factores F' en *Rhizobium* (Datta y Hedges, 1972), este factor no se utiliza prácticamente.

De lo anteriormente expuesto se deduce que los plásmidos R resultan ser los instrumentos más útiles en los estudios de mapas genéticos en *Rhizobium*.

2. FACTORES R

Los factores R se descubrieron por primera vez por Ehrlich (1907) en *Trypanosoma brucei*.

Sin embargo, el interés masivo por estos factores se despertó a partir del año 1959, año en el que dos au

tores Ochiai et al. y Akiba et al. describieron la transferencia de resistencia múltiple a drogas en estirpes - de *Shigella* y *Escherichia* de origen clínico.

Los factores R se encuentran ampliamente distribuidos entre las especies bacterianas, principalmente las pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y a los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*. Más recientemente se han descubierto en *Neisseria*, *Haemophilus*, *Staphylococcus* y algunos anaerobios obligados.

La distribución de factores R en bacterias entéricas, fué bien estudiado por Mitsuhasi, quien demostró - que más del 60% de las especies de *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Proteus* son resistentes a tetraciclina, cloramfenicol, estreptomycin y sulfamidas, debido a la presencia en ellas de factores R. Estos -- factores pueden ser transferidos intergenéricamente.

Kontomichalou et al. (1976) y Yagi y Clewell (1976) demostraron que también existen en *Pseudomonas aeruginosa*, ya que pueden ser transferidos a bacterias de la misma especie por conjugación y a otras especies tales como *E. coli* (Holloway, 1979).

Los factores R de bacterias anaerobias estrictas, no han sido estudiados con mucho detalle. Los primeros

trabajos, realizados por Stiffler et al. (1974) en este tipo de bacterias, demostraron la existencia de plásmidos, pero su presencia no implicaba resistencia a ninguna droga. Posteriormente se han identificado factores R con todas sus características en *Bacteroides fragilis* (Privitera et al., 1979; Tally et al., 1979). La especie más investigada, debido a su amplio espectro de resistencia, ha sido *Clostridium perfringens* (Brefort et al., 1978; Duncan et al., 1978).

Se han encontrado factores R en varias especies de *Rhizobium*. Cole y Elkan (1973), demostraron la existencia de un factor R en *R. japonicum* que determina la resistencia a los antibióticos penicilina, neomicina y cloramfenicol.

La presencia de estos factores se puede demostrar por la pérdida simultánea de la resistencias por tratamiento con algunos agentes y también de forma espontánea.

Los plásmidos R pueden perderse espontáneamente de la célula huésped tras una larga conservación de la bacteria en el laboratorio y algunos son inestables a altas temperaturas (Yoshida et al., 1974; Katsumata et al., 1975), siendo eliminados de sus hospedadores en esas condiciones.

Mediante agentes químicos como el EDTA y SDS se pue

den seleccionar bacterias que no porten plásmidos, ya que se realiza la destrucción selectiva de la bacteria que lleva el plásmido. Estos productos actúan en la superficie bacteriana de células infectadas con plásmidos R, donde ocurren algunos cambios después de la penetración del factor R, haciéndose las bacterias, entonces, susceptibles a estas drogas. Consecuentemente, estos productos permiten el crecimiento selectivo de bacterias sin plásmido R (Adachi et al., 1972; Salisbury et al., 1972).

El segundo tipo de eliminación de plásmidos es por inhibición de su replicación, bien por intercalación de agentes químicos entre la dos cadenas de ADN, tales como acriflavina y bromuro de etidio, o bien mediante agentes inhibidores de la síntesis de ARN, tales como la rifampicina (Hashimoto et al., 1964; Johnston y Richmond, 1970; Hahn y Ciak, 1971).

Existe otro mecanismo para la eliminación directa de plásmido que consiste en someter las células bacterianas a hambre de timina (Pinney y Smith, 1971). Esto sugiere que se induce la síntesis de una nucleasa que actúa más específicamente sobre el ADN plasmídico que sobre el ADN cromosómico (Tweats et al., 1974).

Dunican et al. (1976), estudiando una raza inefec-

tiva en la fijación de nitrógeno de *R. trifolii* encontraron que poseía un plásmido natural que le confería resistencia a la penicilina. Se eliminó el plásmido mediante tratamiento con bromuro de etidio pero las colonias resultantes seguían siendo inefectivas, lo que demuestra que la presencia de la resistencia a la penicilina y, en consecuencia, del plásmido no inhibe la efectividad de la fijación de nitrógeno.

Los plásmidos R pueden transportar varios genes de resistencia a la droga. De hecho, más del 70% de los factores R confieren resistencias a cuatro agentes quimioterápicos; el 14% a tres; el 7% a dos y el 7% a uno solo (Tanaka et al., 1975).

Los plásmidos no conjugativos suelen codificar resistencia simple o, como mucho y más infrecuentemente, resistencia doble, siendo el tamaño de su ADN, normalmente, más pequeño que el de los plásmidos conjugativos al carecer de los genes que determinan trasferibilidad en la conjugación.

2.1 *Naturaleza molecular*

Según se dijo anteriormente, los plásmidos R están constituidos por moléculas de ADN. Su peso molecular -

oscila entre 30 y 50 megadaltons para los conjugativos y suele ser menor de 10 megadaltons o mayor de 80 megadaltons para los no conjugativos. Su tamaño es variable (Helinski, 1976) y puede determinarse bien por estudios de velocidad de sedimentación en gradiente de sacarosa o por microscopía electrónica.

Al igual que todos los demás plásmidos estudiados, los plásmidos R pueden ser aislados como moléculas de ADN circular cerradas covalentemente. Estas moléculas están superenrolladas lo que quiere decir que no existe rotura en ninguna de las dos cadenas de ADN (Helinski y Clewell, 1971). No se puede asegurar que el 100% de las moléculas de ADN plasmídico se encuentren en esta fórmula dentro de la célula. Sin embargo, con los métodos de aislamiento y purificación empleados hasta ahora solo se han encontrado círculos como los descritos.

La mayoría de los plásmidos pueden ser aislados por el método de lisado aclarado, que consiste en lisis suave de la célula seguida de una centrifugación a bajas revoluciones, lo que permite que el ADN cromosómico sedimente en el fondo del tubo de centrifuga, mientras que el ADN plasmídico permanece en el sobrenadante (Clewell et al., 1969; Kline et al., 1971, 1975).

La mayoría de los plásmidos del tipo Col, plásmidos R y plásmidos F, se aislaron por el procedimiento del li

sado aclarado, tienen la interesante propiedad de convertirse en formas lineales mediante tratamiento con agentes que destruyen las estructuras proteicas, tales como detergentes y enzimas proteolíticas (Clewell y Helinski, 1969,1970; Kline y Helinski, 1971; Humphreys et al., 1972; Messing et al., 1972). Como resultado de tales tratamientos, hay un aumento en el coeficiente de sedimentación del ADN plasmídico respecto del de moléculas circulares cerradas. Estos experimentos se interpretan como un indicio de que el círculo de ADN del plásmido se mantiene cerrado covalentemente gracias a una proteína, llamada "complejo de relajación" (Clewell et al., 1972; Kuperztoch-Portnoy et al., 1974).

Helinski (1973) sugirió que los complejos de relajación juegan un importante papel en la replicación y en el mantenimiento estable del plásmido. Además, estos complejos pueden servir como punto de unión del ADN plasmidial a la membrana celular. Por último, también es posible que estas proteínas estén implicadas en el mecanismo de transferencia del plásmido durante el apareamiento bacteriano (Lovett et al., 1974, 1975).

2.2 *Replicación*

En una misma célula suelen coexistir de una a tres

copias de plásmidos R si son de gran tamaño y de cinco a treinta copias de plásmidos R si son de pequeño tamaño.

Por otra parte, la cantidad de ADN de plásmido R es constante a lo largo de la fase exponencial de crecimiento. Esto indica que a la vez que se duplica el ADN cromosómico del huésped, hay una duplicación del número de copias del plásmido R (Katsamatsu y Rownd, 1970; Rownd et al., 1971). En la fase estacionaria de crecimiento la cantidad de ADN plasmidial aumenta respecto a la de ADN cromosómico de tal forma que se puede llegar a quintuplicar el número de copias del plásmido que había originalmente (Rownd et al., 1971). Si el cultivo vuelve a la fase exponencial el porcentaje de plásmidos R decrece hasta alcanzar el valor original. La cinética de este proceso concuerda con un modelo en el que parte de los plásmidos recobran su velocidad de replicación normal, mientras que el resto no se replica en absoluto, con lo que estos últimos se irán diluyendo sucesivamente en cada división (Katsamatsu, 1970).

Anderson (1965, 1968) llegó a la conclusión que el número de copias del factor R que existe por célula bacteriana, se encuentra regulado por varios sistemas diferentes.

Los plásmidos R poseen dos orígenes en los cuales se puede comenzar la replicación aunque solo uno de --

ellos es funcional (Perlman y Rownd, 1976)

En determinadas condiciones sufren recombinación y forman plásmidos R más complejos (Rownd et al., 1971), que tienen, por tanto, muchos orígenes de replicación (Huberman y Riggs, 1968; Newlon et al., 1974).

2.3. Integración en el cromosoma bacteriano

Recientemente, por estudios de microscopía electrónica, se ha demostrado la existencia de segmentos de -- ADN repetidos de múltiples lugares del cromosoma de *E. coli*, en plásmidos y en fagos y que se denominan "elementos IS" (Novick, 1969). Las regiones IS también llamadas "palindromas de ADN" son segmentos polinucleotídicos, de menos de 1400 pares de bases, que presentan en sus extremos secuencias de nucleótidos iguales, pero con dirección invertida. Estas regiones IS parecen tener importancia en la integración de los plásmidos en el cromosoma bacteriano y en la recombinación entre los distintos plásmidos. Los segmentos IS no son capaces de replicarse (Starlinger y Saedler, 1976; Bukhari et al., 1977; Guyer, 1978; Cohen y Shapiro, 1980 y Starlinger, 1980).

Los plásmidos R pueden integrarse parcial- o total- mente en el cromosoma bacteriano. La integración parcial consiste en que solo se integran algunos genes de los que confieren resistencia, es decir, recombinación ilegítima de elementos trasponibles de ADN. Los genes integrados no pueden generalmente volver al estado citoplásmico por sí mismos y si lo hacen se pierden de la célula huésped debido a que ya no son capaces de replicarse autónomamente.

Nishimura et al. (1971), utilizando un mutante sensible para iniciación de la replicación del plásmido, descubrió que es posible la integración de plásmidos R completos. Las estirpes así generadas no pierden el plásmido a alta temperatura presumiblemente porque son replicados conjuntamente con el cromosoma bacteriano. La mayoría de estas estirpes tienen propiedades Hfr y pueden promover la transferencia de cromosoma bacteriano con alta frecuencia (Cohen et al., 1972; Rownd et al., 1971; Clowes, 1972; Perlman et al., 1975). Aunque actualmente se duda de que sea estable esta integración y los complejos que se forman son grandes F' (Holloway, 1979).

2.4 *Composición funcional*

La mayoría de los estudios genéticos y moleculares de los plásmidos R se han realizado con los aislados de los géneros *Salmonella* y *Shigella* (Anderson, 1968; Clowes, 1972; Davies y Rownd, 1972; Helinski, 1973; Watanabe, 1973) y *P. mirabilis* (Perlman y Rownd, 1975; Rownd et al., 1975). La caracterización genética y molecular revelan que estos plásmidos R conjugativos constan de dos componentes: Un factor RTF que determina la transferencia del plásmido durante el apareamiento bacteriano y un componente r que contiene los genes de resistencia a la droga o drogas (Anderson, 1968; Nisioka et al., 1969; Cohen et al., 1970, 1971; Rownd et al., 1971; Clowes, 1972; Watanabe, 1973; Perlman et al., 1975).

En *E. coli*, *Serratia marcescens* y *S. typhimurium*, los componentes RTF y r están estrechamente unidos (Cohen y Miller, 1970; Rownd et al., 1971; Clowes, 1972). En *E. coli*, ocasionalmente se pueden aislar, bien espontáneamente o bien por transducción, células en las que el plásmido ha sufrido recombinación interna con segregación de marcadores. De hecho, la mayor parte de los plásmidos compuestos completos tienden a disociarse en los huéspedes Rec⁺ (Holloway, 1979). Por ejemplo, en *E. coli* los plásmidos constan solamente del componente RTF acompañado de los genes de la resistencia a la tetraciclina (Sharp et al., 1973; Perlman et al., 1975), y han

perdido el resto del componente.

El ADN de los plásmidos R con dos componentes tiene un peso molecular de 30 a 50 megadaltons y una densidad de 1,710 a 1,712 g/ml, similar a la densidad del ADN cromosómico de *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella* (Nisioka et al., 1969,1970; Cohen et al., 1970,1971; Falcow et al., 1971; Rownd et al., 1971; Clowes, 1972; Sharp et al., 1973; Morris et al., 1974; Perlman et al., 1975). Consecuentemente, en estas especies el ADN del plásmido no se distingue como una banda satélite del ADN cromosómico de la célula huésped en gradiente de densidad de cloruro de cesio. Sin embargo, ambos tipos de ADN pueden separarse atendiendo a otras características según se indicó anteriormente.

Por el contrario, en *S. marsecens* y *P. mirabilis* cuyo ADN cromosómico tiene una densidad de 1,718 y de 1,700 g/ml, se forma una banda distinguible del ADN plasmidial en un gradiente de densidad de cloruro de cesio (Falcow et al., 1966).

2.5. Composición génica

Según se ha dicho anteriormente, los plásmidos R transportan dos tipos de genes:

1. los que confieren resistencia a drogas, presentados en la Tabla II.

2. los que conciernen a la autonomía del plásmido, -
cuales son:

rep, responsable de la replicación

inc, que confieren incompatibilidad

tra, que confieren transferibilidad

sex, determinante de la exclusión superficial

El ligamiento genético entre estos genes se ha realizado por análisis de recombinación entre mutantes puntuales (Hashimoto y Hirota, 1966; Hashimoto y Mitsuhashi, 1966) o por análisis de delección mediante la técnica de transducción (Hasuda et al., 1975).

Los plásmidos R no conjugativos derivan de plásmidos R conjugativos por pérdida de los genes que le confieren la transferibilidad (Cohen y Chang, 1973; Hedges y Jacob, 1974). Por otro lado, los plásmidos R conjugativos se pueden formar por unión de plásmidos R no conjugativos con un factor RTF (Mitsuhashi et al., 1969).

La existencia de muchos plásmidos R diferentes, puede ser explicada por la adición o pérdida de unidades - determinantes de resistencia llamadas trasposones. Un trasposón consiste en uno o más determinantes de resistencia a drogas, que, a veces, posee en ambos extremos -

TABLA II. Símbolos genéticos de las resistencias a las drogas codificados por plásmidos R. En la nomenclatura se siguen las recomendaciones de Demerec et al. (1966) y Novick et al. (1976).

Fenotipo	Genotipo	Resistencia
CM	<i>cm1 (cat cam)</i>	Cloramfenicol
TC	<i>tet</i>	Tetraciclina
SA	<i>sul</i>	Sulfamida
SM	<i>aph (3'') (str aphC)</i>	Estreptomina
SM	<i>aad (3'') (str aadA)</i>	Estreptomina
SP	<i>aad (3'') (spe aadA)</i>	Espectomicina
GM	<i>aac (6') (aacA)</i>	Gentamicina
GM	<i>aac (2') (aacB)</i>	Gentamicina
GM	<i>aac (3) (aacC)</i>	Gentamicina
GM	<i>aad (2'') (aadB)</i>	Gentamicina
KM	<i>aph (3') (kan aphA)</i>	Kanamicina
KM	<i>aac (6') (kan aacA)</i>	Kanamicina
KM	<i>aad (2'') (kan aadB)</i>	Kanamicina
EM	<i>mac (ery ero erm)</i>	Macrólidos
FA	<i>fus</i>	Acido fusídico
APC	<i>amp (la pen)</i>	Ampicilina
CPC	<i>bla</i>	Carbenicilina
CER	<i>bla</i>	Cefalosporina
PC	<i>pen (bla amp)</i>	Penicilina
Co	<i>cob</i>	Ión cobalto
Hg	<i>mer</i>	Ión mercúrico
Ni	<i>nic</i>	Ión níquel

secuencias de inserción. Los trasposones son capaces - de integrarse en muchos lugares del cromosoma, no necesariamente de secuencia homóloga. La inserción de los trasposones esta directamente controlada por su secuencia de inserción sin una participación directa de los mecanismos de recombinación presentes en la célula huésped (Starlinger y Saedler, 1976; Campbell et al., 1977; Heffron et al., 1977; Cohen y Shapiro, 1980).

2.6. *Movilización del cromosoma del huésped por los plásmidos R*

La movilización del cromosoma bacteriano por los plásmidos R pueden tener lugar de dos maneras diferentes: La primera de ella es similar a la transferencia mediada por el factor F, en la que el cromosoma es transferido sin polaridad y a baja frecuencia. En este caso, la frecuencia de transferencia del plásmido es de 10^{-2} a 10^{-4} y la del cromosoma bacteriano es de 10^{-7} a 10^{-8} .

El segundo tipo es una transferencia polarizada, similar a las presentadas por los F'. En este caso, se trasfiere una región específica del cromosoma pero con una alta frecuencia (de 10^{-2} a 10^{-3}) (Pearce y Meinell, 1968; Johnston et al., 1978a, 1978b; Julliot y Boistard,

1979; Kiss et al., 1980).

En este tipo de transferencia generalizada es necesaria la integración previa del plásmido en el cromosoma y la posterior desintegración, no así en la transferencia sin polaridad (Clowell y Moody, 1966; Moody y Hayes, 1972).

3. LOS PLASMIDOS DE *RHIZOBIUM*

En *Rhizobium* se han descrito factores extracromosómicos que determinan resistencia a antibióticos, bacteriocinas, DPS⁺, composición del polisacárido y propiedades simbióticas tales como especificidad, infectividad y efectividad. La naturaleza no cromosómica de estos determinantes se basa en que pueden perderse con relativa facilidad, bien espontáneamente, o bien mediante tratamiento con un agente eliminador de plásmido como puede ser el naranja de acridina (Salisbury et al., 1972; - Parijskaya, 1973; Zurkowski et al., 1973; Palomares et al., 1978; Schwinghamer y Dennis, 1979; Spitzbarth et al. 1979).

No todas las alteraciones del fenotipo simbiótico son debidas a curación del plásmido, sino que también pue

den perderse como resultado de las mutaciones del tipo resistencia a fagos o a antimetabolitos y auxotroffas (Klęczkowska, 1965; Schwinghamer, 1969; Lorkiewicz et al., 1971; Scherrer y Dénarié, 1971; Zelazna-Kowalska - et al., 1971; Russel y Jones, 1973; Dénarié y Truchet, 1974; Dénarié et al., 1975; Zelazna-Kowalska et al., - 1977; Sanders et al., 1978; Kiss et al., 1979; Caviedes et al., 1980).

Solo en muy pocos casos se ha podido poner de mani-
fiesto la transferencia de plásmidos que llevan genes sim-
bióticos (Higashi, 1967; Dunican y Tierney, 1974; Maier
et al., 1978). Higashi consiguió la transferencia de la
especificidad de *R. trifolii* a *R. phaseoli*, mediante con-
jugación interespecífica. Este autor, propone la exis-
tencia de un episoma responsable de esa propiedad, basan-
dose en la pérdida del factor mediante tratamiento con -
naranja de acridina y en la observación en que su tras-
ferencia no va asociada a marcadores cromosómicos.

Dunican y Tierney (1974) realizaron la transferencia
de los genes de la fijación nitrógeno desde *R. trifolii*
a un mutante Nif^- de *K. aerogenes*. Maier et al. (1978),
realizaron la transferencia de los genes implicados en -
la caracterización antigénica referente al lipopolisaca-
rido (antígeno O), desde *R. japonicum* a *A. vinelandii* -
que es incapaz de fijar nitrógeno y por supuesto, no po

see las características antigénicas de *R. japonicum*. De 50 transformantes Nif^+ de *A. vinelandii*, solamente tres poseían las propiedades antigénicas de *R. japonicum*.

Stanley y Dunican (1979), utilizando como donadora de los genes *nif* una estirpe de *R. trifolii* T1 con el plásmido RPI incorporado, lograron movilizar dichos genes mediante conjugación hasta *Agrobacterium* y *Klebsiella*.

Los únicos factores autotrasferibles de *Rhizobium* que se demuestran por conjugación son: El descrito por Cole y Elkan (1973) en estirpes de *R. japonicum*. Este factor determina resistencia múltiple a antibióticos (penicilina, neomicina y cloramfenicol). No se ha descrito si este factor es capaz de promover transferencia cromosómica a semejanza de los factores R de *Pseudomonas* y de las Enterobacterias. También se ha descrito autotransferencia del plásmido pEZ1 entre estirpes de *R. meliloti* descrito por Bedmar y Olivares (1980).

Existen estirpes bacteriocinogénicas de *Rhizobium* en las que las rizobiocinas pueden estar determinadas por la existencia de un plásmido. Beringer (1974a y 1974b) sugirió que, en *R. leguminosarum*, al menos un factor bacteriocinogénico era capaz de ser transferido por con-

jugación. El que esta transferencia tenga lugar con alta frecuencia (alrededor de 1×10^{-1} de las células se hacen bacteriocinogénicos), sugiere que esta propiedad es transferida por un plásmido. Hirsch (1979) describió en *R. leguminosarum* la existencia de un plásmido capaz de producir bacteriocinas.

Brewin et al. (1980) han demostrado la transferencia de genes simbióticos mediante plásmidos bacteriocinogénicos en *R. leguminosarum*, por trasducción.

4. GENETICA DE LA CONJUGACION

Como es conocido, el método de análisis genético más utilizado en células procarióticas es la conjugación. Sin embargo, en algunas especies bacterianas ésta no resulta fácil debido a la carencia de factores sexuales propios.

La conjugación es un proceso de transferencia de genes entre bacterias que requiere el contacto físico entre células y que originalmente fue descrito por Lederberg y Tatum (1946), trabajando con *E. coli* k12. Este proceso ocurre en la mayoría de las bacterias Gram (-). Hayes (1953) fué quien descubrió que la transferencia del cromosoma requiere la presencia de un elemento gené

tico autónomo autotrasferible. Este autor describió por primera vez el factor sexual F. Watanabe (1973) y otros autores sugirieron que otros plásmidos, factores Col y factores R, también poseen la propiedad de transferir material genético de una célula a otra. Estos plásmidos conjugativos llevan la información para sintetizar estructuras y proteínas necesarias para la conjugación, - cuales son: (1) el pelo sexual y otras estructuras de la superficie celular que proporcionan la vía de penetración para transferir el ADN; (2) las enzimas requeridas para este complejo proceso y (3) los productos de exclusión superficial que impiden la formación de parejas ilegales.

La función del pelo sexual en la conjugación es establecer un punto de contacto entre el extremo del mismo y un lugar específico en la superficie de la célula receptora. El pelo es esencial para la infección de las células por fagos de ARN, que se adsorben a todo lo largo de él (Brinton et al., 1964), y fagos filamentosos de ADN de una sola cadena que se adsorben en su extremo.

El pelo se puede eliminar de la célula por simple agitación o por mutación. En algunos casos, el pelo sirve como puente de paso para el ADN de la célula donadora a la célula receptora. En otros, se retrae por despolimerización de sus subunidades hasta que se ponen en con-

tacto las membranas de las células conjugantes y entonces tiene lugar la transferencia del ADN. Esta atracción de las células apareadas y la posterior formación de un puente de conjugación no implica directamente a las subunidades del pelo. La retracción del pelo se observa durante la conjugación (Ou y Anderson, 1970), en la infección por un fago ADN específico de F (O'Callaghan et al., 1973), así como, con tratamientos con productos químicos (iones cianuro) y el calor (Novotny y Fives-Taylor, 1974, 1978).

Como consecuencia del par de acoplamiento se genera una señal que se postula que consiste en un cambio conformacional en la estructura del pelo. Esta señal podría ser el disparo de la retracción, en los casos en que se dé este fenómeno, y también de la síntesis de las enzimas requeridas por el plásmido durante el proceso de transferencia. Como consecuencia, una endonucleasa codificada por el plásmido corta una de las dos cadenas del ADN del plásmido en un lugar específico. A continuación, la cadena lineal se trasfiere a la célula receptora empezando por el extremo 5'. La transferencia va acompañada de la replicación de esta cadena en la célula receptora y de la cadena que permanece en la célula donadora. La replicación en la célula donadora se realiza mediante un mecanismo de replicación distinto al de la replicación vegetativa (Vapnek y Rupp, 1971), y en ningún ca

so es esencial para la transferencia (Sarathy y Siddiqi, 1973). La molécula de ADN de cadena única se trasfiere como monómeros a la célula receptora (Boulnois y Wilkins, 1978) y se replica y se recirculariza en la célula receptora por mecanismos no identificados hasta ahora.

La exclusión superficial impide la formación de pares de acoplamiento ilegales, por inactivación del sitio receptor del extremo distal del pelo del donador (Achtman et al., 1971; Willetts y Maule, 1974; Beard y Bishop, 1975).

4.1. Genes que dirigen la transferencia del cromosoma

La genética de la conjugación está profundamente estudiada en células portadoras de factores F. No así en células que tienen otros factores. No obstante, se presume que los resultados obtenidos por los primeros son perfectamente extrapolables a los segundos.

Los genes requeridos para la conjugación se identifican por complementación entre mutantes deficientes en la transferencia de plásmidos (Achtman et al., 1971; Ohtsubo et al., 1970). De esta forma se han identificado catorce genes: *traA*, *traB*, *traC*, *traD*, *traE*, *traF*, *traG*, *traH*, *traI*, *traJ*, *traK*, *traL*, *traS* y *traT* (Ohtsubo et

al., 1970; Ippen-Ihler et al., 1972), y más recientemente se han descrito los *traM* (Achtman et al., 1978d); -- *traN*, *traU*, *traV*, y *traW* (Miki et al., 1978b) y *traY* (Willetts y McInteri, 1978).

Del hecho de que todos los mutantes *traA*, *traB*, -- *traC*, *traE*, *traF*, *traH*, *traK* y *traL*, y algunos mutantes en *traG* sean resistentes a fagos, se dedujo que eran responsables de la formación del pelo (Ohtsubo, 1970; -- Achtman et al., 1972; willetts y Achtman, 1972).

El producto del gen *traI*, parece ser la endonucleasa requerida para el inicio de la transferencia del ADN -- (Willetts, 1972).

Las mutaciones en *traD* impiden que los fagos de -- ARN se adsorban al pelo, luego su producto génico interviene en un proceso común para la adsorción del fago y -- para la transferencia del ADN (Achtman et al., 1971).

Los mutantes en *traG* presentan dos fenotipos muy -- distintos, unos con y otros sin pelo, pero todos incapaces de transferir el plásmido. De ahí se dedujo que *traG* puede ser bifuncional, interviniendo en el mecanismo de unión del ADN y la formación del pelo durante la transferencia (Willetts, 1974).

El producto génico del gen *traS* es el responsable -- de la exclusión superficial y no es requerido para la --

trasferencia (Willetts y Maule, 1974). El gen *traT* - esta, igualmente, relacionado con la exclusión superficial (Minkley y Ippen-Ihler, 1977; Achtman et al., 1977).

Todos los mutantes en el gen *traJ* son deficientes en la transferencia, no forman el pelo y no poseen la propiedad de exclusión superficial (Achtman et al., 1972). En efecto, el producto de *traJ* se requiere para la síntesis de los demás productos y *traJ* se puede considerar un gen regulador. Igualmente, presenta la misma función el producto génico de *traM* (Willetts y Maule, 1979).

Por análisis de complementación y de mutaciones polares *tra⁻* se ha determinado que los genes *traB*, *traF*, *traG*, *traC*, *traH*, *traK*, *traL*, *traM*, *traN*, *traS*, *traU*, *traV*, *traW* y *traY*, se encuentran en un mismo operón (operón de transferencia) (Achtman, et al., 1972; Willetts, 1974; Helmuth y Achtman, 1975). El gen *traJ*, como hemos indicado, es necesario para la expresión del operón de la transferencia y es independiente a dicho operón (Achtman, 1973; Willetts y McIntire, 1978).

Mediante los métodos anteriormente indicados, se ha establecido que el orden de los genes de transferencia en el plásmido es: *traM*, *traJ*, *traY*, *traA*, *traL*, *traE*, *traK*, *traB*, *traV*, *traW*, *traC*, *traU*, *traN*, *traF*, *traH*, *traG*, *traS*, *traT*, *traD* y *traI* (Ippen-Ihler et al., 1972; ----

Sharp et al., 1972; Willetts, 1972,1973,1974; Willets y McIntire, 1978).

El origen de replicación del operón de transferencia es distinto al origen de replicación vegetativa de los plásmidos autónomos (Willetts, 1972).

4.2. *Sistemas de transferencia*

Se han descrito cinco sistemas de transferencia diferentes, los llamados F, I, N, P y S (Willetts, 1977a). Las características bioquímicas de los distintos sistemas de transferencia son muy similares. Sin embargo, no puede darse transferencia genética cruzada entre ellos. Por estudios de hibridación (Guerry y Falkow, 1971; Ingram, 1973; Hedges, 1974) y de microscopía electrónica de heterodúplex (Falkow et al., 1974) se ha demostrado que, si bien existen grandes diferencias entre los plásmidos de cada sistema, presentan una serie de secuencias comunes para todos ellos. Además, el pelo sexual de cada uno de estos sistemas difiere en su estructura y en la infección específica de los bacteriofagos que se le adsorben.

4.2.1. Sistema F

Las células donadoras que llevan un plásmido conjugativo tipo F sintetizan un pelo de 90 Å de diámetro, - con una longitud variable de 1 a 2 µm y un hueco central de 25 Å de diámetro, con un peso molecular de 10.750 daltons (Lawn, 1966; Novotny et al., 1969; Paranchych et al., 1971; Helmuth y Achtman, 1978). A este pelo se adsorben fagos específicos, como fagos isométricos de ARN (Q β o MS2) (Crawford y Gestelan, 1964) y fagos filamentosos de ADN unicitenario (f1) (Cavalli et al., 1953).

4.2.2. Sistema I

Las células portadoras de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad I, sintetiza un pelo que no adsorbe fagos específicos de F, pero sí al fago If1 (fago filamentosos de ADN unicitenario específico de I).

Los pelos F y los pelos I son diferentes, tanto en cuanto a su estructura, como en sus propiedades inmunológicas (Lawn et al., 1967). Las células que llevan plásmidos F e I forman pelos de ambos tipos.

4.2.3. Sistema N

Las células portadoras de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad N, son sensibles a fagos - Ike (fago filamentoso de ADN, específico de N)(Khatoon et al., 1972). Sin embargo, examinando estas células - al microscopio electrónico, no puede demostrarse la presencia de pelo (Brodt et al., 1974). Por tanto, la estrutura superficial para la adsorción del fago Ike debe ser un pelo muy corto o la misma superficie bacteria na. Sea cual sea esa estructura, también está implicada en la trasferencia del plásmido, ya que se han descrita mutantes que presentan simultáneamente resistencia a la infección por fagos y deficiencia en la trasferencia.

4.2.4. Sistema P

Los factores R conjugativos pertenecientes al grupo de incompatibilidad P determinan un sistema de trasferencia que incluye un pelo (Bradley, 1974), y un sistema de exclusión superficial (Hedges y Jacob, 1974).

Las células portadoras de factores R conjugativos

del grupo P, son sensibles a cinco tipos distintos de fagos: el fago de ARN PRR1 (Olsen y Shiplex, 1973), el fago filamentoso de ADN Pf3 (Stanisich, 1974) y los fagos icosaédricos de ADN PRD1 (Olsen et al., 1974) PR3 y PR4 (Stanisich, 1974).

El fago PT1 se adsorbe a los pelos (que son de -- corta longitud) de células que llevan plásmidos del grupo de incompatibilidad P; Pf3, PR3 y PR4 se pueden adsorber además a otras estructuras superficiales determinadas por algunos otros plásmidos (Bradley, 1974). Sin embargo, la mayoría de los mutantes superficiales en la transferencia del plásmido RP1 del grupo de incompatibilidad P resultan ser resistentes simultáneamente a la infección por fagos PRR1, Pf3, PR3 y PR4 (Stanisich, -- 1974).

Un hecho interesante es que PRD1, PR3 y PR4 pueden infectar a células portadoras de plásmidos del grupo N (Bradley, 1974; Olsen et al., 1974), lo que indica alguna relación entre los sistemas de transferencia P y N. De hecho, Ingraham (1973) demostró la existencia de homología parcial entre los ADN de los plásmidos del grupo de incompatibilidad P y los del grupo N.

Aunque los factores R del grupo de incompatibilidad P se identificaron originalmente en *P. aeruginosa*, tam-

bién se han encontrado en otros géneros tales como *Proteus*, *Providencia* y *Rhizobium* (Datta et al., 1971; Datta y Hedges, 1972; Olsen y Shipley, 1973; Chandler y Krishnapillai, 1974).

5. TRASFERENCIA GENÉTICA EN *RHIZOBIUM*

La transferencia genética en *Rhizobium* puede ocurrir por conjugación natural mediada por plásmidos F (Heumann, 1968; Lorkiewicz et al., 1971; Kaushik y Venkataraman, 1972), por transformación (Balassa, 1960, 1963; Balassa y Gabor, 1961; Zelazna, 1963, 1964; Zelazna-Kowalska, 1971; Zelazna-Kowalska y Lorkiewicz, 1971; Raina y Modi, 1972; O'Gara y Dunican, 1973; Doctor y Modi, 1976; Maier et al., 1978; Al-Ani, 1979), por transducción (Kowalski, 1967, 1970, 1971; Sik y Orosz, 1971; Heumann et al., 1974; Buchanan-Walston, 1978; Svab et al., 1978; Casadesús y Olivares, 1979; Sik et al., 1980), o mediante plásmidos distintos a los de tipo F (Beringer, 1974a; Johnston y Beringer, 1977; Kondorosi et al., 1977; Meade y Signer, 1977; Phuler y Burkanrdt, 1978; Casadesús y Olivares, 1979).

Los fenómenos de la transformación y la transducción, por implicar la transferencia de fragmentos cortos del

genoma, no son de mucha ayuda para la fabricación de un mapa genético de gran alcance.

En *Rhizobium*, la conjugación natural ha sido utilizada por un autor, concretamente por Heumann (1968), - utilizando cepas de *R. lupini* cuya identidad y propiedades simbióticas no han podido ser confirmadas. Heumann describió un sistema natural de conjugación en *R. lupini*, en el que varias células se agregan formando una estrella. Obtuvo, además, mutantes para marcadores nutritivos y de pigmentación, mediante tratamiento con ácido nitroso. Por desgracia, las estirpes empleadas no son capaces de formar nódulos, por lo que este sistema no es útil para el estudio genético de la simbiosis.

Heumann et al. (1971), Heumann (1972), Heumann et al. (1973) y Schoffl et al. (1974), estudiaron profundamente este sistema de conjugación, descubriendo la existencia de dos factores de fertilidad, f_c y f_d , que activan la transferencia de dos regiones diferentes del cromosoma. Estos factores de fertilidad son cromosómicos y durante la transferencia preceden al resto de los marcadores cromosómicos transferidos. Las células de *R. lupini* son isosexuales y, en los apareamientos, el carácter de donador o receptor está determinado por su estado fisiológico; las células en fase estacionaria actúan como receptoras y las que están en fase exponencial co-

mo donadoras.

Utilizando marcadores de pigmentación, Heumann y Springer (1977) encontraron que cuando se utilizan parentales de diferente pigmentación en un cruce, aparecen trasconjugantes diploides que se puede diferenciar de los haploides por su pigmentación de tipo aditivo. Se analizó la segregación de estos clones diploides y los resultados obtenidos están de acuerdo con la teoría de que el ADN cromosómico transferido se puede integrar en diferentes lugares del cromosoma del receptor formando secuencias tandem con sus regiones homólogas. Consecuentemente, los segregantes haploides de estos merodiploides se forman por recombinación endocromosómica. Así pues, el comportamiento de *R. lupini* no parece diferir en este aspecto del de *E. coli* (Johnson et al., 1975; Heumann, 1979).

Los experimentos anteriormente descritos no han podido ser repetidos en ninguna otra cepa de *R. lupini* ni en ninguna otra especie de *Rhizobium*. Como consecuencia, el sistema de conjugación natural de *Rhizobium* no parece ser instrumento válido para llevar a cabo transferencias cromosómicas. La tendencia actual en este campo es la de utilizar determinantes extracromosómicos procedentes de distintas especies bacterianas.

Ya los primeros trabajos realizados sobre la transferencia de plásmidos desde *E. coli* a *Rhizobium* permitieron establecer un buen sistema de conjugación en este último género (Puhler et al., 1972; Beringer, 1974; Kowalczyk y Lorkiewicz, 1977; Kuikendall, 1977; Haque, 1979).

Desde entonces se han publicado numerosos trabajos en los que se describe la transferencia desde algunos géneros bacterianos a *Rhizobium* de plásmidos tales como: Factores F (F-lac (Datta y Hedges, 1972), R1drd19 (Kowalczyk, 1977), F-his, F-met y F-ile (Mergeay et al., 1973)) y factores R especialmente del grupo de incompatibilidad P (factor RP4 (Datta et al., 1971; Datta y Hedges, 1972; O'Gara y Dunican, 1973; Puhler et al., 1973; Beringer, 1976; Jacob et al., 1976; Meade y Signer, 1977; Johnston et al., 1978; Nagahari et al., 1979; Kowalczyk y Lorkiewicz, 1979), factor RP1 (Datta et al., 1971), factor R68.44 (Beringer, 1976), factor R68.45 (Beringer, 1976; Kondorosi et al., 1977; Kuikendall, 1977; Johnston et al., 1978; Casadesús y Olivares, 1979; Kowalczyk y Lorkiewicz, 1979), factor R1 y factor R192 (Datta y Hedges, 1972), factor Rk2, factor R68.86, factor R702, factor R751, factor R57b y factor R144drd3 (Beringer, 1974) y factor R1033 Beringer et al., 1978).

5.1. *Trasferencia mediada por factores F'*

Datta y Hedges (1972), Mergeay et al. (1973), Beringer (1974) y Dixon (1974) demostraron la transferencia por conjugación del factor F' de *E. coli* a *Rhizobium* ya que como resultado de la transferencia genética desde *E. coli*, pueden corregirse defectos metabólicos en *Rhizobium*.

5.2. *Trasferencia mediada por factores R*

5.2.1. *Trasferencia de factores R del grupo de incompatibilidad distintos de P*

Los plásmidos R conjugativos que no pertenecen al grupo P no pueden transferirse por sí mismo desde otras especies bacterianas a *Rhizobium*. Para movilizarse necesitan que la célula donadora tenga también un plásmido de tipo F. De esta forma, Datta y Hedges (1972) lograron transferir los factores R1 y R192 desde *E. coli* a *R. lupini*. Igualmente, Dunican y Tierney (1973), transfirieron el factor R1drd19 desde *E. coli* a *P. aeruginosa* y desde esta última a *R. trifolii*. Por otro lado, los mismos autores en 1974, han demostrado la transferencia de -

este mismo plásmido entre distintas especies de *Rhizobium* y entre *R. trifolii* y *K. aerogenes*.

En trabajos posteriores, Kowalczyk y Lorkiewicz - (1977), demostraron la transferencia directa del plásmido R1drd19 desde *E. coli* a *R. trifolii*. Los exconjugantes de *R. trifolii* que llevan el plásmido se han utilizado para transferir el factor R por conjugación a otras estirpes de la misma especie, en la que se mantiene establemente.

Beringer (1974), realizando estudio con los factores R1drd19, R192drdF7 y R144drd3, sugirió que no son transmisibles desde *E. coli* a *R. leguminosarum*. Es posible, sin embargo, que la transferencia tenga lugar pero que sus genes no se expresen en *R. leguminosarum*.

5.2.2. Transferencia de factores R del grupo de incompatibilidad P

Hasta el momento, los plásmidos exógenos que han proporcionado mejores resultados para el análisis genético en *Rhizobium* son los factores R del grupo de incompatibilidad P1 de *P. aeruginosa* (Datta y Hedges, 1972). Estos plásmidos, que en sus huéspedes originales son capaces de promover transferencia cromosómica (Stanisich y

Holloway, 1971), pueden ser transferidos a un amplio espectro de bacterias gram-negativas (Datta y Hedges, -- 1972; Olsen y Shipley, 1973) y, en general, en su nuevo huésped siguen siendo capaz de actuar como plásmidos -- conjugativos, lo que les convierte en herramientas útiles para el análisis genético de aquellos microorganismos que no parecen poseer factores sexuales propios, tales como *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton et al., 1976; Hamada et al., 1979), *Acinetobacter calcoaceticus* (Towner y Vivian, 1976), *P. glicinea* (Lacey y Leary, 1976), *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Sistrom, 1977), etc.

Se ha estudiado ampliamente la transferencia de factores R del grupo de incompatibilidad P1 de otros géneros bacterianos a *Rhizobium* y entre distintas estirpes de *Rhizobium*.

Datta y Hedges (1971) fueron los primeros en realizar experiencia de transferencia de factores R del grupo de incompatibilidad P1 a *R. meliloti* y *R. lupini*. Asimismo, Datta y Hedges (1972), transmitieron el factor -- RP4 desde *E. coli* a *R. leguminosarum* y entre estirpes de esta última especie.

En general, el nivel de resistencia al antibiótico transferida por los factores R en diferentes estirpes de *R. leguminosarum* es similar a la que presenta el dona--

dor (*E. coli*). En los trabajos descritos hasta ahora en este apartado no se encontró transferencia de marcadores cromosómicos.

Beringer y Hopwood (1976), trabajando con *R. leguminosarum* al que le introdujeron los factores RP4, R68.44 ó R68.45, fueron los primeros que demostraron recombinación entre marcadores cromosómicos subsiguiente a la transferencia por conjugación. En trabajos similares, pero posteriores, se logró la movilización cromosómica intraespecífica en las siguientes especies y con los siguientes factores: en *R. meliloti*, mediante el factor RP4 (Meade y Signer, 1977); en *R. meliloti*, mediante el factor R68.45 (Kondorosi et al., 1977; Casadesús y Olivares, 1979) y en *R. leguminosarum*, mediante el factor R68.45 (Beringer et al., 1978). Johnston y Beringer (1977) demostraron la transferencia interespecífica utilizando estirpes de *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* y *R. trifolii*. Johnston et al. (1978), trabajando con estirpes de *R. leguminosarum* y *R. meliloti*, obtuvieron cuatro clases de factores R68.45-primas, cada uno de los cuales lleva varios marcadores prototróficos diferentes.

Johnston et al. (1978) consiguieron por primera vez que genes procedentes de otros géneros bacterianos se expresaran en *Rhizobium*. Estos autores fueron capaces de transferir los genes que sintetizan el triptofano des

de *P. aeruginosa* hasta *R. leguminosarum*. La transferencia y expresión de estos mismos genes de *E. coli* a *R. leguminosarum* también es posible según demostraron Nāhagari et al. (1979).

5.2.2.1 El factor RP4

Como hemos expuesto anteriormente, los plásmidos R del grupo de incompatibilidad P1 son los vehículos más idóneos para la transferencia intergenérica así como para movilizar genes cromosómicos. Entre ellos uno de los más empleados es el factor RP4, también designado como R1822, R18 y RP1 (Holloway y Richmond, 1973).

Se aisló de una estirpe de *P. aeruginosa*, por Lowbury et al. (1969) y confiere resistencia a los antibióticos carbenicilina, tetraciclina, neomicina y kanamicina. Es autotransmisible y puede ser transferido por conjugación a *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. fluorescens*, *S. typhimurium*, *Rhizobium spp*, entre otros (Datta et al., 1971; Datta y Hedges, 1972; Olsen y Shipley, 1973; Beringer, 1974; Haque, 1979).

Este factor se comporta como un factor sexual en cuanto a su transferencia y es capaz de movilizar genes cromosómicos, según descubrieron Meade y Signer (1977) -

trabajando con una estirpe de *R. meliloti*. RP4 posee un trasposón que codifica la resistencia a la ampicilina, designado Tn1 (Ingram, 1973; Hedges y Jacob, 1974).

Un aspecto interesante del factor RP4 es que en *R. lupini*, que posee un sistema de conjugación natural -- efectivo, su presencia inhibe la fertilidad, es decir, la transferencia de material cromosómico mediada por los factores Fd y Fc propios de esta especie (Puhler y Burkardt, 1978).

5.2.2.2. El factor R68.45

Este plásmido, también muy utilizado, es un derivado del factor R68, aislado por Haas y Holloway (1976), pero que moviliza el cromosoma de *P. aeruginosa* con mayor eficiencia que su parental. Esto, se puede deber a la existencia de un fragmento de ADN adicional (de 2120 pares de bases) respecto al plásmido R68. Este fragmento está situado junto a los genes que confieren resistencia a la kanamicina y consiste en una región de ADN del plásmido R68 duplicada, haciendo a estos plásmidos portadores de la función Cma (Holloway, 1979; Holloway et al., 1979b; Burkardt et al., 1979a; Rieb et al., 1980).

Este plásmido posee una densidad de 1,719 g/cc, al

igual que su parental R68; y un tamaño de $19,7 \mu\text{m} \pm 0,4$ siendo superior en $0,6 \mu\text{m}$ al tamaño de su parental (Rieb et al., 1980).

La transferencia de marcadores cromosómicos mediada por R68.45 no es polarizada, aunque se desconoce aún los por-menores de este proceso.

Este plásmido presenta las siguientes ventajas prácticas:

1) Los orígenes de transferencia se encuentran espaciados en el cromosoma bacteriano. Esta propiedad permitió a Watson (1977) construir el mapa genético de la estirpe PAT de *P. aeruginosa* y circularizarlo.

2) Este plásmido tiene, al igual que su parental, un gran número de huéspedes (Summers y Jacoby, 1977). Además, es capaz de movilizar genes cromosómicos en una gran variedad de bacterias gram-negativas, entre las que se incluyen *P. putida*, *E. coli* y varias especies de *Rhizobium*.

3) Es posible aislar derivados de R68.45 que lleven segmentos de ADN cromosómico (Hedges et al., 1977), y estos factores R' pueden ser empleados para estudios genéticos y para obtener diploides parciales (Holloway, 1978; Kiss et al., 1980).

6. CONSTRUCCION DE MAPAS GENETICOS EN EL GENERO *RHIZOBIUM*.

Los plásmidos RP4 y R68.45 se han empleado en *Rhizobium* para la construcción de mapas de ligamiento. Así, Beringer et al. (1978) realizaron el mapa genético de *R. leguminosarum*, que incluye 16 marcadores cromosómicos; Kondorosi et al. (1977), Meade y Signer (1977) y Casadesús y Olivares (1979), construyeron el de *R. meliloti*, con un total de unos 60 marcadores.

La utilización de factores R del grupo de incompatibilidad P1 para la construcción de mapas de ligamiento trae consigo muchas desventajas respecto de la utilización de sistemas Hfr. Estas desventajas se pueden resumir en:

- 1) Es un proceso más complejo puesto que precisa que se de integración en el cromosoma bacteriano y desintegración posterior llevando unido trozos del material -- cromosómico.
- 2) Al ser un sistema de transferencia parecido al F', la frecuencia de trasmisión del plásmido completo es -- más alta que en los Hfr, pero la de material cromosómico de la célula donadora es mucho más baja.
- 3) La longitud de los segmentos cromosómicos esta li-

mitada (Meade y Signer, 1977). La máxima longitud descrita corresponde a un tercio del cromosoma de *R. meliloti* (Kondorosi et al., 1977).

4) La integración de los fragmentos cromosómicos transportados por los plásmidos presentan algunos problemas. Estos fragmentos una vez dentro de la célula receptora pueden:

a) Recombinar con las secuencia homólogas a estos fragmentos que existan en la célula receptora, es decir, integrarse en el mismo lugar que ocupaban en el cromosoma donador, lo cual traería consigo la segregación independiente de los marcadores cromosómicos.

b) Integrarse completo junto con el plásmido portador con bajas frecuencias de entrecruzamientos y ausencia de segregación de los marcadores centrales.

5) Debido al hecho expuesto inmediatamente antes los porcentajes de ligamiento obtenidos en los siguientes cruces es a veces muy variable. Esto obliga a aumentar el número de las muestras estadísticas y sugiere, además, la conveniencia de disponer de sistemas de corrección de datos.

A pesar de las limitaciones que presenta este sistema de transferencia, es el más indicado para la constru

cción de mapas de ligamiento, puesto que:

a) La conjugación natural solo ha sido descrita una vez, por Heumann (1968) y, como se ha comentado anteriormente, con resultados más que dudosos.

b) La transformación es útil para la localización genética de un gen pero no para la construcción de un mapa. Como consecuencia, hasta ahora no ha sido utilizada.

c) La transducción es un método útil que actualmente se está empleando en la construcción de mapas o de ordenación de genes dentro de una región determinada. En *Rhizobium*, con estos fines, la han empleado Casadesús y Olivares (1979, 1980) y Sik et al. (1980) en *R. meliloti* y Buchanan-Wollaston (1979) en *R. leguminosarum*. Aunque actualmente está teniendo mucho auge el estudio de los fagos de *Rhizobium* como lo demuestran los trabajos aparecidos recientemente (Dallman et al., 1979, 1980; Orosz et al. 1980).

d) Actualmente se trata de utilizar la técnica de mutación secuencial con nitrosoguanidina. Existe muy poca bibliografía al respecto (Jessberger et al., 1974; Al-Ani, 1976; Al-Bayatti y Al-Ani, 1977; Zurkowski y Lorkiewicz, 1978), y de sus resultados se deduce que este método es menos eficaz que los expuestos anteriormente.

Aunque los genes *nod* y *nif* parecen encontrarse en plásmidos (Nutí et al., 1977; Prakash et al., 1979), es posible que en el cromosoma existan también genes que participen en el control de las características simbióticas.

RESULTADOS

1. CONDICIONES OPTIMAS PARA EL AISLAMIENTO DE MUTANTES EN *RHIZOBIUM TRIFOLII*

1.1. Generalidades

Son muchos los trabajos en los que se describe el aislamiento, mediante tratamiento mutagénico, de mutantes de *Rhizobium*. Sin embargo, los agentes y las condiciones empleadas varían grandemente de un autor a otro debido, quizás, a la falta de un estudio sistemático - de cuáles son las condiciones óptimas para la mutagénesis.

La primera parte de esta Tesis está destinada a hacer un análisis comparativo de todos los agentes (nitrosoguanidina, ácido nitroso, metanosulfonato de etilo y luz ultravioleta) y los métodos empleados hasta ahora - en *Rhizobium*. Se pretende con ello establecer cuáles son las condiciones óptimas y más prácticas para la obtención de mutantes de *R. trifolii*. Estas condiciones serán las aplicadas, ya en la segunda parte de esta Tesis, para el aislamiento de mutantes auxótrofos.

Se ha estudiado, pues, la influencia de distintos factores en la letalidad, medida como proporción de células capaces de crecer en medio nutritivo después del tratamiento, y en la mutagenicidad, medida por la aparición de colonias auxótrofas y/o colonias resistentes al cloramfenicol.

La estirpe de *R. trifolii* utilizadas por estos estudios es la RS176. Esta estirpe fue aislada a partir de la RS55 como mutante espontáneo resistente a la estreptomomicina. Su tiempo de generación en medios líquidos es de 3 horas en YT y VS y de 7 horas en MM.

1.2. Ensayos mutagénicos

1.2.1. Ensayos con nitrosoguanidina

La nitrosoguanidina es un mutágeno muy potente utilizado ampliamente para la obtención de mutantes en sistemas tanto pro- como eucarióticos. Los efectos de la nitrosoguanidina dependen de factores internos de la célula, como son capacidad de reparar daños producidos en su ADN o estado fisiológico del cultivo en el momento del tratamiento (Neale, 1976). También dependen de factores externos a la célula como son concentración del mutágeno y tiempo de exposición, pH y tipo de tampón empleado y temperatura a la que se realiza el tratamiento.

Se ha estudiado concretamente la influencia en la letalidad y mutagenicidad producida por nitrosoguanidina de: pH, medios donde se realiza el tratamiento, concentraciones del mutágeno y tiempo de exposición.

La Figura 1 muestra la supervivencia de *B. trifolii* RS176 a tratamientos con nitrosoguanidina en tampón a distintos pH. Como se observa, las dos curvas son radicalmente distintas, lo que está de acuerdo con lo encontrado en otros organismos (Cerdeña-Olmedo y Hanawalt, 1967). Estos resultados apoyan la teoría de que existen varios mecanismos diferentes para la letalidad que se ponen de manifiesto más o menos según el pH al que se realice el tratamiento. Así, la inflexión que presenta la curva de letalidad a pH 5,5 podría indicar, bien la presencia en cada célula de varios objetivos que han de ser inactivados para que esta muera, o bien que la acción letal debe vencer la resistencia opuesta por el mecanismo de reparación. La curva a pH 7,4, refleja un comportamiento heterogéneo de la población respecto a la letalidad con nitrosoguanidina, existiendo una fase rápida de muerte que afectaría a las células más sensibles (un 80% de la población) y una fase lenta de muerte correspondiente a las menos sensibles, que deben constituir un 20% de la población.

La Tabla III muestra los resultados de algunos tra

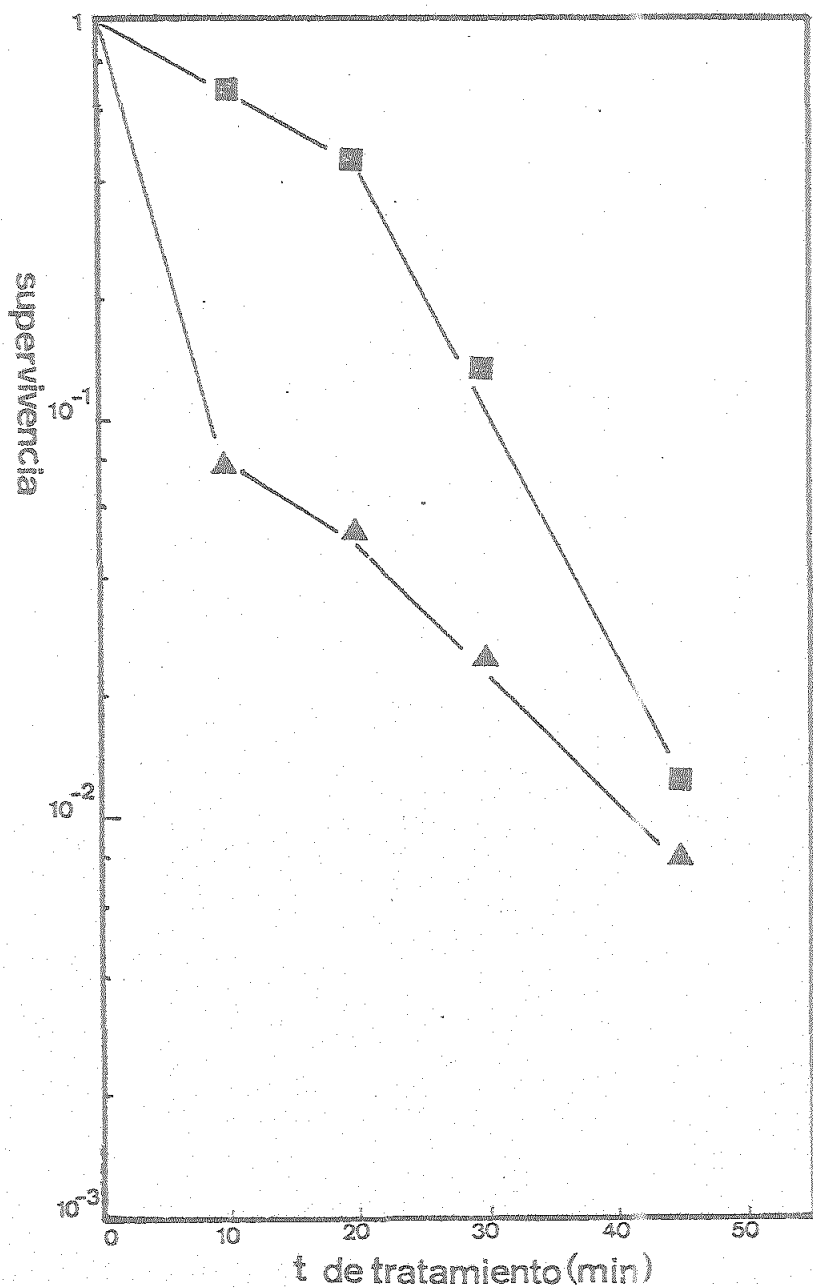


FIGURA 1. Supervivencia de *R. trifolii* RS176 al tratamiento con nitrosoguanidina (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en tampón tris-maleato (■) pH 5,5; (▲) pH 7,4.

TABLA III. Supervivencia y frecuencia de mutantes auxótrofos tras distintos tratamientos con nitrosoguanidina.

Medio de tratamiento	pH	Concentración nitrosoguani- dina ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de exposición (min)	super- vivencia	colonias probadas	n°mutantes auxótrofos	Proporción auxótrofos
Tampón tris-maleato	5,5	500	30	0,13	3569	1	$2,8 \times 10^{-4}$
Tampón tris-maleato	5,5	500	45	0,01	1141	2	$1,7 \times 10^{-3}$
Tampón tris-maleato	7,4	500	30	0,04	3055	8	$2,6 \times 10^{-3}$
Medio VS	7,2	500	30	0,09	4454	24	$5,3 \times 10^{-3}$
Medio VS	7,2	200	30	0,22	1001	0	
Medio MM	7,0	500	45	0,06	1562	1	$6,0 \times 10^{-5}$

mientos realizados en células suspendidas en tampón -- tris-maleato a pH 5,5 ó pH 7,4 y en medio de cultivo -- VS y MM.

La Figura 2 muestra la letalidad y la aparición de colonias resistentes al cloramfenicol tras tratamiento con distintas concentraciones con nitrosoguanidina. La aparición de resistentes al cloramfenicol se midió -- en placas con el antibiótico inmediatamente después del tratamiento y tras recrecimiento en medio líquido.

Como consecuencia de los resultados expuestos, se establecieron como condiciones adecuadas para la obtención de mutantes auxótrofos con nitrosoguanidina las siguientes: Tratar las células suspendidas en medio VS, a pH 7,2, con 500 μ g/ml. de nitrosoguanidina durante 30 -- minutos.

1.2.2. Ensayos con ácido nitroso

También el ácido nitroso ha sido utilizado por algunos autores como inductor de mutantes en *Rhizobium*, -- concretamente en *R. lupini* (Heumann, 1968). Experimentalmente, se encontró que en *R. trifolii*, un tratamiento similar al descrito para *R. lupini* (tampón acetato -- de pH 4,5 y 0,5M de nitrito sódico) es capaz de bajar -- la supervivencia a menos de 1×10^{-7} en solo tres minu-

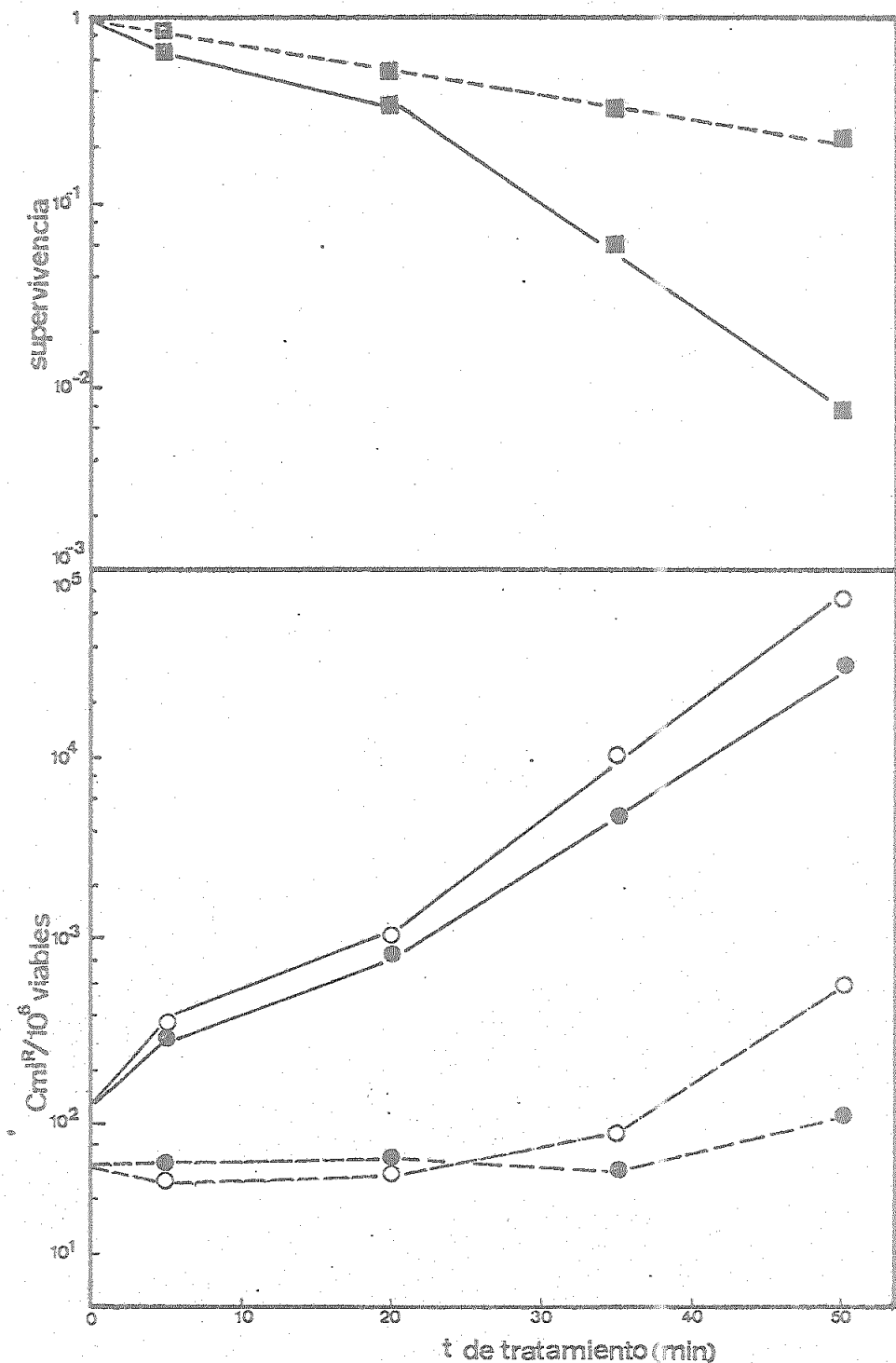


FIGURA 2. Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina en tampón tris-maleato (pH 5,5).

- (---) Tratamiento con 100 ug de nitrosoguanidina/ml.
- (—) tratamiento con 500 ug de nitrosoguanidina/ml.
- (O) Frecuencia de mutantes seleccionados inmediatamente después del tratamiento; (●) frecuencia de mutantes seleccionados tras una incubación de 12 horas en medio YT.

tos. La Figura 3 muestra la supervivencia al ácido nítrico en un experimento en el que la dosis fué diez veces menor (0,05M). En ningún caso aparecieron colonias resistentes al cloramfenicol.

También está descrito que las mayores frecuencias de mutantes se obtienen cuando la supervivencia es de alrededor de 1×10^{-4} . Así pues, tratamos células de *R. trifolii* en las condiciones anteriormente descritas y durante cinco minutos, lo que llevaría a dicha supervivencia. Como se refleja en la Tabla IV se probaron 1412 colonias supervivientes al tratamiento mutagénico y a contraselección posterior con penicilina. De ellas ninguna resultó ser auxótrofa.

Dada la poca eficacia de este agente en *R. trifolii*, no se utilizó en el resto del trabajo.

1.2.3. Ensayos con metanosulfonato de etilo

El metanosulfonato de etilo es un agente mutagénico de uso extendido. Sin embargo, solo Kaushik y Venkataraman (1972) lo han utilizado en *R. trifolii*. No obstante y debido a las grandes ventajas teóricas y prácticas de su manejo, se ha estimado conveniente su estudio.

Aunque se han probado varias concentraciones del

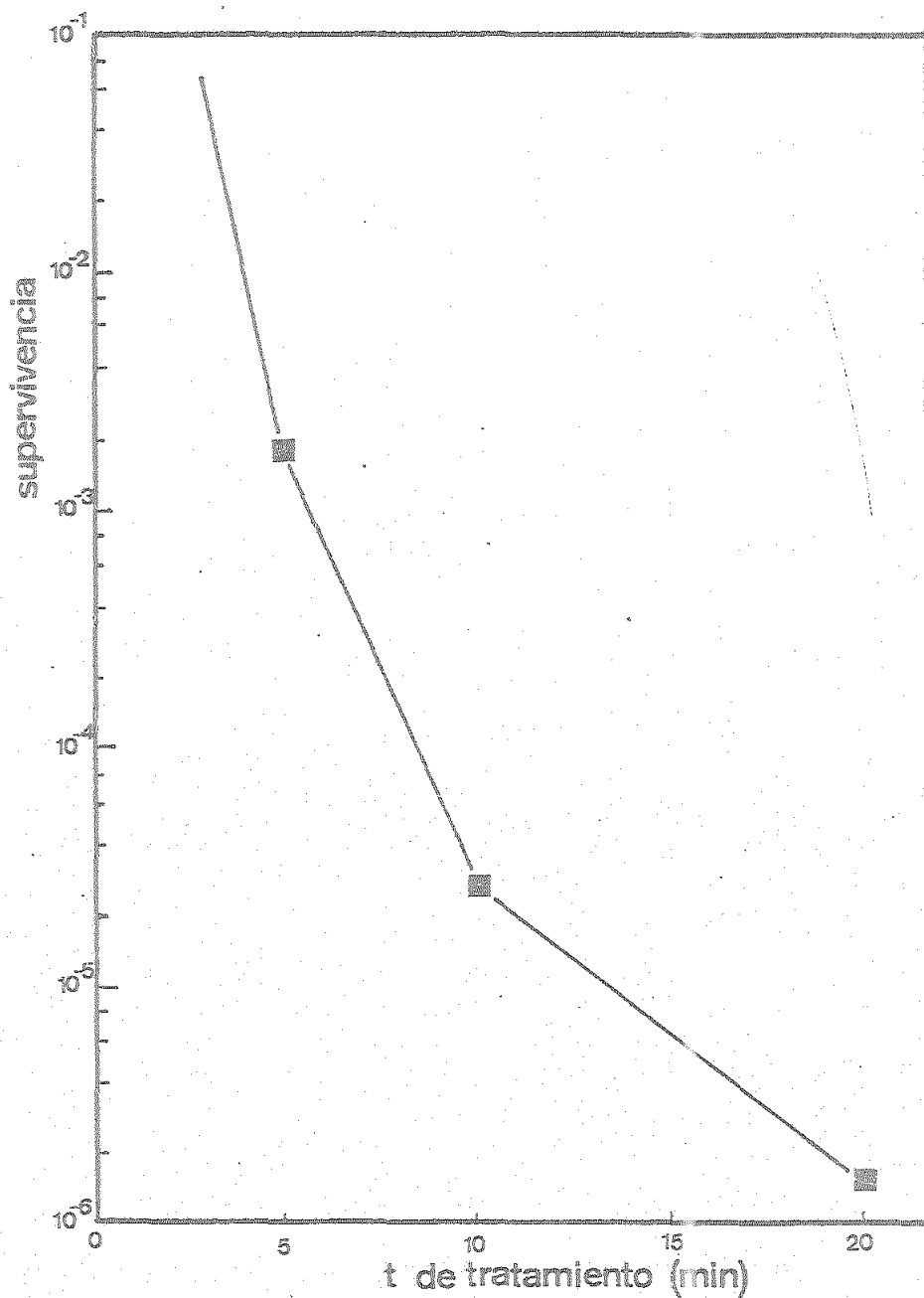


FIGURA 3. Supervivencia de *R. trifolii* RS176 al tratamiento con ácido nitroso (0,05M) en tampón acetato pH 4,5.

agente, se ha elegido como concentración óptima de tratamiento la de 0,1M, ya que concentraciones mayores se encuentran en el límite de solubilidad pudiendo ser causa de error en los experimentos.

En la figura 4 se muestra la evolución, según el tiempo de tratamiento, de la letalidad y mutagenicidad, expresada como aparición de mutantes resistentes al cloramfenicol.

Los resultados de aparición de mutantes tras incubación son concordantes con los obtenidos con nitrosogua nidina. Como conclusión práctica de este experimento - se dedujo que se debía utilizar 40 minutos de tratamien to.

En la Tabla IV se encuentra la frecuencia de auxótrofos tras tratamiento con metanosulfonato de etilo en tampón fosfato pH 8,0, durante 40 minutos. Según se puede concluir, este tipo de tratamiento es bastante efectivo, por lo que se utilizó ampliamente en la segunda parte de esta Tesis.

1.2.4. Ensayos con luz ultravioleta

La luz ultravioleta ha sido ampliamente empleada - en *Rhizobium* pero siempre con el fin de obtener mutantes en las características simbióticas. Con esta serie

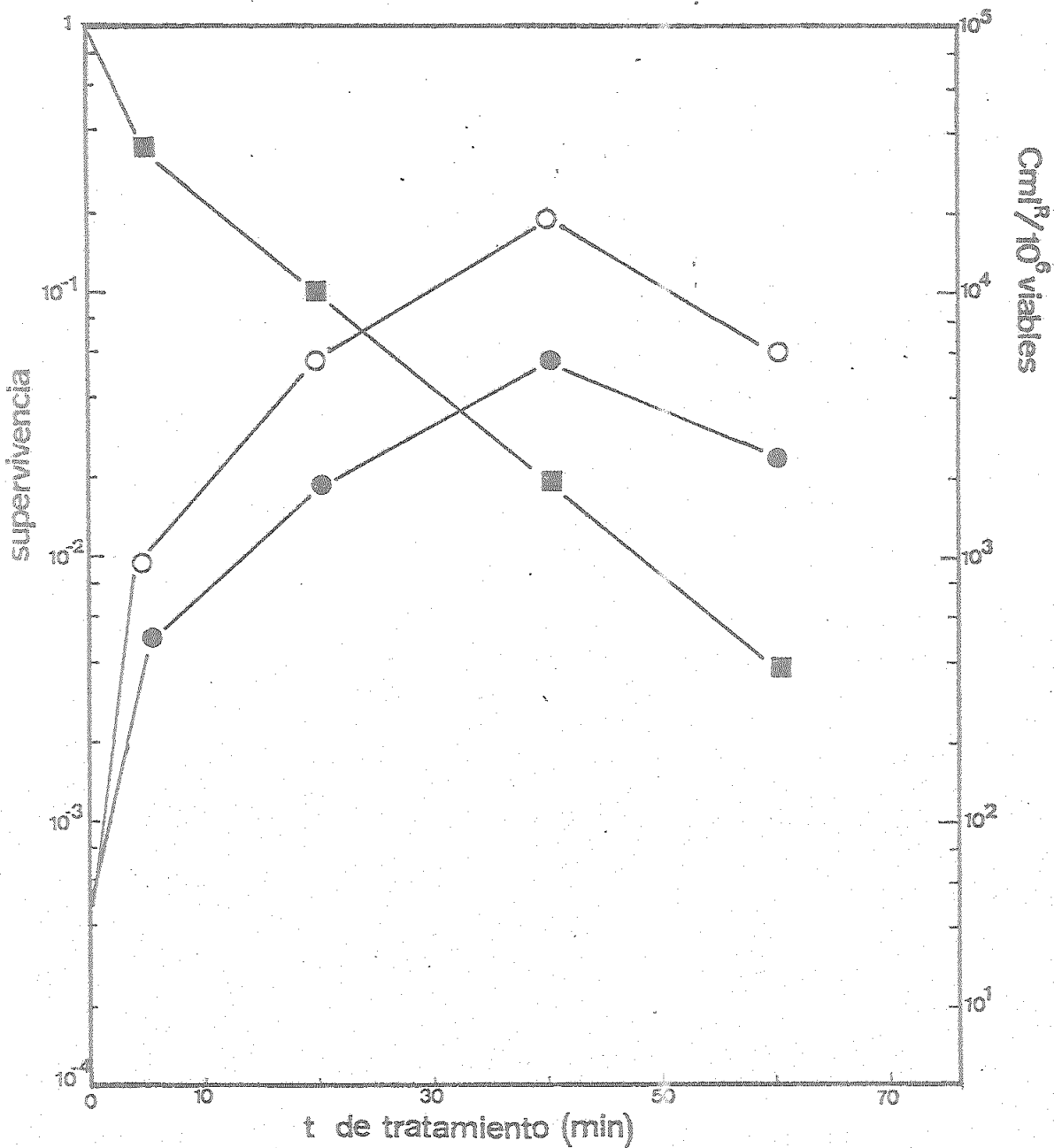


FIGURA 4. Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad y la mutagenicidad producida por metano sulfonato de etilo (0,1M), en tampón fosfato pH 8,9. (■) supervivencia; (○) frecuencia de mutantes seleccionados inmediatamente después del tratamiento; (●) frecuencia de mutantes seleccionados tras una incubación de 12 horas en medio YT después del tratamiento.

de experimentos se ha tratado de ver la eficacia de este agente en la inducción de mutantes resistentes al cloramfenicol y de auxótrofos en *R. trifolii*.

La Figura 5 muestra la variación de la letalidad y la mutagenicidad, medida como aparición de colonias resistentes al cloramfenicol, con el tiempo de exposición a la luz ultravioleta.

Para experimentos posteriores se eligió 15 minutos como tiempo de tratamiento ya que con el, se consigue un aumento considerable (unas 70 veces) en la frecuencia de mutantes resistentes al cloramfenicol, sin que la letalidad sea muy elevada. Con estas condiciones se aislaron mutantes auxótrofos, según se refleja en la Tabla IV. Aunque la frecuencia de aparición de mutantes es relativamente alta, en trabajos subsiguientes no se usó la luz ultravioleta por ser su manejo más complicado -- que el de los agentes químicos.

1.3. Resumen

En la Tabla IV se resumen y comparan los resultados de letalidad y mutagenicidad, expresadas como aparición de auxótrofos, producidos por los distintos agentes estudiados. En adelante, y como consecuencia evidente de los estudios presentados, se utilizaron solo dos tipos -

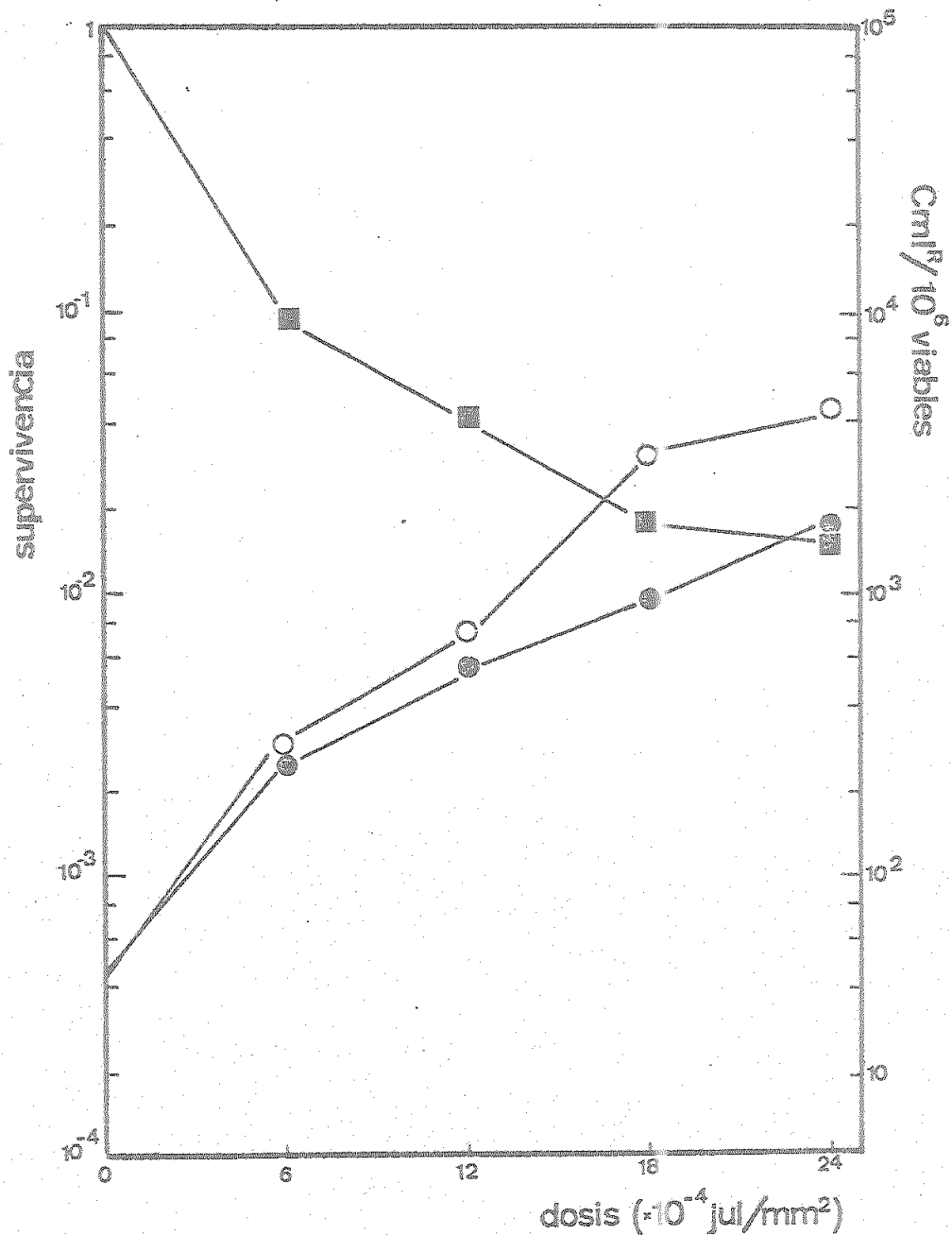


FIGURA 5. Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad y la mutagenicidad producida por luz ultravioleta (1200 erg/mm²/min.), en tampón M9. (■) supervivencia; (○) frecuencia de mutantes seleccionados inmediatamente después del tratamiento; (●) frecuencia de mutantes tras una incubación de 12 horas en medio YT al final del tratamiento.

TABLA IV. Comparación de la letalidad y la mutagenicidad de distintos agentes mutagénicos en R. trifolii .

=====

Agentes mutagénicos	Medio de tratamiento	pH	Tiempo (min)	Super-vivencia	Colonias probadas	auxótrofos	Proporción
NG(500ug)	Tris-maleato	5,5	30	1,25	2967	2	$7,0 \times 10^{-4}$
NG(500ug)	Tris-maleat-	7,4	30	0,39	3055	8	$2,6 \times 10^{-3}$
NG(500ug)	Medio VS	7,2	30	0,58	3397	25	$7,3 \times 10^{-3}$
EMS(0,1M)	T. fosfato	8,0	40	0,33	714	7	$9,7 \times 10^{-3}$
NO ₂ H(0,05M)	T. acetato	4,6	5	0,001	1412	0	$< 10^{-5}$ *
UV(1200/erg /mm /min)	Medio MM	7,0	15	0,12	817	3	$3,5 \times 10^{-3}$ *

* = Contraselección con penicilina posterior al tratamiento.

de tratamientos:

- Con nitrosoguanidina: Tratar suspensiones que contengan alrededor de 2×10^8 células/ml en medio VS, pH 7,2, con 500 μg de nitrosoguanidina/ml durante 30 minutos a 28°C y sin agitación.

- Con metanosulfonato de etilo: Tratar suspensiones que contengan alrededor de 2×10^8 células/ml en tampón fosfato, 0,2M, pH 8,0, con metanosulfonato de etilo -- (0,1M) durante 40 minutos a 28°C sin agitación.

2. CONSTRUCCION DEL MAPA DE *RHIZOBIUM TRIFOLII* RS176

El objeto de esta parte del trabajo es aplicar la conjugación a la construcción del mapa genético de *R. trifolii*, dado los buenos resultados obtenidos por este método en *R. meliloti* y *R. leguminosarum*. Para ello, en primer lugar, se transfirieron diversos factores R de *E. coli* y *P. fluorescens* a *R. trifolii*. De entre ellos se eligió el más eficaz en la movilización de genes cromosómicos. Este factor se transfirió a distintas estirpes de *R. trifolii* y mediante conjugación entre ellas se estableció el mapa genético que se expone como conclusión principal de esta Tesis.

2.1. Transferencia de factores R por conjugación de *E. coli* y *P. fluorescens* a *R. trifolii*

La Tabla V muestra los resultados de una serie de experimentos de transmisión de plásmidos desde *E. coli* y *P. fluorescens* a *R. trifolii*. Estos experimentos se llevaron a cabo según se describe en Métodos, apartado 10. La frecuencia de transmisión del plásmido se calculó sembrando la mezcla conjugante en placas que contenían dos (kanamicina y tetraciclina) de los tres antibióticos a los que confería resistencia, ninguno de los requerimientos de la estirpe donadora y todos los de la estirpe re-

ceptora. La capacidad de movilización del cromosoma bacteriano se midió como frecuencia de aparición de colonias His⁺ entre los trasconjugantes.

TABLA V. *Trasferencia de los plásmidos RP1, RP4, R68.45 y R1drd19 a R. trifolii RS164 y movilización del alelo his-14 por dichos plásmidos.*

Donador	Receptor	X células donadoras	Frecuencia de transmisión del plásmido	Frecuencia de transferencia de his-14
PS10(RP1)	RS164	$1,00 \times 10^{10}$	$4,50 \times 10^{-3}$	$6,09 \times 10^{-7}$
ES3(RP4)	RS164	$5,65 \times 10^9$	$1,38 \times 10^{-1}$	$5,42 \times 10^{-5}$
ES5(R1drd19)	RS164	$8,26 \times 10^9$	$3,60 \times 10^{-4}$	$< 10^{-7}$
ES8(R68.45)	RS164	$3,77 \times 10^9$	$8,80 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10^{-6}$

Según se observa, la frecuencia de transmisión de RP4 y su eficiencia en la movilización de genes cromosómicos son significativamente más altas que las de los demás. Este resultado podría atribuirse al hecho de que el factor RP4 se inserta en lugares muy próximos a genes de la ruta biosintética de la histidina (Cannon *et al.*, 1974a; Dixon *et al.*, 1976). Para comprobar esto se rea

lizaron una serie de experimentos similares a los descritos pero utilizando una estirpe *Leu-23* como receptora. Se desechó de entrada la estirpe ES5(R1drd19) por presentar una frecuencia de movilización cromosómica excesivamente baja. Los resultados se presentan en la Tabla VI.

TABLA VI. Trasmisión de los plásmidos RP1, RP4 y R68.45 a *R. trifolii* RS271 y movilización del alelo *leu-23* por dichos plásmidos.

Donador	Receptor	X células donadoras	Frecuencia trasmisión del plásmido	Frecuencia de trasferencia de <i>leu-23</i>
PS1)(RP1)	RS271	$2,82 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{-3}$	$2,67 \times 10^{-7}$
ES3(RP4)	RS271	$2,24 \times 10^9$	$2,40 \times 10^{-2}$	$1,56 \times 10^{-7}$
ES8(R68.45)	RS271	$3,18 \times 10^9$	$5,21 \times 10^{-3}$	$3,35 \times 10^{-6}$

De los resultados expuestos se deduce que el mejor sistema de movilización de genes cromosómicos entre *E. coli* y *R. trifolii* es el mediado por el plásmido R68.45 que, aunque presenta niveles de trasmisión menores que el factor RP4, moviliza genes cromosómicos con mayor eficacia. De R68.45 se sabe, además, que es capaz de

de integrarse en muchos lugares del cromosoma. Por con siguiente, para posteriores trabajos se empleó el factor R68.45, que resultó ser muy estable en *R. trifolii*, se gún se comprobó tras sucesivas siembras en medio mínimo que contenía los antibióticos, la resistencia a los cuales es transferida por él.

2.2. *Trasferencia intraespecífica del factor R68.45 y análisis de la movilización de un solo gen cromosómico en R. trifolii*

El objeto de esta serie de experimentos es probar la eficiencia de movilización de distintos genes cromosómicos por el plásmido R68.45 desde una estirpe de *R. trifolii* a otra. El método empleado está descrito en Métodos, apartado 10. Los trasconjugantes se seleccionaron en medio mínimo que contenía kanamicina y los requerimientos de la estirpe receptora. Las colonias que crecieron en este medio se trasplantaron a placas que contenían todos los requerimientos excepto aquél cuya complementación se quería analizar. La Tabla VII muestra los resultados de esta experiencia. De ellos hay que resaltar que la transferencia del factor R68.45 en *R. trifolii* se realiza con una eficiencia excepcionalmente alta.

TABLA VII. *Trasferencia del plásmido R68.45 y movilización de genes cromosómicos entre estirpes de R. trifolii.*

Donador (R ⁻)	Receptor	Frecuencia trasconjugan- tes Km ^R	Fenotipo seleccio- nado	Frecuencia de recombinación
RS230	RS213	2,90 x 10 ⁻¹	Leu ⁺	3,30 x 10 ⁻⁴
RS230	RS241	2,81 x 10 ⁻¹	Ade ⁺ Str ^R	2,71 x 10 ⁻⁴ 8,90 x 10 ⁻⁴
RS230	RS293	4,26 x 10 ⁻¹	Ade ⁺ Tyr ⁺ Str ^R	7,40 x 10 ⁻⁴ 3,30 x 10 ⁻⁴ 5,00 x 10 ⁻⁵
RS230	RS294	4,36 x 10 ⁻¹	Thr ⁺ Ade ⁺	1,10 x 10 ⁻⁴ 1,10 x 10 ⁻⁵
RS230	RS295	1,06 x 10 ⁻¹	Arg ⁺ Ade ⁺	2,61 x 10 ⁻⁴ 1,29 x 10 ⁻⁵
RS230	RS235	4,16 x 10 ⁻¹	Met ⁺ His ⁺	3,00 x 10 ⁻⁵ 9,23 x 10 ⁻⁴
RS278	RS235	3,46 x 10 ⁻¹	His ⁺ Met ⁺	8,50 x 10 ⁻⁶ 2,66 x 10 ⁻⁴
RS278	RS288	8,38 x 10 ⁻¹	His ⁺ Tyr ⁺ Rif ^R	1,10 x 10 ⁻⁴ 1,60 x 10 ⁻⁴ 6,00 x 10 ⁻⁵
RS278	RS271	5,80 x 10 ⁻¹	Leu ⁺ Rif ^R	1,10 x 10 ⁻⁴ 7,00 x 10 ⁻⁴
RS278	RS290	3,30 x 10 ⁻¹	Thr ⁺	1,88 x 10 ⁻⁴
RS278	RS291	5,20 x 10 ⁻¹	His ⁺ Thi ⁺	6,40 x 10 ⁻⁶ 5,40 x 10 ⁻⁴
RS278	RS292	6,10 x 10 ⁻¹	Pdx ⁺	1,70 x 10 ⁻⁴

La frecuencia de transferencia de todos los marcadores estudiados oscilan entre 1×10^{-4} y 1×10^{-5} . Teniendo en cuenta que todos los marcadores empleados tienen una frecuencia de reversión espontánea de 1×10^{-8} , puede considerarse que todos los revertientes encontrados son el resultado de la conjugación y la subsiguiente transferencia cromosómica.

2.3. *Estudio de algunas características de los cruzamientos intraespecíficos mediados por el factor R68.45*

Con esta serie de experimentos se pretendió estudiar características tan importantes como son el alcance de la transferencia genética y la incidencia del carácter R^- entre los trasconjugantes. Se llama alcance de la transferencia de un plásmido a la longitud cromosómica máxima que es capaz de transportar dicho plásmido. El alcance se mide experimentalmente como cantidad de trasconjugantes que han recibido múltiples marcadores del donador, si no se conoce la distancia entre ellos, o por la distancia máxima entre marcadores que es capaz de movilizar, si se conoce.

Por otra parte, la proporción de trasconjugantes R^+/R^- resulta muy útil para establecer el tipo de tras

misión genética que se está dando.

Estos estudios requieren el aislamiento de un número elevado de trasconjugantes, cuyo genotipo se determina posteriormente.

2.3.1. Alcance de la transferencia genética

Para realizar estos estudios se han utilizado es--tirpes receptoras que llevan varios alelos mutantes, permitiéndolo establecer si existen limitaciones en la longitud de los fragmentos cromosómicos transferidos.

Los experimentos realizados con este fin son en todo similares a los expuestos en el apartado 2.2. Una vez seleccionados los trasconjugantes que poseían uno de los caracteres del donador, se investigó qué proporción de ellos poseían todos los demás. Los resultados presentados en la Tabla VIII muestran que solo en tres de los cruzamientos se dá múltiple con una frecuencia detectable. El hecho de que en la mayoría de los casos esto no se dé parece indicar que el alcance de la transferencia no es total, es decir o bien no se puede transmitir el cromosoma completo, o bien la integración de los distintos fragmentos en el cromosoma del receptor no es eficaz al 100%. Dado que el sistema de conjugación empleado permite el contacto más que suficientemente en--

TABLA VIII. *Trasferencia simultanea de varios marcadores genéticos de R. trifolii en cruzamientos mediados por el factor R68.45*

Donador (R ⁺)	Receptor	Fenotipo seleccionado	Fenotipo recombinante múltiple	% trasfere- ncia múltiple
RS278	RS288	His ⁺	His ⁺ Tyr ⁺ Str ^R	23
RS230	RS295	Ade ⁺	Ade ⁺ Arg ⁺ Rif ^R	0
RS278	RS235	His ⁺	His ⁺ Met ⁺ Str ^R	0
RS230	RS294	Thr ⁺	Thr ⁺ Ade ⁺ Rif ^R	35
RS230	RS293	Tyr ⁺	Tyr ⁺ Ade ⁺ Rif ^R	0
RS278	RS296	His ⁺	His ⁺ Met ⁺ Can ^R	0
		Met ⁺	Met ⁺ His ⁺ Str ^R	3
RS278	RS238	Phe ⁺	Phe ⁺ His ⁺ Str ^R	0
RS230	RS241	Ade ⁺	Ade ⁺ Rif ^R	0

tre los pares conjugantes, se desestima la explicación de que la conjugación es incompleta.

2.3.2. Incidencia del caracter R^- entre los trasconjugantes

Los experimentos consisten en llevar a cabo conjugaciones como las descritas en apartados anteriores con la diferencia que los trasconjugantes se seleccionan en medio que contienen todos los requerimientos del receptor excepto uno. En este caso no contenía los antibióticos, la resistencia a los cuales esta determinada por el plásmido. El caracter R^+ o R^- se estableció replicando los trasconjugantes a medios con o sin ampicilina y tetraciclina. De la tabla IX, que muestra los resultados, se deduce que prácticamente todos los trasconjugantes han recibido el plásmido completo. Por tanto, este sistema de transmisión cromosómica se asemeja, al menos en la mayor parte de los casos, al sistema F' de *E. coli*.

Resulta obvio, que los trasconjugantes R^+ son el resultado de un proceso regular de conjugación con transmisión simultánea de dicho factor y, en la mayoría de los casos, de trozos de cromosoma del donante. No es tan obvio el origen de los R^- por lo que será comentado más ampliamente en la discusión. Desde el punto de vis

ta práctico se decidió que en adelante se exigiría a los trasconjugantes que fueran R^+ , es decir, capaces de crecer en placas que contuvieran los antibióticos, la resistencia a los cuales esta determinada por los plásmidos.

TABLA IX. Incidencia del caracter R^- en poblaciones trasconjugantes

Cruzamiento	Fenotipo seleccionado	Trasconjugantes probados	R^+	R^-	% R^-
RS230xRS293	Ade ⁺	204	198	6	3
RS278xRS288	Tyr ⁺	163	160	3	2
RS278xRS238	His ⁺	113	112	1	1
RS230xRS271	Str ^R	199	197	2	1

2.4. Construcción del mapa de ligamiento de *R. trifolii* RS176 por conjugación mediada por el plásmido R68.45

Los análisis rutinarios de ligamiento se llevaron a cabo a partir de los datos de transferencia de alelos silvestres y de resistencia a antibióticos. Se han seguido los métodos clásicos de construcción de mapas de procariotas (Taylor y Adelberg, 1961; Hayes, 1968; Taylor y Trotter, 1972; Carlberg, 1976).

2.4.1. Estudios de los porcentajes de ligamiento entre pares de marcadores

Se trata, en este apartado, de establecer el ligamiento y la distancia entre los genes de los cuales se poseen mutantes en la colección de estirpes que se muestra en la Tabla XXVI.

Para ello se han realizado los cruzamientos que se indican en las Tablas X a XXI, según se detalla en Métodos, apartado 10. Los trasconjugantes se seleccionaron en medios que contenían todos los requerimientos del receptor y los antibióticos, la resistencia a los cuales está determinada por un plásmido. Sembrando en las placas apropiadas se seleccionaron los trasconjugantes que habían recibido uno de los marcadores del donador. Entre ellos se determinó la proporción de los que habían recibido además otro de los marcadores. Las Tablas X-XXI muestran también frecuencia de ligamiento entre pares de marcadores y la distancia entre ellos, calculada mediante la expresión matemática de Kemper (1974):

$$C = (1 - t)^l + t(1 - nt)$$

dónde C es la frecuencia de ligamiento y t es la distancia entre pares de marcadores genéticos.

TABLA X. Cruzamiento de las estirpes RS230 (his-6, str-1 R68.45) por RS246 (ade-29, rif-6). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS230	RS246	<i>rif-6 ade-29</i>	0,41	0,23
		<i>rif-6 str-1</i>	0,21	0,40
		<i>str-1 ade-29</i>	0,04	0,62

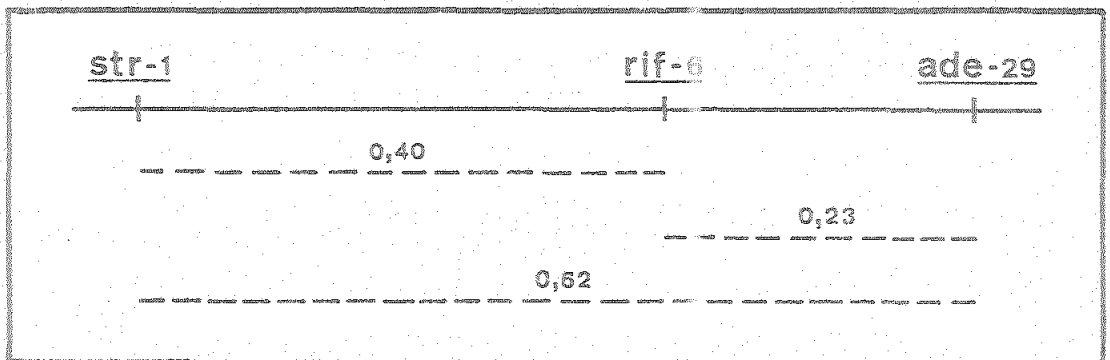


TABLA XI. Cruzamiento de las estirpes RS230 (his-6, str-1, R68.45) por RS293 (ade-29, tyr-13, rif-6). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS230	RS293	ade-29 tyr-13	0,39	0,25
		rif-6 tyr-13	0,79	0,05
		rif-6 ade-29	0,32	0,31
		ade-29 str-1	0,06	0,65
		tyr-13 str-1	0,17	0,47

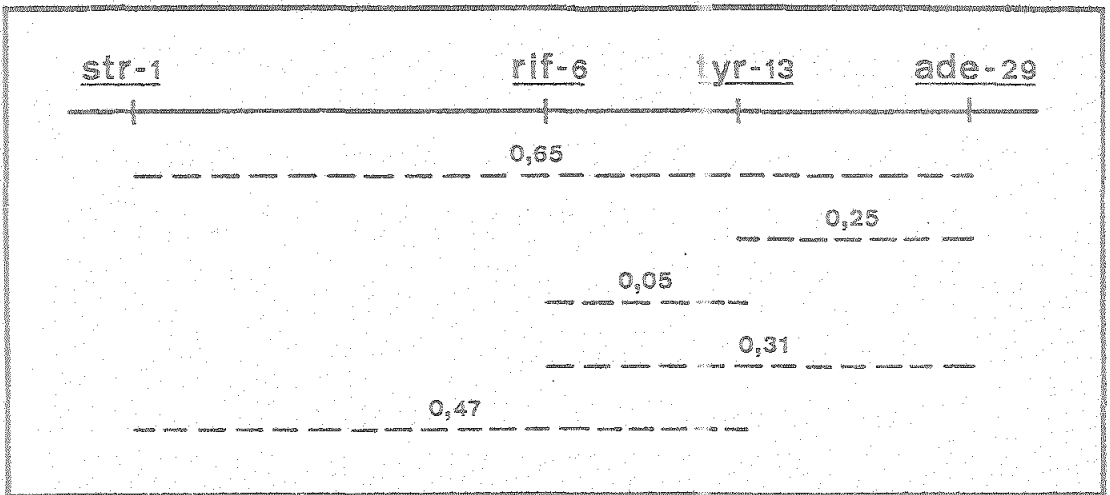


TABLA XII. Cruzamiento de las estirpes RS230 (his-6, str-1, R68.45) por RS294 (ade-29, thr-18, rif-6). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
Rs230	RS294	thr-18 ade-29	0,75	0,07
		ade-29 thr-18	0,69	0,09
		ade-29 rif-6	0,46	0,20
		thr-18 rif-6	0,69	0,09

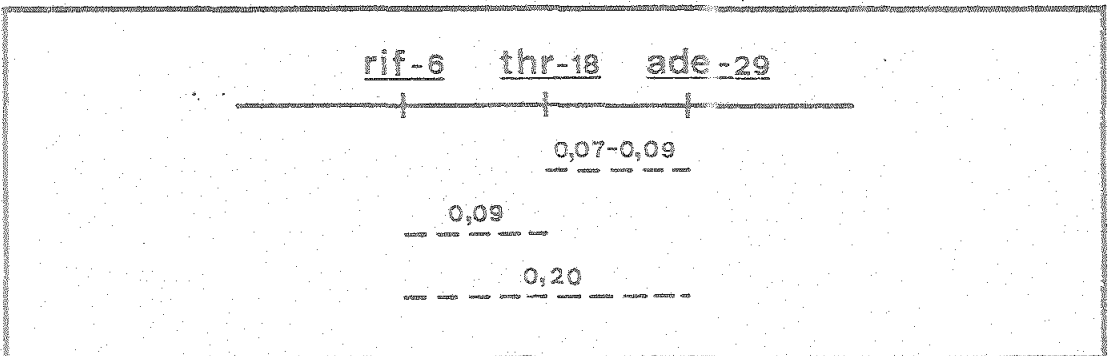


TABLA XIII. Cruzamiento de las estirpes RS230 (his-6, str-1, R68.45) por RS295 (ade-29, arg-19, rif-6). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS230	RS295	ade-29 arg-19	0,65	0,10
		arg-19 str-1	0,01	0,85
		ade-29 str-1	0,08	0,62
		rif-6 arg-19	0,25	0,37

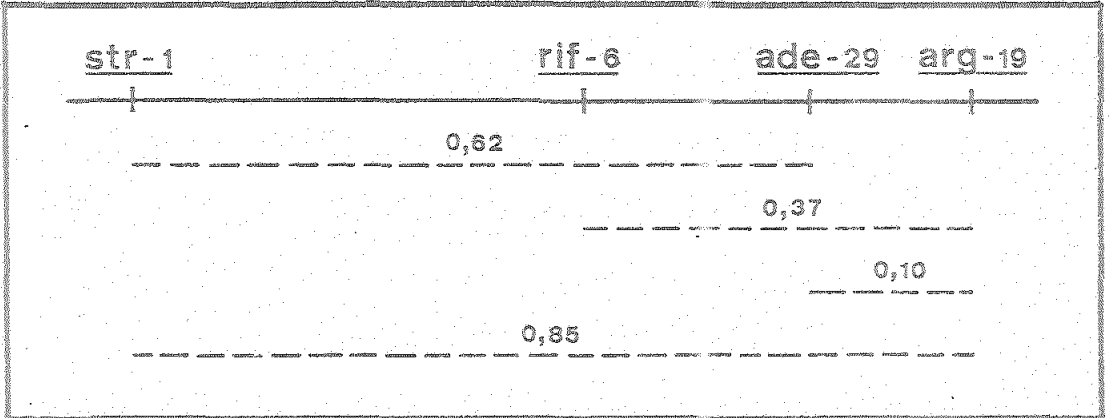


TABLA XV. Cruzamiento de las estirpes RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) por RS238 (his-6, phe-18, str-1). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS238	<i>phe-18 his-6</i>	0,04	0,75
		<i>str-1 phe-18</i>	0,01	0,85
		<i>phe-18 rif-6</i>	0,16	0,47

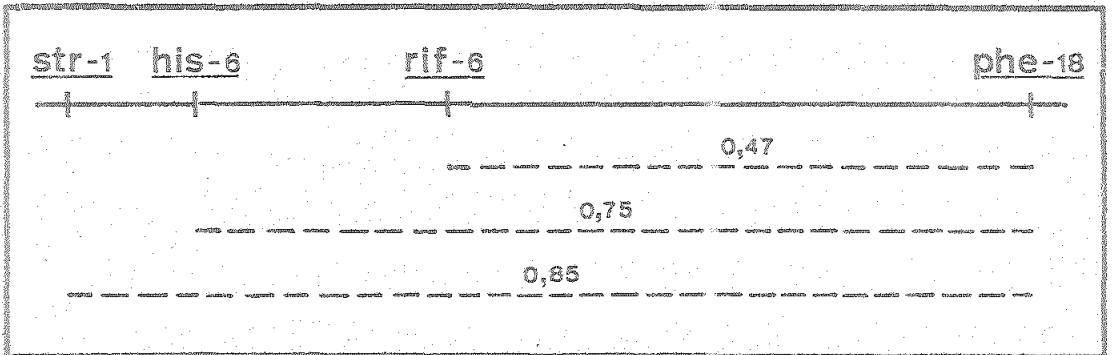


TABLA XVI. Cruzamiento de las estirpes RS278 (ade-29, rif-6, R68-45) por RS271 (leu-23, str-1). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS271	leu-23 rif-6	0,04	0,75
		str-1 leu-23	0,02	0,80
		ade-29 leu-23 *	0,47	0,20

* Par de ligamiento para la selección de leu-23y selección de rif-6.

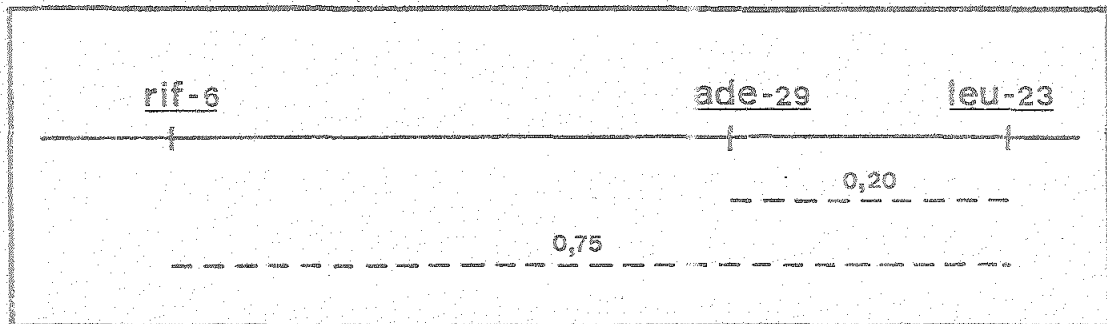


TABLA XVII. Cruzamiento de las estirpes RS230 (*ade-17*, *rif-6*, R68.45) por RS288 (*his-6*, *tyr-28*, *str-1*). Ta-
bla de resultado y diagrama de las distancias genéticas
entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS288	<i>tyr-28 his-6</i>	0,36	0,27
		<i>tyr-28 rif-6</i>	0,24	0,39
		<i>his-6 rif-6</i>	0,62	0,12
		<i>str-1 his-6</i>	0,40	0,25
		<i>str-1 tyr-28</i>	0,93	0,02

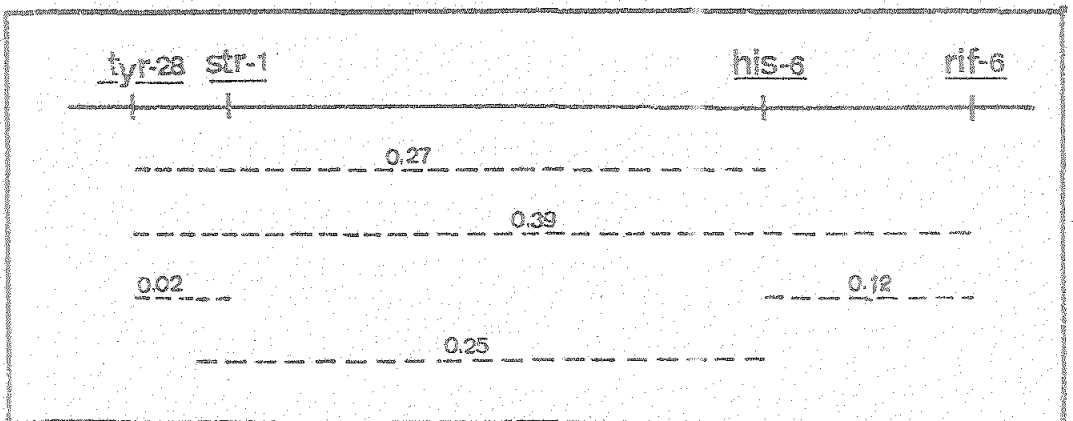


TABLA XVIII. Cruzamiento de las estirpes RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) por RS290 (his-6, thr-27, str-1). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS290	<i>thr-27 his-6</i>	0,42	0,23
		<i>str-1 thr-27</i>	0,09	0,60
		<i>rif-6 thr-27</i>	0,70	0,08

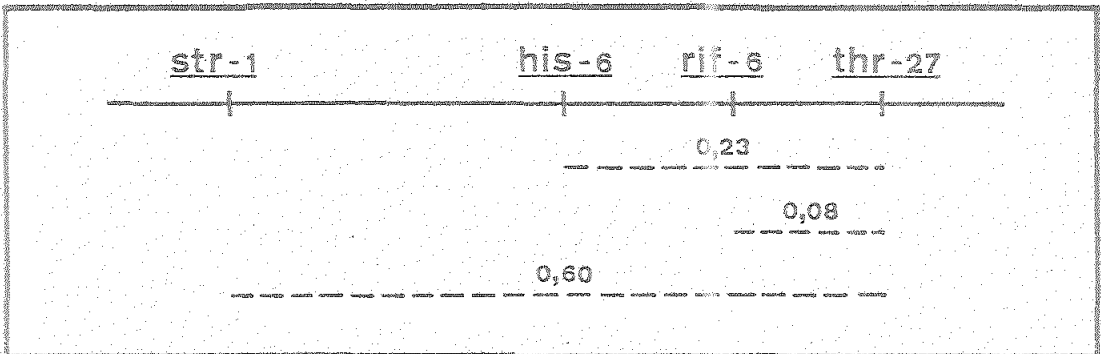


TABLA XIX. Cruzamiento de las estirpes RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) por RS291 (his-6, thi-1, str-1). Tabla de resultado y diagrama de distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS291	<i>thi-1 his-6</i>	0,75	0,07
		<i>str-1 thi-1</i>	0,39	0,25
		<i>rif-6 thi-1</i>	0,72	0,08

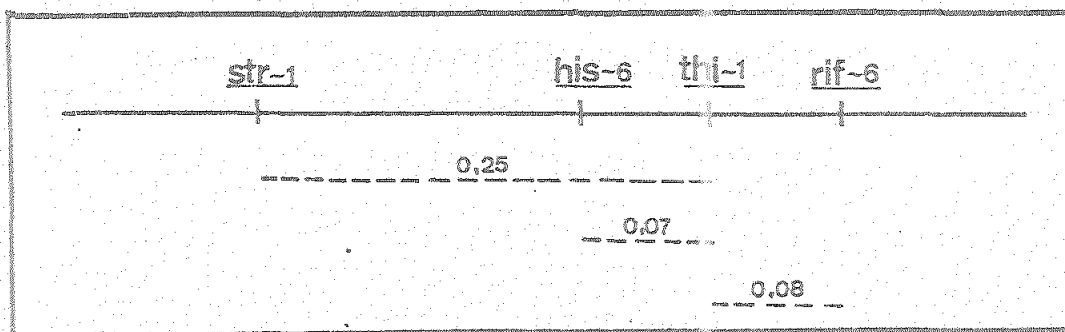


TABLA XX. Cruzamiento de las estirpes RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) por RS292 (his-6, pdx-3, str-1). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS292	<i>pdx-3 his-6</i>	0,03	0,75
		<i>str-1 pdx-3</i>	0,27	0,36
		<i>rif-6 pdx-3</i>	0,01	

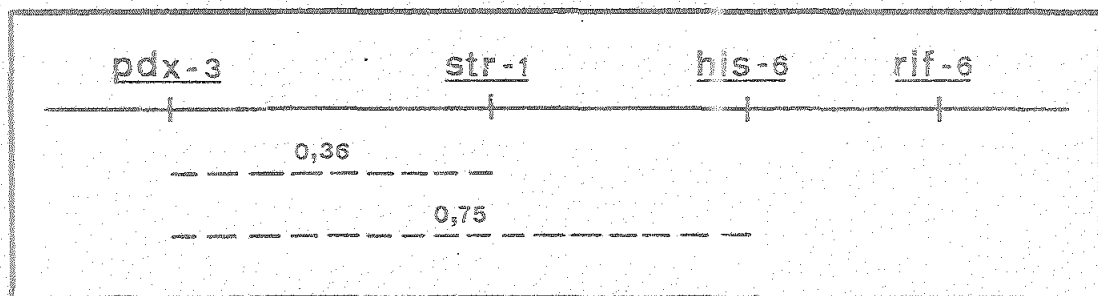
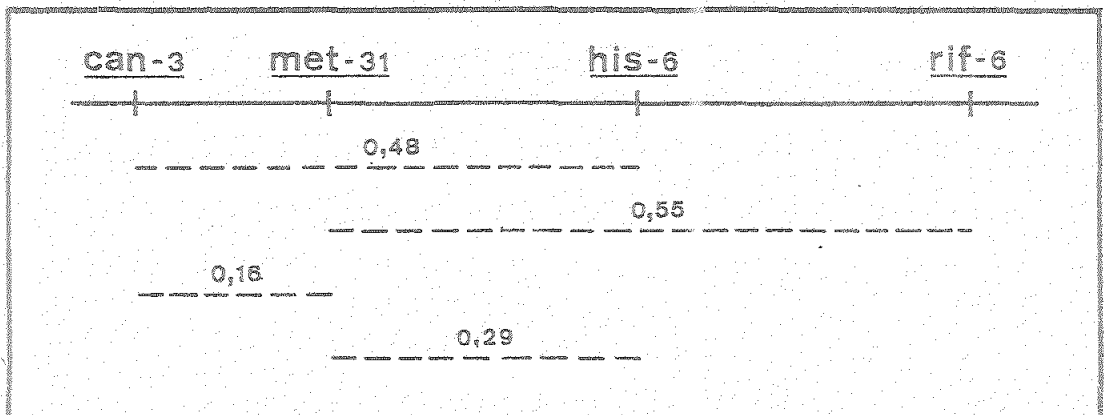


TABLA XXI. Cruzamiento de las estirpes RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) por RS296 (his-6, met-31, str-1, can-3). Tabla de resultado y diagrama de las distancias genéticas entre los marcadores estudiados.

Donador	Receptor	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
RS278	RS296	can-3 his-6	0,16	0,48
		can-3 met-31	0,54	0,16
		his-6 met-31	0,35	0,29
		met-31 rif-6	0,12	0,55
		can-3 rif-6	0,02	0,80



Las distancias que se muestran en las Tablas X a XXI son la media de dos a cuatro experimentos iguales en cada uno de los cuales se analizaron de 130 a 200 colonias trasconjugantes.

En los casos en que la distancia entre dos marcadores variaba significativamente entre un cruzamiento y otro, se duplicaba la muestra de trasconjugantes analizados, lo que, en la mayoría de los casos, hacía disminuir dichas diferencias.

2.4.2. Análisis de "tres factores" en algunos cruzamientos

Para comprobar y completar los datos anteriormente presentados de distancia entre genes, se llevaron a cabo cruzamientos entre estirpes con múltiples marcadores, analizándose seguidamente el genotipo completo de los trasconjugantes. Las conjugaciones se llevaron a cabo según se indica en Métodos, apartado 10. La mezcla conjugante se sembró en placas de medio mínimo que contenían todos los requerimientos del donador, todos los requerimientos del receptor y los antibióticos, la resistencia a los cuales está codificada por el plásmido, por el donador o por el receptor. Se pretendió, así, sele-

TABLA XXII. Resultados de los análisis de "tres factores" en el cruzamiento RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) - por RS271 (leu-23, str-1) y diagrama de las distancias genéticas encontradas (---) y calculadas teóricamente (...) entre los marcadores.

Fenotipo seleccionado	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
a) His ⁺	str-1 leu-23	0,01	
	str-1 ade-17	0,19	0,45
b) Phe ⁺	leu-23 str-1	0,01	
	leu-23 ade-17	0,03	0,75

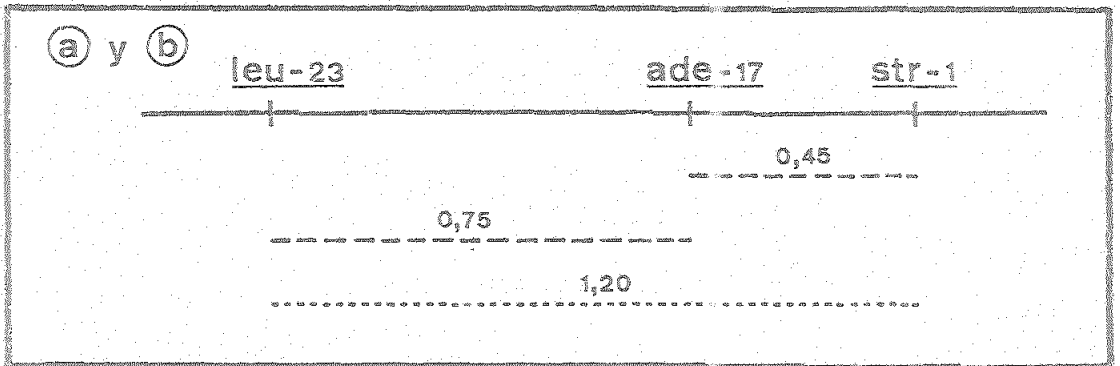


TABLA XXIII. Resultados de los análisis de "tres factores" en el cruzamiento RS230 (*his-6*, *str-1*, R68.45) - por RS293 (*ade-29*, *tyr-13*, *rif-6*) y diagrama de las distancias genéticas encontradas (---) y calculadas teóricamente (...) entre los marcadores.

Fenotipo seleccionado	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (d)
a) Ade ⁺	<i>ade-29 tyr-13</i>	0,26	0,37
	<i>ade-29 his-6</i>	0,03	0,75
b) Tyr ⁺	<i>tyr-13 ade-29</i>	0,28	0,36
	<i>tyr-13 his-6</i>	0,23	0,40

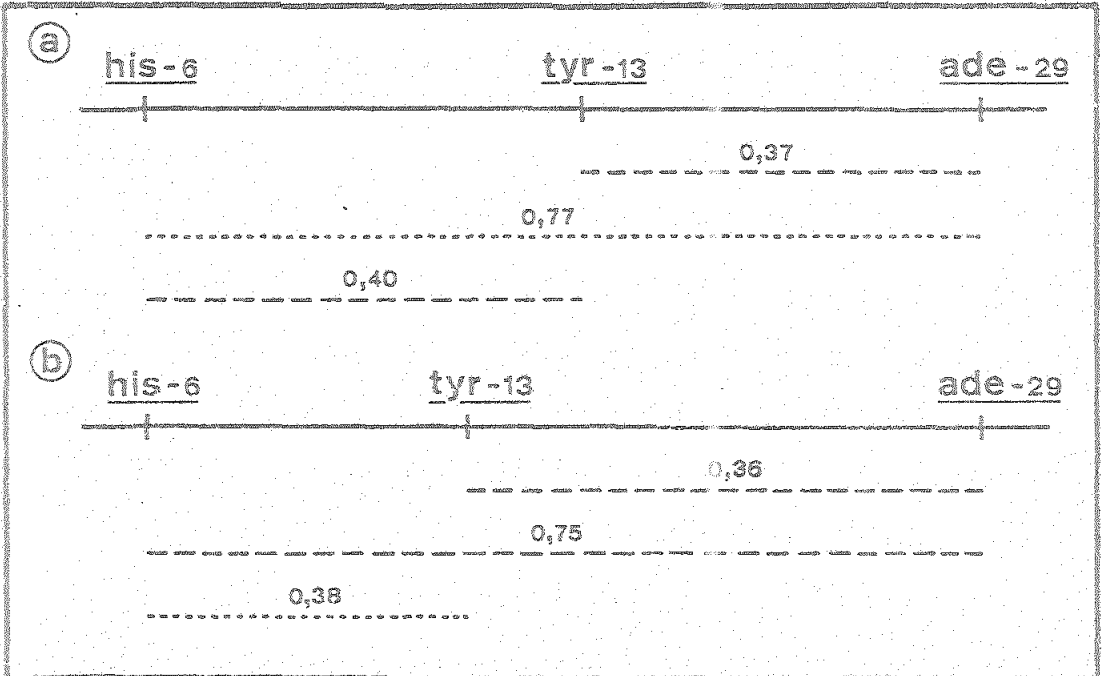


TABLA XXIV. Resultados de los análisis de "tres factores" en el cruzamiento RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) - por RS238 (his-6, phe-18, str-1) y diagrama de las distancias genéticas encontradas (---) y calculadas teóricamente (...) entre los marcadores.

Fenotipo seleccionado	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
a) His ⁺	his-6 phe-18	0,05	0,70
	his-6 ade-17	0,07	0,65
b) Phe ⁺	phe-18 his-6	0,06	0,67
	phe-18 ade-17	0,01	

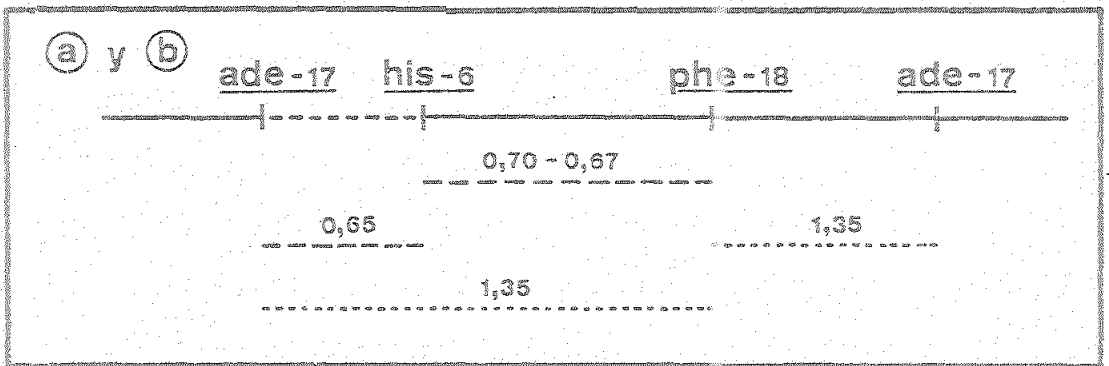
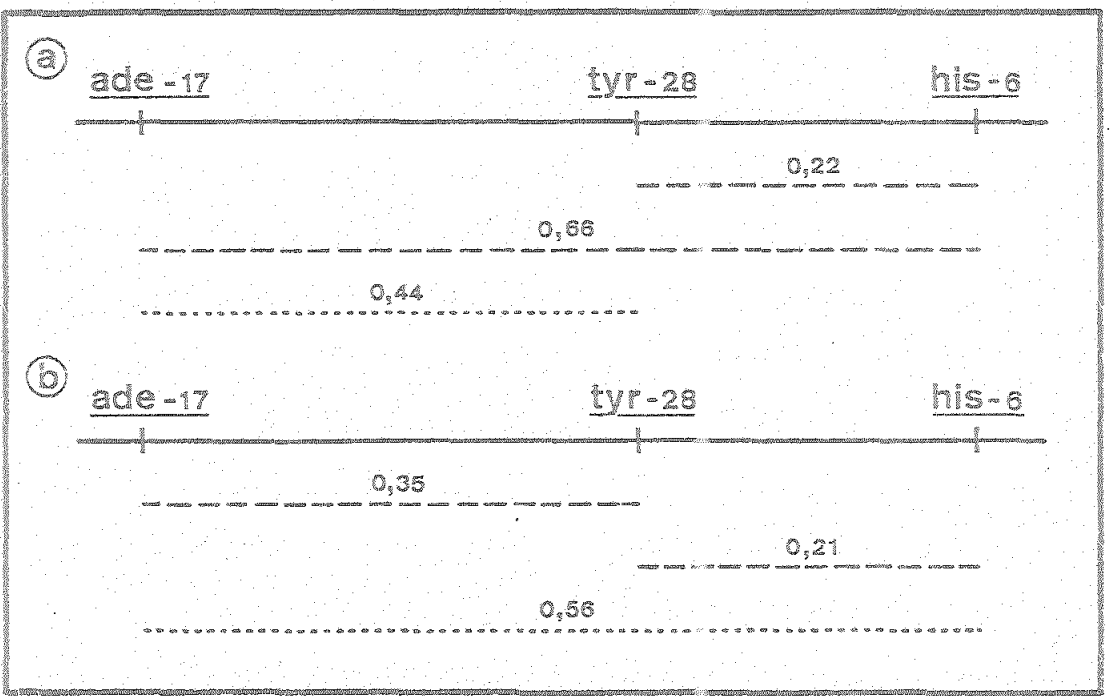


TABLA XXV. Resultados de los análisis de "tres factores" en el cruzamiento RS278 (ade-17, rif-6, R68.45) por RS288 (his-6, tyr-28, str-1) y diagrama de las distancias genéticas encontradas (---) y calculadas teóricamente (...) entre los marcadores.

Fenotipo seleccionado	Par de marcadores estudiados	Ligamiento (c)	Distancia (t)
a) His ⁺	his-6 tyr-28	0,43	0,22
	his-6 ade-17	0,06	0,66
b) Tyr ⁺	tyr-28 his-6	0,46	0,21
	tyr-28 ade-17	0,28	0,35



ccionar solo los trasconjugantes de los que se sabía positivamente que habían recibido material genético cromósomico del donador. A continuación se analizó el genotipo de las colonias seleccionadas y se determinó la distancia entre pares de marcadores. En las Tablas XXII a XXV se presentan los resultados de estos experimentos y un diagrama de las distancias genéticas entre los genes estudiados. Los calculos teóricos de las distancias se hicieron sobre la base de que estas son aditivas.

2.4.3. Ordenación general de los genes en el cromosoma

La Figura 6 resulta de la recopilación de todos los datos expuestos anteriormente y muestra la ordenación final de los genes en el cromosoma bacteriano, indicando las distancias expuestas en los diferentes cruzamientos realizados.

Los datos permiten circularizar el mapa. El resultado de esta circularización se presenta en la Figura 7.

FIGURA 6. Mapa preliminar de ligamiento de *R. trifolii* RS176

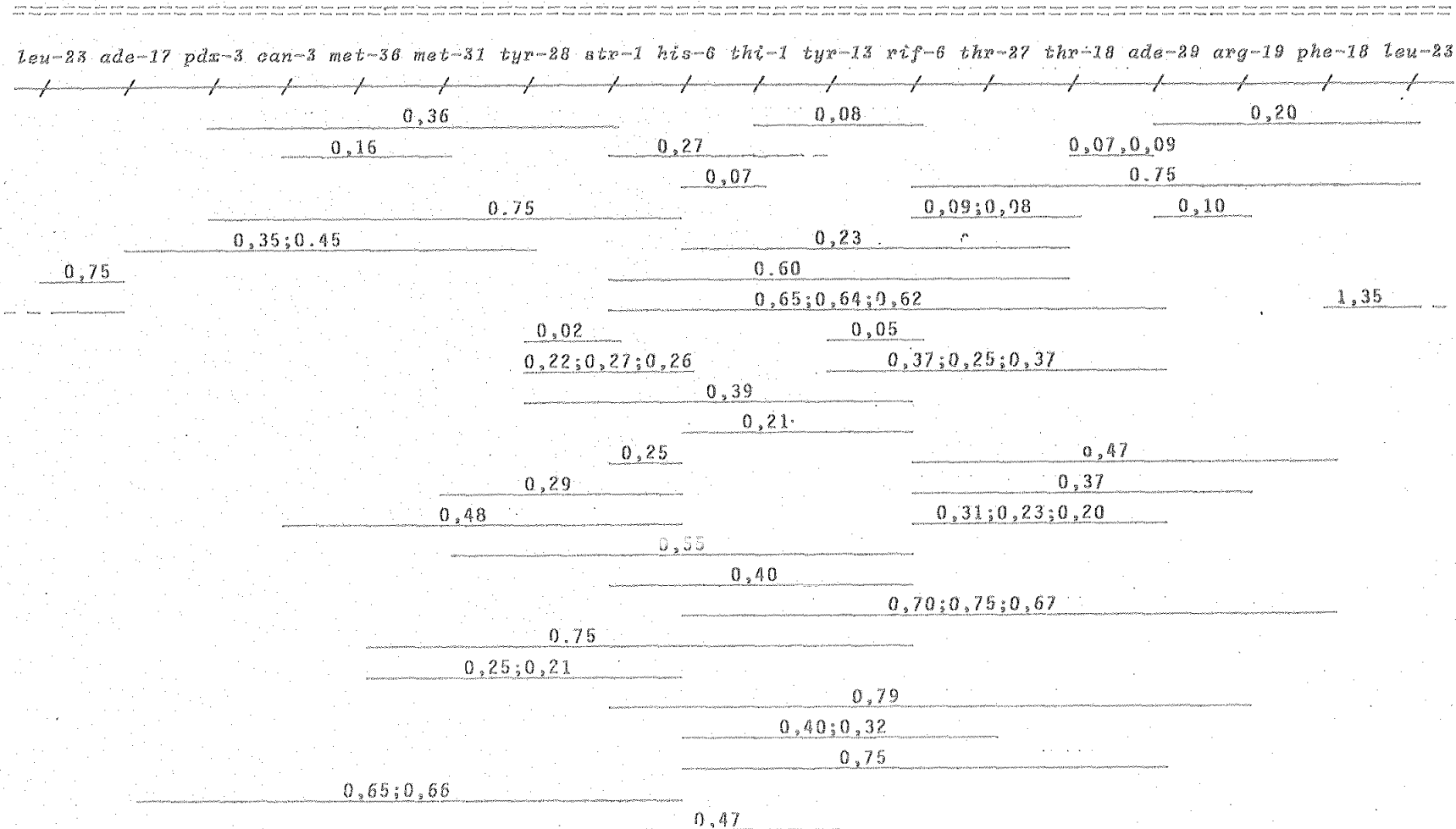
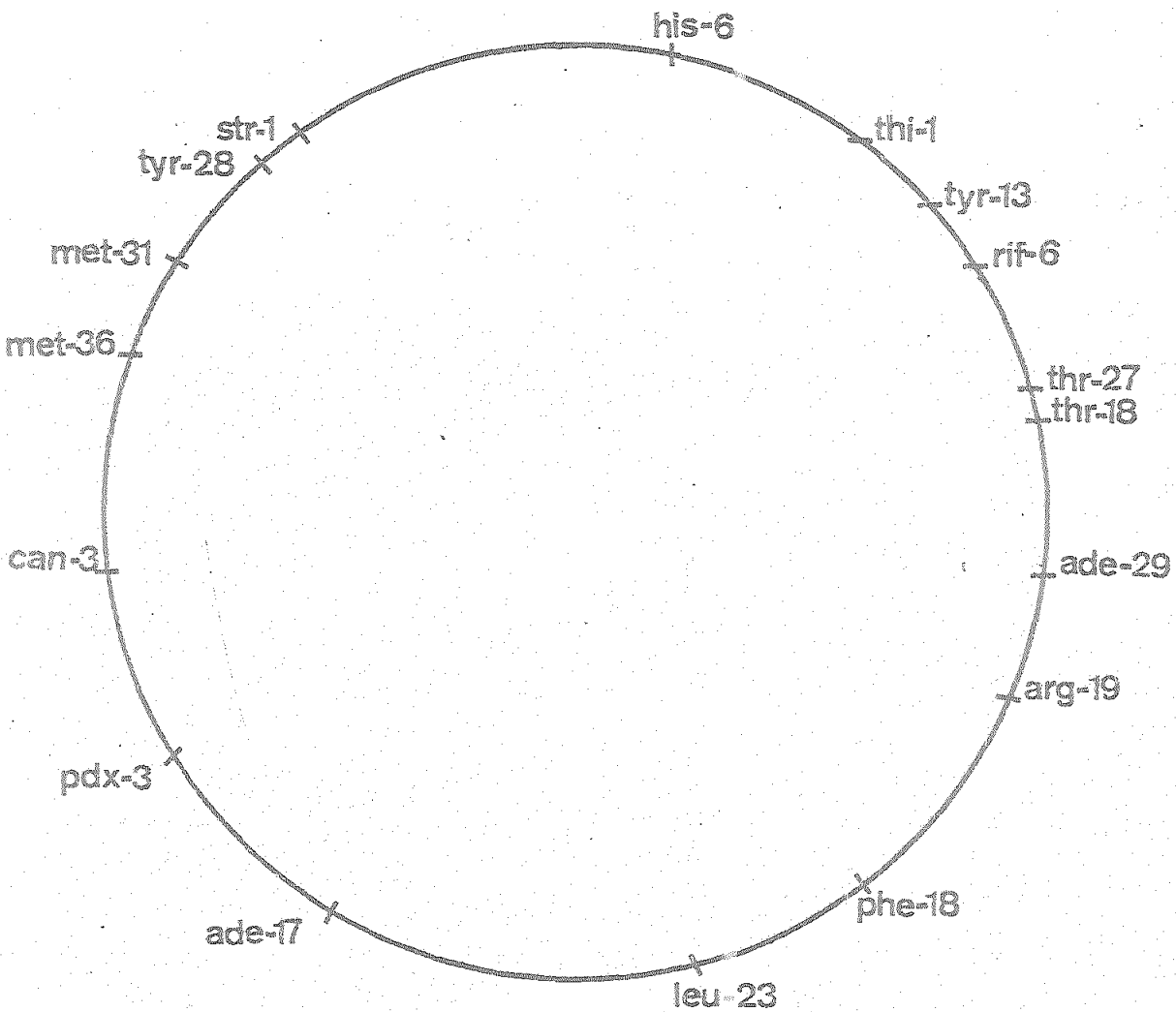


FIGURA 7. Mapa circular de ligamiento de *Rhizobium trifolii* RS176



DISCUSION

El primer problema que se abordó fué la búsqueda de un sistema de transferencia adecuado para la construcción del mapa de *R. trifolii*. Se han empleado cuatro plásmidos R (RP1, RP4, R1drd19 y R68.45).

La frecuencia de transmisión para el plásmido RP1 desde *P. fluorescens* a *R. trifolii* fué de 1×10^{-3} . Esta frecuencia es superior en tres órdenes de magnitud respecto a la obtenida por Stanley y Dunican (1979) en la transferencia de este factor desde *E. coli* a *R. trifolii*, lo que parece indicar que la transmisión es más eficiente si se hace desde su huésped original, *P. fluorescens*. Esta mayor eficiencia también se refleja en el hecho de que estos autores no encontraron transmisión de material cromosómico, mientras que en esta Tesis se describe la transferencia de marcadores, tales como el *his-14* y el *leu-23* con una frecuencia de 1×10^{-7} . Si se considera válida la observación de Beringer y Hopwood (1976) de que la frecuencia de transferencia de material cromosómico suele estar tres o cuatro órdenes de magnitud por debajo de la del plásmido, se comprende la dife

rencia encontrada entre los trabajos de Stanley y Dunican (1979) y esta Tesis. En efecto, los autores obtendrían transferencia cromosómica con una frecuencia de 1×10^{-10} , lo que la hace experimentalmente indetectable. Sin embargo y dado que el valor de 1×10^{-7} es muy cercano a la frecuencia espontánea de reversión (de 1×10^{-8}), no se siguió utilizando.

Respecto al plásmido RP4, la frecuencia de transmisión es mayor que en el caso anterior (del orden de 1×10^{-2}), estando de acuerdo con los resultados obtenidos por Beringer y Hopwood (1976), siendo muy similares a los obtenidos por Beringer et al. (1978) y Julliot y Boistard (1979) que trabajaron con estirpes de *R. leguminosarum* y un orden de magnitud inferior al obtenido por Meade y Signer (1977) con estirpes de *R. meliloti*. La frecuencia de transmisión de marcadores cromosómicos, al igual que en el caso de RP1, muy próxima a la de reversión espontánea, excepto en el caso del marcador *his-14* que es algo mayor, llegando a ser de 1×10^{-5} . Esto coincide con las observaciones realizadas por Olsen y Gonzalez (1974), quienes sugieren que en *E. coli* la integración del plásmido RP4 se realiza más frecuentemente cerca del operón de la histidina, lo que implica que este marcador tendría una frecuencia de recombinación más alta que el resto. Beringer (1974) describe

un caso semejante empleando un plásmido derivado de RP4 y, como donador, una estirpe de *R. leguminosarum*. Este autor obtuvo frecuencias de recombinación para un gen de la ruta biosintética del triptófano, cien veces mayores que para otros genes de la misma ruta. El conjunto de estos resultados podría indicar que el plásmido RP4 posee lugares de integración definidos en el cromosoma bacteriano.

Las frecuencias de transferencias de marcadores cromosómicos mediada por RP4 están de acuerdo con las obtenidas por Beringer et al. (1974) y Beringer y Hopwood (1976) en estirpes de *R. leguminosarum* y son, consecuentemente con lo dicho antes para la transferencia del plásmido, un orden de magnitud inferior a las obtenidas por Meade y Signer (1977) en *R. meliloti*. Este plásmido, aunque se ha empleado para la transferencia de marcadores y construcción de mapas de ligamiento en *R. meliloti* (Meade y Signer, 1977) y en *Acinetobacter* (Towner y Vivian, 1976), resulta ser poco eficiente en otras especies bacterianas, tales como *P. aeruginosa* (Haas y Holloway, 1976) y *R. leguminosarum* (Beringer, 1974). Por los resultados obtenidos en este trabajo se puede deducir que el factor RP4 en *R. trifolii* no resulta especialmente útil en la construcción del mapa de ligamiento.

El tercer plásmido que se ha estudiado es el R1-drd19 que tiene una frecuencia de transmisión, entre *E. coli* y *R. trifolii*, del orden de 1×10^{-4} . Beringer (1974) encontró que la frecuencia de transmisión de este plásmido en *E. coli* era cinco órdenes de magnitud superior a las encontradas entre estirpes de *R. leguminosarum* (de 1×10^{-9}), frecuencia esta última muy similar a la encontrada en esta Tesis para *R. trifolii*. Sin embargo, Kowalczyk y Lorkiewicz (1977) encuentran menores frecuencias de transmisión del plásmido entre estirpes de *R. trifolii*. Las diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores y los que aquí se presentan podrían ser explicados basándose en la aportación de Duncan y Tierney (1974) de que este plásmido es inestable en muchos huéspedes y que, de hecho, no se transmite completo en *R. trifolii*, ni con una frecuencia del 100%. En efecto, Kowalczyk y Lorkiewicz (1977) seleccionaron trasconjugantes que hubieran recibido las tres resistencias de la que es portador el plásmido, mientras que -- aquí solo se seleccionan dos de ellas. También puede -- influir la diferente metodología empleada, pues mientras que ellos utilizan la técnica de conjugación en placa, -- aquí se utiliza la técnica de conjugación en filtro.

La transferencia de material cromosómico mediada por R1-drd19 no debe ser muy eficiente dado que su frecuencia no es significativamente mayor que la de rever-

si3n espont3nea. As3 pues, los resultados obtenidos obligan a su eliminaci3n como un buen factor sexual en *R. trifolii*.

El pl3smido R68.45 es el m3s utilizado actualmente, pues resulta ser el m3s eficaz para la transferencia de marcadores cromos3micos. La frecuencia de transmisi3n de este pl3smido de *E. coli* a *R. trifolii* (del orden de 1×10^{-3}) es menor que lo indicado por Casades3s y Olivares (1979) entre *E. coli* y *R. meliloti* y por Beringer y Hopwood (1976) de *E. coli* a *R. leguminosarum* (alrededor de 1×10^{-2} en ambos casos). Sin embargo, la frecuencia encontrada entre estirpes de *R. trifolii* (aproximadamente 1×10^{-1}) es muy similar a las que muestran Kondorosi et al. (1977) y Casades3s y Olivares (1979) entre estirpes de *R. meliloti*, Beringer et al. (1978) entre estirpes de *R. leguminosarum* (aproximadamente 1×10^{-2}) y Johnston et al. (1978) entre *R. meliloti* y *R. leguminosarum*. Esto parece indicar que, como era de esperar, es m3s eficaz la transmisi3n del pl3smido en conjugaciones intraespec3ficas que en interespec3ficas.

Respecto a la transferencia de marcadores cromos3micos entre *E. coli* y *R. trifolii*, se han obtenido mejores resultados que con los otros pl3smidos aunque las frecuencias obtenidas son menores en dos 3rdenes de mag

nitud que en las conjugaciones entre estirpes de *R. trifolii*, como también era de esperar. Estos resultados son similares a los que se presentan entre estirpes de *R. meliloti* (aproximadamente de 1×10^{-5}) (Kondorosi et al., 1977; Casadesús y Olivares, 1979) y entre estirpes de *P. aeruginosa* PAO, su huésped original (Haas y Holloway, 1976), y difiere en dos o tres órdenes de magnitud con las obtenidas entre estirpes de *R. leguminosarum* (Beringer, 1974; Beringer y Hopwood, 1976; Beringer y Johnston, 1977; Beringer et al., 1978) y entre especies distintas de *Rhizobium* (Johnston y Beringer, 1977 y Johnston et al., 1978). Esto parece indicar una mayor similitud en la transmisión de plásmidos entre *R. trifolii* y *R. meliloti* respecto de *R. leguminosarum*.

En su huésped original, *P. aeruginosa* PAO, el factor R68.45 posee gran estabilidad y la pérdida del plásmido completo ocurre con una frecuencia de 1×10^{-6} -- (Haas y Holloway, 1976). Sin embargo, su capacidad de movilización del cromosoma se pierde con una frecuencia de un 3 a un 8% (Haas y Holloway, 1976). En este laboratorio se están llevando a cabo estudios similares en *R. trifolii*. Por el momento, los datos disponibles indican que el comportamiento del factor R68.45 en *R. trifolii* no difiere en gran medida del que manifiesta en su huésped original, aunque las frecuencias de pérdida to-

tal o parcial pueden diferir en uno o dos órdenes de magnitud.

Estos resultados unidos a la estabilidad del plásmido en los trasconjugantes hicieron que fuese elegido para los siguientes trabajos.

Según se deduce de la Tabla VII, todos los marcadores estudiados en esta Tesis tienen aproximadamente la misma probabilidad de ser transferidos, lo que indica que el factor R68.45 es capaz de insertarse en muy diversos lugares del cromosoma. Este hecho, que es común a todos los factores R del grupo P1 y a otros muchos factores R, se atribuye a que poseen secuencias de inserción situadas junto al gen de resistencia a la kanamicina (Puhler et al., 1979).

Otra cuestión a discutir es si la transferencia de material cromosómico mediada por el plásmido R68.45 comprende fragmentos cromosómicos limitados o si se puede transferir el cromosoma entero. De los resultados que se muestran en la Tabla VIII se deduce que el alcance de la transferencia no es total sino que se presentan limitaciones, ya que la distancia máxima entre marcadores cromosómicos transferidos simultáneamente, equivale a un cuarto del cromosoma completo. Esto está de acuerdo con las observaciones de Kondorosi et al. (1977) y Casadesús

y Olivares (1979) quienes indican que en *R. meliloti* puede transferirse hasta un tercio del cromosoma. Sin embargo estas distancias son superiores a las observadas por Beringer et al. (1978) en *R. leguminosarum*, donde el segmento más largo transferido corresponde a un séptimo de la longitud total. Es de resaltar que en *P. aeruginosa* la transmisión es como máximo de un cuarto de la longitud del cromosoma (Haas y Holloway, 1976). Lo que indica que no ha perdido eficiencia al pasar de su huésped original a las distintas especies de *Rhizobium*.

El limitado alcance de la transferencia puede ser debido bien a que el segmento de cromosoma transferido está limitado en su longitud, o bien a que, aunque se transmitan trozos cromosómicos mayores o incluso el cromosoma entero, no recombinan con el del huésped en su totalidad.

Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de que los trozos de cromosoma transmitidos no son muy grandes ya que, de ser así, se esperaría que en algunos casos y con baja frecuencia hubieran recombinado con el cromosoma receptor marcadores muy alejados entre sí. No se dió este caso, sino más bien el contrario, es decir, marcadores situados a una distancia menor que la determinada como máxima para poder ser cotrasmitidos, no mostraron ligamiento alguno en ciertos cruzamientos.

Este resultado podría atribuirse a que el plásmido se integra en el cromosoma del donador a una distancia de uno de los marcadores en cuestión mayor que la máxima transportable por el plásmido. Esta explicación implicaría que los lugares de inserción del plásmido, si bien son múltiples, serían fijos.

Otros resultados aquí presentados se oponen a la hipótesis según la cual los trozos cromosómicos transportados por el plásmido se integran totalmente en el cromosoma del receptor. En efecto, en los cruzamientos RS278 x RS235 y RS230 x RS293 se encontró que la integración de los marcadores *rif* y *str* no implica necesariamente la del marcador *his* situado entre ambos. De aquí se deduce que deben darse múltiples recombinaciones entre el trozo cromosómico del donador y el cromosoma del receptor.

Por otro lado y basándose en los resultados expuestos en esta Tesis, se puede deducir que el tipo de transferencia mediada por R68.45 se ajusta más al sistema F' que al sistema Hfr, por las siguientes razones:

1°) Como ya hemos indicado, la frecuencia de transferencia de todos los marcadores cromosómicos es aproximadamente la misma, lo que indica que el factor R68.45 es capaz de promover transferencia desde múltiples lugares del cromosoma y que los genes serían arrastrados tras -

La desintegración de dicho factor. Estas observaciones implican que para que se dé esta transferencia es necesario una integración transitoria del plásmido en el cromosoma donador (Curtiss y Renshaw, 1969; Evenchik et al., 1969; Moody y Hayes, 1972). Los resultados no concordan con la existencia de una integración estable del plásmido, dando lugar a una transferencia tipo Hfr (Moody y Hunge, 1972). Apoyan esta teoría los trabajos de Haas y Holloway (1976), Kondorosi et al. (1977), Beringer et al. (1978), Casadesús y Olivares (1979) y Holloway (1979).

2°) En los cruces Hfr x F⁻ los trasconjugantes son generalmente F⁻ y la transferencia está polarizada dando marcadores que se transfieren con mayor probabilidad que otros.

En cambio, en el caso de *R. trifolii*, los trasconjugantes son mayoritariamente (más del 95%) de tipo R⁺, según se muestra en la Tabla IX. Estos resultados están de acuerdo con los de los autores anteriormente citados. La procedencia de los R⁻ se discutirá más adelante.

3°) Los fragmentos transferidos son relativamente grandes en relación con los que suelen transportar los F' que en el caso concreto de *E. coli* no superan la trigésima parte de su cromosoma (Hayes, 1968; Siddiqi y Fox, 1973).

La aparición de trasconjugantes R^- parece indicar que en algunos casos (menos del 5%) la transferencia cromosómica se asemeja más a una de tipo Hfr que a una de tipo F' . Esto podría deberse simplemente a la ausencia de escisión del plásmido del cromosoma del donador, lo que no impediría que tuviera lugar la transferencia. Esta hipótesis concuerda con la dada por Beringer et al. (1978) y Casadesús y Olivares (1979) trabajando con este plásmido y Meade y Signer (1977) que trabajaron con el factor RP4. Los resultados también son explicables por un fallo en la desintegración del plásmido que generaría un plásmido incompleto capaz de transferir material cromosómico pero no de expresar todas sus características originales por carecer de los determinantes correspondientes.

Otros autores postulan que la pérdida de determinantes pueda ya tener lugar en el receptor. Sin embargo, el hecho de que la frecuencia de aparición de R^- sea varios órdenes de magnitud superior a la pérdida espontánea de determinantes en este plásmido (Haas y Holloway, 1976) descarta parcialmente esta posibilidad. En este laboratorio se están realizando trabajos que se espera que clarifiquen estos aspectos de la transferencia.

Por otra parte, podría discutirse si en *R. trifolii* este sistema de transferencia es capaz de generar tanto

trasconjugantes haploides como merodiploides estables, según describe Heumann (1968) que ocurre en *R. lupini* por conjugación verdadera. En un trasconjugante merodiploide estable no se puede detectar si ha habido transferencia o no de alelos determinantes de auxotrofia o de sensibilidad a droga puesto que también posee los alelos silvestres o de resistencia. De las Tablas XIV y XV se puede deducir que en ningún caso se han producido merodiploides estables. Los trasconjugantes deben ser, por tanto, generados tras los correspondientes cruzamientos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Meade y Signer (1977), Beringer et al. (1978) y Casadesús y Olivares (1979). Una prueba adicional del carácter haploide de los trasconjugantes es que ninguno de ellos segregaba parcialmente o totalmente el tipo parental.

La construcción del mapa genético de *R. trifolii* se lleva a cabo mediante el estudio de ligamiento de pares de marcadores en distintos cruzamientos. Las máximas longitudes de cromosoma transferidas corresponden a; 0,03 de ligamiento (*met-36 --- rif-6* y *pdx-3 --- his-6*) y 0,04 de ligamiento (*ade-29 --- str-1*, *phe-18 --- his-6* y *leu-23 --- rif-6*). Esto equivale a que, como ya mencionamos anteriormente, en *R. trifolii* se puede transferir como máximo de una vez una distancia correspondiente a un cuarto de la longitud total del cromosoma. Para

hacer esta equivalencia distancia-ligamiento, debe aceptarse la sugerencia de Kondorosi et al. (1977) de que -- existe una correlación muy satisfactoria entre ambas. Esta correlación es máxima cuando el ligamiento es mayor que 0,1. Aun a riesgo de posible error, en esta Tesis se ha tomado como límite inferior de fiabilidad el 0,03 de ligamiento.

La fórmula de Kemper (1974), empleada para deducir la distancia entre marcadores, se utilizó originalmente en experimentos de trasducción. A pesar de que se desconoce como tiene lugar la transferencia mediada por el - factor R68.45, los datos obtenidos hasta ahora a este - respecto indican que no debe ser muy distinto a la trasducción, por lo que se considera válida la aplicación - de la citada fórmula en este trabajo.

Hasta ahora, de los cuatro mapas genéticos de especies del género *Rhizobium* construidos, en sólo uno de - ellos se ha empleado un sistema de corrección de datos, concretamente el de Kondorosi et al. (1977) que se discutirá más adelante. En los otros tres sólo se ha utilizado el ligamiento (en tanto por ciento) entre marcadore, lo que se considera que puede inducir a muchos errores. En efecto, es intrínseca a la metodología empleada la generación de una gran variabilidad de resul-

tados, incluso en experimentos que implican los mismos marcadores. Esta variabilidad puede minimizarse mediante fórmulas de corrección de datos. La única fórmula empleada hasta el momento ha sido la de Wu (1969), cuya expresión matemática es:

$$c = \left(1 - \frac{d}{l} \right)^3$$

donde c representa la frecuencia de ligamiento, d la distancia genética y l la longitud del fragmento cromosómico transferido. Kondorosí et al. (1977) utilizaron esta fórmula simplificándola. Estos autores consideran que el término l es despreciable ya que, según ellos, todos los fragmentos transferidos son de longitud similar. Sin embargo esta consideración no tiene por qué ser válida y nunca ha sido comprobada experimentalmente.

La expresión utilizada en esta Tesis ha sido la de Kemper (1974):

$$c = (1 - t) + (lnt)$$

donde t representa la distancia entre dos marcadores. Como puede verse, esta fórmula no incluye la longitud del fragmento cromosómico que solo debe considerarse si

se va a deducir la distancia física en kilobases (D), empleando la fórmula:

$$D = t (T)$$

donde T representa la longitud del fragmento transferido expresado en daltons.

La expresión de Kemper tiene además la ventaja de que las distancias resultantes son mucho más aditivas - que las deducidas por la fórmula de Wu. No obstante, y a título de comparación, se han aplicado ambas correcciones a todos los datos presentados en esta Tesis. Las distancias resultaron ser muy equivalentes, dándose las mayores diferencias (de hasta 0,1) en ligamientos con baja frecuencia.

Mediante esta fórmula se ha calculado que la longitud total del mapa de *R. trifolii* es de 2,41. Esta longitud es relativamente más pequeña que las que presentan otros mapas cromosómicos de *Rhizobium*. Así se puede calcular que el mapa de *R. meliloti* debe de tener de 2,57 a 3,37, según los datos de Meade y Signer (1977), Kondrosi et al. (1977) y Casadesús y Olivares (1979), y el de *R. leguminosarum* debe tener 4,77, según los datos de Beringer et al. (1978). Las diferencias observadas, además de no parecer significativas, no tienen porqué ser

reales, ya que algunos de los cálculos han de hacerse con datos por debajo del 0,1 de ligamiento al no existir datos mejores. Es, además, lamentable no poder disponer de medidas experimentales del peso de los respectivos cromosomas.

Examinando los distintos cruzamientos se ha establecido el orden de los marcadores estudiados. Como ya se ha dicho con anterioridad, el mismo método empleado implica una cierta variabilidad en los resultados por lo que se acepta la sugerencia de Beringer et al. (1978) de que estos datos deben de considerarse con un margen de error del 3 al 5%.

Para los casos en los cuales la ordenación de algunos marcadores era difícil de establecer se empleó el método ya descrito de "análisis de tres factores". Este método permite ordenar perfectamente los marcadores, si bien las distancias entre ellos difieren ligeramente de las determinadas por análisis directo de pares de marcadores. Este método permite ligar los segmentos cromosómicos determinados por análisis directo de pares de marcadores y, como consecuencia, circularizar el mapa y ofrecer una visión global de la composición génica. Hay que resaltar que, si bien el "análisis de tres factores" es imprescindible para la ordenación final de los genes,

resulta poco fiable en el establecimiento de distancias entre marcadores. Como consecuencia para este último punto y en caso de discrepancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos, se han considerado como válidas las distancias determinadas mediante análisis de pares.

Para finalizar y dado que el fruto principal de esta Tesis ha sido la construcción del mapa genético de *R. trifolii*, se ha querido comparar este mapa con los ya existentes de la misma y de distintas especies de *Rhizobium*. Para ello, se ha tomado como base aquellos marcadores cuya posición en el mapa, según estudios hechos en *E. coli* y *S. typhimurium*, es única, bien porque los genes que dan lugar al mismo fenotipo mutante están agrupados o bien porque el fenotipo mutante se asocia unívocamente a un solo gen. Concretamente, los marcadores estudiados han sido *his*, *leu*, *thx*, *thi*, *trp*, *can*, *rif* y *pro*.

De la comparación con el mapa de *R. trifolii* confeccionado por mutagénesis secuencial por Zurkoski y Lorkiewicz (1978) (figura 8), resulta que de los seis marcadores estudiados por estos autores, cinco coinciden en ordenación y posición con los determinados en esta Tesis. La posición del sexto, *arg*, difiere grandemente de uno a otro pero esto puede atribuirse a que se estén

estudiando genes distintos ya que el fenotipo Arg⁻ se puede deber a mutaciones en varios genes no ligados, al menos en *E. coli*.

En la Figura 8 también se comparan los mapas de *R. trifolii* con los de otras especies de *Rhizobium*, tomando como base los marcadores ya mencionados. De los diecisiete marcadores estudiados en esta Tesis, nueve coinciden en ordenación y posición con los determinados en otras especies, otros cinco marcadores (*pdx*, *can*, *thi* y dos *thr*) han sido estudiados por primera vez y por tanto no admiten comparación posible; otros dos (*tyr* y *met*) difieren de los ya descritos y su caso es el mismo del marcador arginina anteriormente mencionado, y un último marcador (*his*) no parece estar en la misma posición que en las otras especies. Resulta interesante el hecho de que la posición propuesta aquí para el marcador histidina coincida con la propuesta por Zurkowski y Lorkiewicz (1978), también en *R. trifolii* y difiera de la encontrada por Kondorosi et al. (1977) y Casadesús y Olivares (1979) en *R. meliloti*. Esto puede deberse bien a que haya una diferencia real en la posición del operon de la histidina en ambas especies, o bien a que, al menos una de ellas, no todos los genes están agrupados en un operon. Esto último implicaría que los genes estudiados en una y otra especie son diferentes.

Otro hecho a resaltar es que en esta Tesis se ha encontrado un ligamiento del 21% entre los marcadores *str* y *rif* claramente inferior al 99% que encontraron Be- ringer et al. (1978) en *R. leguminosarum*, al 73 y 90% de Kondorosi et al. (1977) y Casadesús y Olivares (1979) en *R. meliloti*, respectivamente. Esta divergencia puede deberse a que el marcador *str* aquí estudiado no sea el mismo que el estudiado por estos autores, ya que, según se sabe para *E. coli* (Bachman y Low, 1980) y *S. typhimurium* (Sanderson y Hartman, 1978), la resistencia a la estreptomicina puede estar determinada por, al menos, dos genes distintos separados entre sí en el cromosoma. Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados de Al-Bayatti y Al-Ani (1977) que, mediante mutagénesis secuencial en *R. meliloti*, no encontraron ligamiento entre estos dos marcadores.

La tendencia actual de la investigación de los mapas en *Rhizobium* está encaminada al estudio comparativo de los mismos. Así, Kondorosi et al. (1980) equiparando las distancias genéticas encontradas al aplicar la fórmula de Wu a los mapas de *R. meliloti* (Meade y Signer, 1977; Kondorosi et al., 1977) y de *R. leguminosarum* (Be- ringer et al., 1978) y mediante el análisis de la segregación de R⁺ en las especies indicadas, han establecido la existencia de una correlación efectiva entre los tres

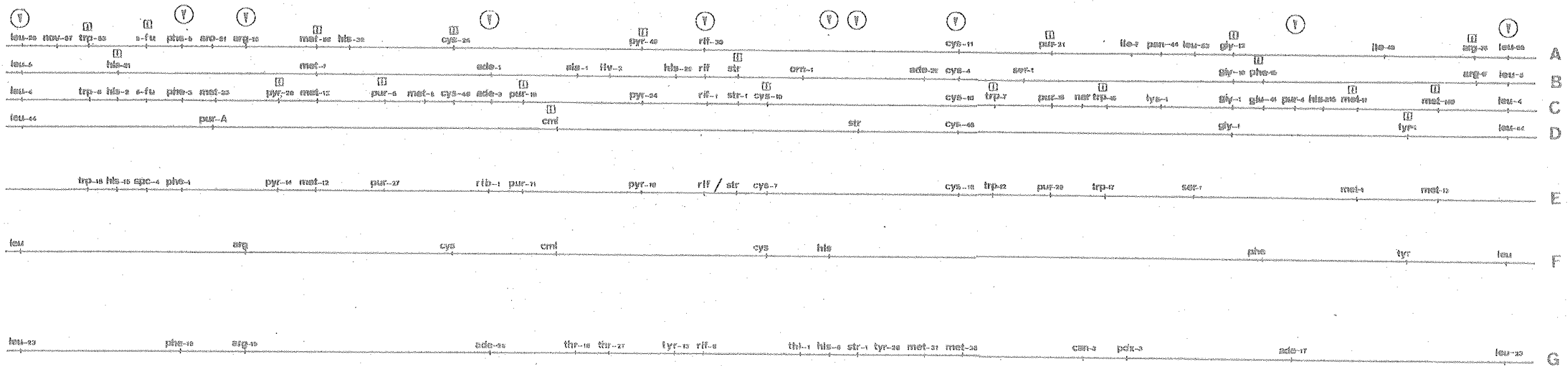
mapas. Además, en líneas generales, los datos aportados por Kondorosi et al. (1980) están de acuerdo con los datos de comparación presentados en esta Tesis para los -mapas indicados. Por lo que se puede deducir que el mapa genético construido en esta Tesis presenta un alto -grado de similitud a los actualmente descritos.

FIGURA 9.- Mapas de ligamiento del género *Rhizobium*.

- A) *R. meliloti* (Meade y Signer, 1977). B) *R. meliloti* (Casadesús y Olivares, 1979). C) *R. meliloti* (Kondorosi et al., 1977). D) *R. meliloti* (Sik et al., 1977). F) *R. leguminosarum* (Beringer et al., 1978). G) *R. trifolii* (Zurkowski y Lorkiewicz, 1978). H) *R. trifolii* (Esta Tesis).

Ⓡ Significa que estos genes tienen correlación con los presentados en esta Tesis.

Ⓛ Significa que estos genes están correlacionados con otros mapas.



APENDICE I. MATERIALES

1. NOMENCLATURA GENETICA

Se siguieron las recomendaciones de Demerec et al. (1966) para los genes cromosómicos y de Novick et al. (1976) para los genes localizados en los plásmidos.

Los genes se designan mediante tres letras (que hacen referencia a la actividad fisiológica que determinan) y un número. Las mutaciones y los alelos se indican mediante el símbolo del gen afectado y el número separado por un guión. En este trabajo se usan las designaciones génicas siguientes:

pro, *met*, *his*, *leu*, *phe*, *ade*, *tyr*, *thr*, *thi*, *pad* y *arg* designan genes de las rutas biosintéticas de los aminoácidos, bases y vitaminas a los que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofia para ese aminoácido, base o vitamina.

can determina la estructura de la permeasa de la arginina. Los mutantes en *can-3* son resistentes a la canavanina, un análogo tóxico de la arginina.

rif, *str* y *cmI* designan genes cuyas mutaciones producen resistencia a rifampicina, estreptomycinina y cloramfenicol, respectivamente.

amp, *kan*, *tet*, *cmI*, *str* y *sr* designan genes cuyas mutaciones dan lugar a resistencia a ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloramfenicol, estreptomycinina y estaño, respectivamente.

En esta Tesis los fenotipos se designan con las mismas o parecidas letras que los genes responsables pero en caracteres redondos y con mayuscula inicial; se usan algunos signos adicionales: + para el alelo silvestre; - para los mutantes; los superíndices R y S indican resistencia y sensibilidad a un inhibidor, respectivamente.

2. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS

Las estirpes de *E. coli* y *P. fluorescens* y plásmidos utilizados en esta Tesis provienen de las colecciones de:

- Royal Postgraduate School, London (RPS)
- John Innes Institute, Colney Lane, Norwich (JII)
- Departament of Genetics, Monash University, Clayton, Victoria (DGMU).

En la Tabla XXVI se relacionan los plásmidos utilizados en esta Tesis.

TABLA XXVI- Relación de plásmidos utilizados en esta Tesis

Nombre	Fenotipo que confiere	Grupo de compatibilidad	Origen
RP1	Ap ^R Km ^R Tc ^R	P1	RPS
RP4	Ap ^R Km ^R Tc ^R	P1	RPS
R68.45	Ap ^R Km ^R Tc ^R	P1	DGMU
R1drd19	Ap ^R Km ^R Cm ^R Sm ^R Sn ^R	F	DGMU

En la Tabla XXVII se indican las estirpes obtenidas durante la realización de esta Tesis. La estirpe RS55 - se aisló de nódulos de *Trifolium repens* según se describe en Métodos, apartado 1; y es de la que proceden todos los mutantes utilizados en este estudio. El origen de cada una se especifica dando la estirpe de la que procede, el mutageno utilizado (MNNG = tras tratamiento con nitrosoguanidina; EMS = tras tratamiento con metanosulfonato de etilo; NO₂H tras tratamiento con ácido nitroso y UV = tras exposición a la luz ultravioleta) o el cruzamiento del que deriva. En este último caso constan las

estirpes parentales separadas por el signo x para indicar cruzamiento.

En las estirpes que son portadoras de algún plásmido, se indica el nombre de este entre paréntesis y a -- continuación del nombre de la estirpe.

TABLA XXVII. Relación de estirpes bacterianas utilizadas en esta Tesis

Nombre	Nombre Original	Genotipo o Fenotipo	Origen
2.1 No originales			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
PS10	PF0154(RP1)	<i>met pro</i>	RPS
<i>Escherichia coli</i>			
ES3	J5-3(RP4)	<i>met pro</i>	JII
ES5	J5-3(R1drd19)	<i>met pro</i>	JII
ES8	1230(R68.45)	<i>met pro</i>	JII
2.2 Originales			
<i>Rhizobium trifolii</i>			
RS55		Silvestre	Aislado de <i>T. repens</i>
RS140		<i>rif-6</i>	Espontáneo
RS164		<i>his-14</i>	MNNG

TABLA XXVII. (continuación)

Nombre	Nombre original	Genotipo o Fenotipo	Origen
RS176		<i>str-1</i>	Espontáneo
RS213		<i>leu-44 str-1</i>	EMS
RS225		<i>his-6 str-1</i>	EMS
RS235		<i>his-6 met-36 str-1</i>	MNNG
RS238		<i>his-6 phe-18 str-1</i>	MNNG
RS241		<i>ade-17 rif-6</i>	EMS
RS246		<i>ade-29 rif-6</i>	EMS
RS251		<i>rif-6 str-1</i>	Espontáneo
RS271		<i>leu-23 str-1</i>	MNNG
RS288		<i>his-6 tyr-28 str-1</i>	MNNG
RS290		<i>his-6 thr-14 str-1</i>	MNNG
RS291		<i>his-6 thi-9 str-1</i>	MNNG
RS292		<i>his-6 pdx-2 str-1</i>	MNNG
RS293		<i>ade-29 tyr-13 rif-6</i>	MNNG
RS294		<i>ade-29 thr-27 rif-6</i>	MNNG
RS295		<i>ade-29 arg-19 rif-6</i>	MNNG
RS296		<i>his-6 met-31 str-1 can-3</i>	EMS
RS230(R68.45)		<i>his-6 str-1</i>	ES8xRS225
RS256(R68.45)		<i>rif-6 str-1</i>	ES8xRS251
RS278(R68.45)		<i>ade-17 rif-6</i>	ES8xRS241

Según se comprobó tras su aislamiento y caracterización, las estirpes RS140 y RS176 mantienen la capacidad infectiva.

3. PRODUCTOS QUIMICOS

3.1. *Antibióticos*

Se utilizaron a las siguientes concentraciones finales en el medio de cultivo:

Sulfato de estreptomicina (Sigma).....	1 g/l
Sulfato de kanamicina (Sigma).....	25mg/l
Oxitetraciclina (Antibióticos S.A.)....	10mg/l
Rifampicina (Sigma y Le Petite).....	20mg/l
Ampicilina (Beecham).....	10mg/l
Cloramfenicol (Sigma).....	5mg/l

Se disolvieron previamente en agua, menos la rifampicina que fué disuelta en metanol, y se esterilizaron por filtración utilizando membranas Sartorius de 0,45 μ de diametro de poro.

3.2. *Otros productos*

Canavanina (sulfato de L-canavanina), Sigma Chemi--

cal Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Metanosulfonato de etilo, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Nitrito sódico, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

4. TAMPONES

4.1. *Tampón tris-maleato*

Preparado según Gomori (1955). Una solución 0,2M - de tris-maleato (solución A) se diluyó hasta 0,05M, mediante adición de una solución de OHNa 0,02M (solución B) y de agua destilada en las proporciones adecuadas para cada pH. De esta forma se prepararon tampones a pH 5,5 y 7,4. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

4.2. *Tampón M9*

Se preparó mezclando 100 ml de solución concentra-

da diez veces de solución M9 con 10 ml de Sulfato magnésico (0,01M), 10 ml de Cloruro cálcico (0,01M) y 880 ml de agua destilada estéril.

La solución M9 consta de:

K_2HPO_4	60 g
KH_2PO_4	30 g
NaCl.....	5 g
NH_4Cl	10 g
Agua destilada.....	csp 1000 ml

Se disolvió en el orden indicado y se ajustó a pH 7.0.

4.3. *Tampón fosfato*

Se prepararon dos soluciones: Solución A (NaH_2PO_4 , 0,2M) y solución B (Na_2HPO_4 , 0,2M).

El pH deseado (pH 8,0) se consiguió mezclando 5,3 ml de la solución A con 94,7 ml de la solución B y se completó con agua destilada hasta 200 ml. Esta mezcla se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

4.4. *Tampón acetato*

Se prepararon dos soluciones: Solución A (ácido acético 0,2M) y solución B (acetato sódico 0,2M).

El valor de pH deseado (pH 4,5) se consiguió mezclando 30,5 ml de la solución A con 19,5 ml de la solución B y completando con agua destilada hasta 100 ml. Esta mezcla se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

5. MEDIOS DE CULTIVOS PARA BACTERIAS

El medio base para el aislamiento y conservación en el laboratorio de las estirpes de *Rhizobium* fué el medio YT descrito por Beringer (1974), que consta de:

Triptona (Oxoid).....	5,0 g
Extracto de levadura (Oxoid)..	3,0 g
CaCl ₂ x 6H ₂ O.....	1,3 g
Agua destilada.....	1000 ml

El pH se ajustó a 7,0 y el medio se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Para los tratamientos mutagénicos con nitrosoguanidina en medio de cultivo, se empleó el medio VS descrito por Vincent (1970), cuya composición es:

Sacarosa.....	2,50	g
K_2HPO_4	0,50	g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,20	g
$CaSO_4$	0,16	g
NaCl.....	0,10	g
$FeCl_3$	0,02	g
Extracto de levadura (Oxoid)	0,50	g
Agua destilada.....	1000	ml

El pH se ajustó a 7,2 y se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Como medio mínimo (MM) se empleó tampón M9 suplementado con glucosa (Oxoid) al 1,7% y biotina a una concentración final de 12 ug/ml. Este medio tiene un pH de 7,0 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 10 g/l de agar (Oxoid) a los medios líquidos.

Los requerimientos y/o los antibióticos, en soluciones previamente esterilizadas por filtración, se añadieron al medio estéril mantenido en subfusión a 45°C, para obtener las concentraciones siguientes:

Aminoácidos..... 40 mg/l

Bases.....	20 mg/l
Vitaminas.....	10 mg/l
Antibióticos.....	Según se indica en

Materiales, apartado 3.1.

Para la obtención de los mutantes resistentes a la canavanina, se empleó el medio mínimo (MM), suplementado con todos los aminoácidos menos la arginina y 80 mg/l de canavanina (Sigma).

6. SOLUCION NUTRITIVA PARA *TRIFOLIUM ALEJANDRINUM*

Los experimentos de infectividad se realizaron utilizando cultivos hidropónicos de trebol (*Trifolium alejandrinum*). Estos cultivos se llevaron a cabo en solución nutritiva de Hewitt (1952) cuya composición es la siguiente:

K_2SO_4	0,30	g
$CaCl_2$	1,41	g
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,20	g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,36	g
Citrato férrico.....	0,02	g
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,002	g
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,003	g

Solución de Hewitt (continuación)

ZnSO ₄	0,003	g
H ₃ BO ₃	0,018	g
Na ₂ MoO ₄	0,00035	g
Agua destilada.....	1000	ml

Esta mezcla se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

APENDICE II. METODOS

I. PRUEBA DE INOCULACION

Las semillas de *Trifolium alexandrinum* se esterilizaron con cloruro mercúrico según la técnica descrita por Vincent (1970) y germinadas en condiciones estériles. Para ello, se colocaron sobre placas agar-agua (10g/l) y se mantenían en oscuridad a 28°C hasta que las radículas poseían uno o dos centímetros de longitud. Para los cultivos hidropónicos se empleó la técnica descrita por Olivares (1964) que consiste en: Una vez que las plántulas han alcanzado uno o dos centímetros de longitud, se trasladan asépticamente a tubos de 20x200 mm que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro, a razón de 5 plántulas por tubo. Es aconsejable -- quitar previamente los restos de la cubierta de la semilla utilizando unas pinzas flameadas. Cada prueba de nodulación requiere un mínimo de 7 tubos.

La mitad inferior de los tubos se recubre con papel mate de color oscuro para evitar la luz directa sobre las raíces. Las plántulas se incuban a 25°C duran-

te 20 a 25 días en los que se someten a un ciclo de luz (16h) - oscuridad (8h). Transcurido este tiempo se considera que las plántulas se hallan en condiciones de -- ser inoculadas.

Cinco de los tubos se inocularon con dos mililitros por tubo de una suspensión de bacterias que contenía al rededor de 1×10^9 células/ml. Los dos tubos restantes se dejaron como testigo. Transcuridos 15 días a partir de la inoculación, se observó la aparición o no de nódulos.

2. AISLAMIENTO DE *RHIZOBIUM* A PARTIR DE NODULOS

Los nódulos de *Trifolium repens* después de lavados con agua, se desinfectaron externamente sumergiendolos durante 3 minutos en una solución de cloruro mercúrico al 0,1%. Seguidamente se lavaron varias veces con agua estéril, se trituraron asépticamente y tomando con asa de platino del líquido lechoso obtenido, se sembró en placa sobre medio YT adicionado de violeta cristal a la concentración de 1/80.000 p/v. En este medio no crecen hongos ni bacterias Gram (+). Los rizobios que crecen -- se distinguen del resto de las Gram (-) en que no concentran el colorante.

3. CULTIVOS DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO

Los cultivos líquidos se inocularon con una colonia bacteriana y se incubaron a 28°C con aireación durante 48 horas. A continuación se diluyeron en medio nuevo y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 2×10^8 células por mililitro, tomando medida de la densidad óptica a 450 nm con un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic-20".

4. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS

Después de efectuar las diluciones adecuadas en tampón M9, se tomaron muestras que se esperaba que contuviesen 100-200 u.f.c. (unidad formadora de colonia) y se extendieron en placas con medio YT, incubándolas a 28°C durante tres días. Para cada determinación se sembraron tres placas y se hizo el promedio de ellas.

5. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada -

(1 mg/ml) y se prepararon tubitos que contenían 1 ml. Se guardaron congelados en oscuridad hasta el momento de ser usados y en ningún caso se volvieron a congelar.

5.1. *En tampón*

Se utilizó la técnica descrita por Cerda-Olmedo et al. (1968), adaptada a *R. trifolii*. El cultivo de bacterias en fase exponencial se lavó dos veces por centrifugación con tampón M9 y se concentró 10 veces en tampón tris-maleato, pH 5,5 ó 7,4. se añadió la nitrosoguanidina a las concentraciones finales indicadas en cada caso y se incubó a 28°C, en oscuridad y sin aireación. Después del tratamiento las células se lavaron dos veces con tampón M9.

5.2. *En medio de cultivo*

El tratamiento en medio de cultivo fué en todo similar al utilizado en tampón con la diferencia de que no se lavó previamente al tratamiento, sino que solamente se concentró 10 veces en medio fresco.

6. TRATAMIENTO CON METANOSULFONATO DE ETILO

Un cultivo bacteriano que contenía alrededor de 4×10^8 células/ml se lavó dos veces con tampón fosfato pH 8,0 y se resuspendió finalmente en el mismo tampón. Se añadió metanosulfonato de etilo hasta una concentración final de 0,1M y se incubó a 28°C sin agitación durante el tiempo indicado en cada caso. Para detener la reacción se añadió tiosulfato sódico a una concentración del 6% p/v. Seguidamente se lavó con tampón fosfato pH 7,0.

7. TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA

El cultivo en fase exponencial se centrifugó y resuspendió en tampón M9, exponiéndose a la acción de los rayos ultravioletas emitidos por una lámpara germicida Sylvania de 15 W. Los tratamientos tuvieron lugar en una placa de Petri abierta con agitación magnética y a una distancia de 50 cm de la lámpara que se mantuvo encendida aproximadamente una hora antes del tratamiento.

A diversos tiempos se tomaron muestras sin apagar la lámpara de luz ultravioleta para sembrarlos en los medios correspondientes. Las siembras se llevaron a ca

bo bajo luz amarilla y la incubación fué en oscuridad y a 28°C.

8. TRATAMIENTO CON ACIDO NITROSO

Un cultivo que contenía unas 2×10^8 células/ml, - se lavó con tampón acetato pH 4,6 y se resuspendió concentrandolo 20 veces en el mismo tampón. Se trató con nitrito sódico a una concentración final de 0,05M, durante el tiempo que se especifica en cada caso. Seguidamente se le añadió tampón fosfato a pH 7,0 para detener la reacción. Se efectuaron las diluciones oportunas y se sembraron en los medios correspondientes.

9. AISLAMIENTO DE MUTANTES

9.1. *Aislamiento de mutantes resistentes a antibióticos y a análogos de aminoácidos*

Para la obtención de mutantes resistentes a antibióticos (cloramfenicol, rifampicina y estreptomycin) y a análogos de aminoácidos (canavanina), se empleó el medio YT menos en el caso de la canavanina que se empleó el medio que se indica en Materiales, apartado 5. Los -

medios se adicionaron del producto adecuado y a las concentraciones que se indican en Materiales, apartado 3.1.

En el caso de la obtención de mutantes espontáneos se partió de un cultivo en fase estacionaria de bacterias con una concentración aproximada de 10^9 células/ml. El factor de dilución empleado en cada caso dependió de la frecuencia de aparición de cada uno de los mutantes - que se buscaba.

Estas frecuencias fueron en el caso de la rifampicina de 1×10^{-8} , de la estreptomycinina 1×10^{-7} y del --cloramfenicol de 1×10^{-7} .

Cuando lo que se buscaban eran mutantes resistentes al cloramfenicol inducidos por algún agente, la siembra en el medio con el antibiótico se realizó después del -tratamiento y efectuando las diluciones apropiadas según el caso.

9.2. Aislamiento, purificación y caracterización de los mutantes auxótrofos

Las colonias que habían crecido en medio YT tras -los distintos tratamientos mutagénicos, se replicaron -mediante palillos de dientes estériles a placas que con

tenían medio mínimo. Las colonias supuestamente auxótrofas se purificaron tres o cuatro veces como garantía de homogeneidad genética.

La caracterización de los auxótrofos se llevó a cabo siguiendo el esquema de Holliday (1956) modificado para *R. trifolii*. Cada colonia que crece en el medio YT y no crece en el medio mínimo es, por definición, auxótrofa; ahora bien, para saber que requerimiento específico precisa se prueba en placas con medio mínimo suplementadas con diferentes mezclas de aminoácidos, bases y vitaminas según se muestra en la Tabla XXVIII. Si un auxótrofo es capaz de crecer en dos de estos medios, es porque requiere el producto que aparece en ambos. Cada uno de los once medios contiene medio mínimo más los suplementos indicados en la fila o columna correspondientes.

9.3. Selección de mutantes auxótrofos por el método de la penicilina

En los casos en los que, debido a la baja eficacia del tratamiento mutagénico, no se encontraba un número significativo de auxótrofos, se utilizó el método de selección con penicilina (Lederberg y Lederberg, 1952) --

TABLA XXVIII. Requerimientos empleados para la busca de auxótrofos según el test de Holliday modificado.

=====

Placa n°	1	2	3	4	5	6
7	ala	gly	val	met	cis	asp
8	glu	gln	phe	trp	ser	ile
9	lys	his	tyr	arg	thr	leu
10	asn	pro	A	G	C	U
11	pdx	pan	thi	fol	orn	T

adaptado a *R. trifolii*.

Tras el tratamiento, se resuspendió el cultivo en medio líquido YT y se incubó durante un tiempo equivalente a 5 ó 6 generaciones. Con esto se pretendía que los mutantes obtenidos pudieran multiplicarse y no llevasen enzimas provenientes de sus progenitores. Seguidamente, el cultivo se lavó y se centrifugó dos veces y se resuspendió en medio mínimo a una concentración no superior a 10^7 células/ml. Este cultivo se incubó durante dos horas en aireación y entonces se añadió penicilina (1000 U/ml). Se incubó durante un tiempo equivalente a tres generaciones y seguidamente se se lavó dos veces y se resuspendió en medio fresco conteniendo penicilina. Se incubó durante un tiempo equivalente a siete generaciones. Entonces se lavó dos veces, se resuspendió y se sembró en cajas conteniendo medio YT.

10. CONJUGACION ININTERRUMPIDA

Se utilizó la técnica descrita por Jacob et al. -- (1976). El método consiste en mezclar dos cultivos, uno de células donadoras y otro de células receptoras, que contengan al menos unas 10^8 células/ml. Se mezclan volúmenes iguales de ambos cultivos. Se toma una alicuo-

ta de esta mezcla y se siembra, con la dilución adecuada, en medio selectivo para el donador. Con esto se pretende determinar el número real de células viables del donador, número que se utilizará posteriormente en la estimación de la frecuencia de transferencia del plásmido que se trate. Seguidamente, la mezcla conjugante se filtra a través de una membrana Sartorius de $0,45 \mu$ de diametro de poro. Las membranas que contienen la mezcla conjugante, se colocan en un soporte de agar y se incuban durante 24 horas a 28°C . Pasado este tiempo, se recoge la muestra en 5 ml de tampón M9 y, previa dilución, se siembran en placas que contienen el medio selectivo para los trasconjugantes que se especifica en cada caso.

APENDICE III. BIBLIOGRAFIA

- ACHTMAN, M., WILLETTS, N.S. y CLARK, A.J. (1971) *J. Bacteriol.*, 106, 529-538.
- ACHTMAN, M., WILLETTS, N.S. y CLARK, A.J. (1972) *J. Bacteriol.*, 110, 831-842.
- ACHTMAN, M. (1973) *Genet. Res.*, 21, 67-77
- ACHTMAN, M., KENNEDY, N. y SKURRAY, R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5104-5108.
- ACHTMAN, M., SKURRAY, R.A., THOMPSON, R., HELMUTH, R., HALL, S., BEUTIN, L. y CLARK, H.J. (1978d) *J. Bacteriol.*, 133, 1383-1392.
- ADACHI, H., NAKANO, M., INUZUKA, M. y TOMOEDA, M. (1972) *J. Bacteriol.*, 109, 1114-1124.
- AKIBA, T. (1959) *Proc. 15th Gen. Assem. Japan. Med. Assoc.*, 5, 299-305.
- AKKERMANS, A. D.L., ABDULKADIR, S. y TRINICK, M.S. (1978) *Nature*, 274, 190
- AL-ANI, F.Y. (1976) *Bull. Coll. Sci.* Vol. 17, N. 2, 33-38.
- AL-ANI, F.Y. (1979) *Zbl. Bakt. II. Abt.* 134, 301-309.

- AL-BAYATTI, K. y AL-ANI, F. (1977) *Bull. Coll. Sci.*, 18 (1), 194-203.
- ANDERSON, E.S. y LEWIS, M.T. (1965) *Nature*, 208, 843-849.
- ANDERSON, E.S. (1968) *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 131-180.
- BACHMANN, B.J. y LOW, K.B. (1980) *Microbiological Rev.*, 44(1), 1-56.
- BALASSA, R. (1960) *Nature*, 188, 246.
- BALASSA, R. y GABOR, M. (1961) *Mikrobiologya*, 30, 457.
- BALASSA, R. (1963) *Bacteriol. Rev.*, 27, 228.
- BEARD, J.P. y BISHOP, S.F. (1975) *J. Bacteriol.*, 123, 916-920.
- BEDMAR, E. J. y OLIVARES, J. (1980) *Mol. gen. Genet.*, 177, 329-331.
- BERINGER, J.E. (1974a) *J. Gen. Microbiol.*, 84, 188-198
- BERINGER, J.E. (1974b) *Nature*, 264, 291.
- BERINGER, J.E. y HOPWOOD, D.A. (1976) *Nature*, 264, 291-294.
- BERINGER, J.E., JOHNSTON, A.W.B. y WELLS, B. (1977) *J. Gen. Microbiol.*, 98, 339.
- BERINGER, J. E. (1978) *Nature*, 276, 633-634.

BERINGER, J. E., HOGGAN, S.A. y JOHNSTON, A.W.B. (1978) J. Gen. Microbiol., 104, 201-207.

BERINGER, J.E., BEYNON, J.L., BUCHANAN-WOLLASTON, A.V. y JOHNSTON, A.W.B. (1978b) Nature, 276, 633-634.

BERINGER, J.E. (1980) J. Gen. Microbiol., 116, 1-7

BOULNOIS, J,S, y WILKINS, B.M. (1978) J. Bacteriol., 133, 1-9.

BRADLEY, D.E. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., 57, 893-900.

BREFORT, G.M., MAGOT, H., IONESCO, H. y SEBALD, M. - (1978) In *Microbiology*. Ed. D. Schlessinger, ASM, WASHINGTON, D.C.

BREWIN, N.J., BERINGER, J.E., BUCHANAN-WOLLASTON, A.V., JOHNSTON, A.W.B. y HIRSCH, P.R. (1980) J. Gen. Microbiol., 116, 261-270.

BREWIN, N.J., JOHNSTON, A.W.B. y BERINGER, J.E. (1980) - Annual Proceeding of the Phytochemical Society of Europe (en prensa)

BRINTON, C.C., GEMSKI, P. y CARNHAN, J. (1964) Proc. - Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 776-783.

BRODA, P. (1979) *Plasmids* W.H. Freedman y comp. Oxford y San Francisco.

BRODT, P., LEGGETT, F. y IYER, R. (1974) Nature, 249, - 856-858.

BUCHANAN- WOLLASTON, V. (1979) *J. Ge. Microbiol.*, 112, 135-142.

BUKHARI, A.J.; SHAPIRO, J. y ADHYA, S. (1977) *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York.

BURKARDT, H.J., RIEB, G. y PUHLER, A. (1979b) *J. Ge. Microbiol.*, 114, 341-348.

CAMPBELL, A., BERG, D., LEDERBERG, E., STARLINGER, P., - BOTSTEIN, D., NOVICK, R. y SZYBALSKI, W. (1977) *DNA insertion of transposable elements in Prokaryotes*. Ed. Bukhari.Shapiro.Adhya. Cold Spring Harbor, p. 15.

CANNON, F.C., DIXON. R.A., POSTGATE, J.R., PRIMROSE, S. B. (1974a) *J. Gen. Microbiol.*, 80, 227.

CARLBERG, D.N. (1976) *Essentials of bacterial and viral genetic*. C. Thomas. Publ.

CASADESUS, J. Y OLIVARES, J. (1978) *J. Bacteriol.*, 139(1), 316.

CASADESUS, J. y OLIVARES, J. (1978) *Anal. Edaf. Agrobiol.*, 37, 915-942.

CASADESUS, J. y OLIVARES, J. (1979) *Molec. gen. Genet.*, 174, 203-209.

CAVALLI, L.L., LEDERBERG, J. y LEDERBERG, E.M. (1953) *J. Gen. Microbiol.*, 8, 89-103.

CAVIEDES, M.A., MEGIAS, M., PALOMARES, A. y ROMERO, P. - (1980) *Arch. of Microbiology*, (en prensa).

CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1967) Biochem. Biophys. Acta, 142, 450-464.

CERDA-OLMEDO, E., HANAWALT, P.C. y GUEROLA, N. (1968) J. Mol. Biol., 33, 705.

CHANDLER, P.M. y KRISHNAPILLAI, V. (1974) Genet. Res., 23, 251-257.

CHILTON, M.A., FARRAND, S.K., LEVIN, R. y E.W. NESTER (1976) Genetics, 83, 609-618.

CLEWELL, D.B. y HELINSKI, D.R. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 62, 1159-1166.

CLEWELL, D. y HELINSKI, D. (1970) Biochemistry, 9, 4428-4440.

CLEWELL, D. y HELINSKI, D. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 150-156.

CLEWELL, D.B., EVENCHIK, B. y CRANSTON, J.D. (1972) Mature New Biol., 237, 29-31.

CLOWES, R.C. y MOODY, M. (1966) Genetics, 53, 717-726.

CLOWES, R. (1972) Bacteriol. Rev., 36, 361-405.

COHEN, S. y MILLER, C. (1970) J. Mol. Biol., 50, 671-687.

COHEN, S. y MILLER, C.A. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 67, 510-516.

COHEN, S.N., SILVER, R.P., SHARP, P.A. y MCCOUBREY, A.E. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci., 182, 172-187.

- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y. y HSU, H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 69, 2110.
- COHEN, S.N. y CHANG, A.C.Y. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70, 1293-1297
- COHEN, S.N. y SHAPIRO, J.A. (1980) Sci. Am., 242(2), 36-45.
- COLE, M.A. y ELKAN, G.H. (1973) Antibicrob. Chemether, - Agents, 4, 248.
- CRAWFORD, E.M. y GESTELAND, R.F. (1964) Virology, 22, - 165-167.
- CURTISS III, R. y RENSHAW, J. (1969) Genetics, 63, 39-52.
- BALLMANN, G., OROSZ, L. y SAIN, B. (1979) Molec. gen. Genet., 176, 439-448.
- DALLMANN, G., OLASZ, F y OROSZ, L. (1980) Molec. gen. - Genet., 178, 443-446.
- DATTA, N. y HEDGES, R. W. (1971) Nature, 234, 222-223.
- DATTA, N., HEDGES, R.W., SHAW, E.J., SYKES, R.B. y RICHMOND, M.H. (1971) J. Bacteriol., 108, 1124.
- DATTA, N y HEDGES, R. W. (1972) J. Gen. Microbiol., 70, 453-460.
- DAVIES, J.E. y ROWND, R.H. (1972) Science, 176, 758-768.
- DEMEREC, M., ADELBERG, E.A., CLARK, A.J. y HARTMAN, P.E.

(1966) *Genetics*, 54, 61-71.

DENARIE, J, y TRUCHET, G. (1974) *Proc. Ist. Int. Symp. Nitrogen Fixation*. Ed. Newton. Nyman. Washington State Univ. Press. p.343.

DENARIE, J., TRUCHET, G. y BERGERON, B. (1975) *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. ed. P.S. Nutman. Cambridge University Press. 47-63.

DIXON, R.A. (1974) *Nature*, 260, 268.

DIXON, R., CANNON, F y KONDOROSI, A (1976) *Nature*. 260 (5548), 268-271.

DOCTOR, F y MODI, V.V. (1976) *J. Bacteriol.*, 126(2), 997-998.

DUNCAN, C. L., ROKOS, E.A., CHRISTENSON, C.M. y ROOD, J.I. (1978) In *Microbiology*. Ed. D. Schlessinger. ASM. Washington, D.C.246-248.

DUNICAN, L.K. y TIERNEY, A. B. (1973) *Molec. gen. Genet.* 126, 187-190.

DUNICAN, L.K. y A.B. TIERNEY (1974) *Biochem. Biophys. - Res. Commum.*, 57(1), 62.

DUNICAN, L.K., O'GARA, F. y TIERNEY, A.B. (1976) *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Ed. Nutman. Cambridge - Univ. Press, p.77.

EHRlich, P (1907) *Ber. Klin. Wochschr.*, 44, 233-236

- EVENCHIK, Z., STACEY, K.A. y HAYES, W. (1969) J. Gen. Microbiol., 56, 1-14.
- FALKOW, S., CITARELLA, R.V., WOHLHEITER, J.A. y WATANABE, T. (1966) J. Mol. Biol., 17, 102-116.
- FALKOW, S., TOMPKINS, L.S., SILVER, R.P., GUERRY, P. y LEBLANC, D.J. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci., 182, 153-171.
- FALKOW, S., GUERRY, P., HEDGES, R.W., y DATTA, N. (1974) J. Gen. Microbiol., 85, 65-76.
- FALKOW, S. (1980) In *Plasmids and Transposons. Environmental effects and maintenance mechanisms*. Ed. Colin - Stuttard Kenneth R. Rozee. Academic Press, p 225-227
- GRAHAM, P.H. (1964) J. Gen. Microbiol., 35, 511.
- GRAHAM, P.H. (1976) In *Symbiotic Nitrogen Fixation in plants*. Ed. Nutman. Cambridge University Press. p.99.
- GOMORI, G. (1955) In *Methods in enzymology*. Vol. I, pp 138-146. (S.P. Cadowick y N.D. Kaplan, eds.) Academic - Press, New York.
- GUERRY, P. y FALCOW, S. (1971) J. Bacteriol., 107, 372-374.
- GUYER, M.S. (1978) J. Molec. Biol., 126, 347-365.
- HAAS, D. y HOLLOWAY, B.W. (1976) Molec. gen. Genet., 144, 243-251.
- HAAS, D. y HOLLOWAY, B.W. (1978) Molec. Gen. Genet., 158, 229-237.

- HAHN, F.E. y CIAK, __. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci., 182, 295-304.
- HAMADA, S.E., LUCHEY, J.P. y FARRAND, S.K. (1979) J. Bacteriol., 139, 280-286.
- HAQUE, H. (1979) Molec. gen. Genet., 171, 107-109.
- HASHIMOTO, H., KONO, M. y MITSUHASHI, S. (1964) J. Bacteriol., 88, 261-262.
- HASHIMOTO, H. y HIROTO, Y. (1966) J. Bacteriol., 91, 51-62.
- HASHIMOTO, H. y MITSUHASHI, S. (1966) J. Bacteriol., 92, 1351-1356.
- HASUDA, K., KRCMERY, V., IYOBE, S. y MITSUHASHI, S. (1975) J. Bacteriol., 123, 29-335.
- HAYES, W. (1953) J. Gen. Microbiol., 8, 72-88.
- HAYES, W. (1968) *The genetics of bacteria and their viruses*. 2ª edición. Blackwell.
- HEDGES, R. W. (1974) J. Gen. Microbiol., 81, 171-181.
- HEDGES, R. W. y JACOB, A.E. (1974) Mol. Gen. Genet., - 132, 31-40.
- HEDGES, R.W., JACOB, A.E., CRAWFORD, I.P. (1977) Nature, 267, 283-284.

- HEFFRON, F., RUBENS, C. y FALCOW, S. (1977) In *DNA insertion elements, plasmids y episomes*. Ed. Bukhari. Shapiro. Adhya. Cold Spring Harbor. p. 151.
- HELINSKI, D.R. y CLEWELL, D.B. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 899-942.
- HELINSKI, D. R. (1973) *Ann. Rev. Microbiol.*, 27, 437-470.
- HELINSKI, D.R. (1976) *Federation proceedings*, 35(9), 2024-2025.
- HELINSKI, D.R. (1976) *Federation proceedings*, 35(9), 2026-2029.
- HELMUTH, R. y ACHTMAN, M. (1975) *Nature*, 257, 652-656.
- HELMUTH, R. y ACHTMAN, M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 75, 1237-1241.
- HELLRÄGER, H. y WILFARTH, H. (1978) *Beilage zuder Ztschr. Ver. Rubenzucker-Ind., dtsh Reibhs.*
- HEUMANN, W (1968) *Molec. gen. Genet.*, 102, 132-144.
- HEUMANN, W, PUHLER, A. y WAGNER, E. (1971) *Molec. gen. Genet.*, 113, 308-315.
- HEUMANN, W (1972) *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* A220, 335-342.
- HEUMANN, W., PUHLER, A. y WAGNER, E. (1973) *Molec. gen.*

Genet., 126, 267-274.

HEUMANN, W., KAMBERGER, W., PUHLER, A., ROSCH, A., SPRINGER, R. y BURKARDT, H.J. (1974) Proc. Ist. Int. Symp. Nitrogen Fixation. Ed. Newton. Nyman. Washington state. Univ. Press. p. 383.

HEUMANN, W y SPRINGER, R. (1977) Molec. gen. Genet., -- 150, 73-79

HEUMANN, W. (1979) Curr. topics in microbiol. and inmuniol., 88, 1-23.

HEWITT, E. J. (1952). Tech. Comm. 22, Commonwealth Agrice Bureau

HIGASHI, S.(1967) J. Gen. Applied Microbiol., 13, 391--407.

HIRSCH, P.R. (1979) J. Gen, Microbiol., 113(2), 219-228.

HOLLIDAY, R. (1956) Nature, 178, 1987.

HOLLOWAY, B.W. (1969) Bacteriological Rev., 33, 419-443.

HOLLOWAY, B.W. (1978) J. Bacteriol., 133, 1078-1082.

HOLLOWAY, B.W. (1979) Plasmid, 2, 1-19.

HOLLOWAY, B.W., HAAS, D. y MORGAN, A.F. (1979a) In *Microbiol drug resistance*, Vol. II (ed. S. Mitsuhashi) pp. - 134-150. Tokyo: Japanesse Scientific Societies Press.

HUBERMAN, J.A. y RIGGS, A.D. (1968) J. Mol. Biol., 32, 327-341.

HUMPHREYS, G.O., GRINDLEY, N.D.F. y ANDERSON, E.S. (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, 287, 355-360.

INGRAM, L.C. (1973) *J. Bacteriol.*, 115, 1130-1134.

INGRAM, L.C., ANDERSON, J.D., ARRAND, J.E. y RICHMOND, M. H. (1974) *J. Med. Microbiol.*, 7, 251-257.

IPPEN-IHLER, K., ACHTMAN, M. y WILLETTS, N.S. (1972) *J. Bacteriol.*, 110, 857-863.

JACOB, A.E. y GRINTER, N.J. (1975) *Nature* 255, 804.

JACOB, A.E., CRESSWELL, J.M., HEDGES, R.W., COETZEE, J. N. y BERINGER, J.E. (1976) *Molec. gen. Genet.*, 147, 315-323.

JESSBERGER, B., PUHLER, A y HEUMANN, W. (1974) *Zbl. - Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* A228, 162-167.

JOHNSTON, J.H. y RICHMOND, M.H. (1970) *J. Gen. Microbiol.* 60, 137-139.

JOHNSON, E. M., PLACEK, B.P., SNELLING, N.J., BARON, L. S. *J. Bacteriol.*, 123, 1.

JOHNSTON, A.W.B. y BERINGER, J.E. (1977) *Nature*, 267, - 611-613.

JOHNSTON, A.W.B., BIBB, M.J. y BERINGER, J.E. (1978) *Molec. gen. Genetic.*, 165, 323-330.

JOHNSTON, A.W.B., SUE, M., SETCHELL, M. y BERINGER, J.E. (1978) *J. Gen. Microbiol.*, 104, 209-218.

- JULLIOT, S. y BOISTARD, P (1979) *Molec. gen. Genet.*, 173, 289-298
- KASAMATSU, H. y ROWND, R. (1970) *J. Mol. Biol.*, 51, 473-489.
- KATSUMATA, R., HASHIMOTO, H. y MITSUHASHI, S. (1975) *J. Bacteriol.*, 123, 314.
- KAUSHIK, B.D. y VENKATARAMAN, G.S. (1972) *Folia microbiologica*, 17, 393-395.
- KEMPER, J. (1974) *J. Bacteriol.*, 117, 94-99
- KHATOON, H., IYER, R.V. y IYER, V.W. (1972) *Virology*, 48, 145-155.
- KISS, G.B., VINCZE, E., KALMAN, Z., FORRAI, T. y KONDOROSI, A. (1979) *J. Gen. Microbiol.*, 113, 105-118
- KISS, G, DOBO, K., DUSHA, I, BREZNOVITS, A., OROSZ, L., VINCZE, E. y KONDOROSI, A. (1980) *J. Bacteriol.*, 141(1), 121-128.
- KLECZKOWSKA, J. (1965) *J. Gen. Microbiol.*, 40, 377.
- KLINE, B.C. y HELINSKI, D.R. (1971) *Biochemistry*, 10, 4975-4980.
- KONDOROSI, A, KISS, G.B., FORRAI, T, VINCZE, E. y BANFALVI, Z. (1977) *Nature*, 268, 525-528.
- KONDOROSI, A, VINCZE, E., JOHNATON, A.W.B. y BERINGER, J.E. (1980) *Molec. gen. Genet.*, 178, 403-408.

KONTOMICHALOU, P, PAPACHRISTOU, E y ANGELATOU, F.
(1976) Antimicrobial Agents and Chemoterapy, 9(6),
866-873.

KOWALCZUK, E. y LORKIEWICZ, Z. (1977) Acta Microbiologi
ca, 26(1), 9-18.

KOWALCZUK, E. y LORKIEWICZ, A. (1979) Acta microbiol.
Pol. 28(3), 221-229.

KOWALSKI, M. (1967) Acta Microbiol. Pol., 16, 7.

KOWALSKI, M. (1970) Acta Microbiol. Pol. Ser. A., 2,
115.

KOWALSKI, M. (1971) Plant and Soil, Special Vol., 63.

KUPERZTOCH-PORTNOY, Y.M., MIKLOS, G.L.G. y HELINSKI, D.
R. (1974) J. Bacteriol., 120, 545-548.

KUYKENDALL, L.D. (1977) En "*Genetic Engineering for Ni
trogen Fixation*", ed. Hollaender et al. Plenum Press.

LACEY, G.H. y LEARY, J.V. (1976) Genet. Res. Camb., 17,
363.

LAWN, A.M., MEYNELL, E., MEYNELL, G.G. y DATTA, N. (1967)
Nature, 216, 343-346.

LEDERBERG, J. y TATUM, E.L. (1946) Cold Spring Harbor
Symp. Quant. Biol., 11, 113-114.

LEDERBERG, J., CAVALLI, L.L. y LEDERBERG, E. M. (1952)
Genetics, 37, 720-730.

- LEY, J. de y RASSEL, A. (1965) *J. Gen. Microbiol.*, 41, 85
- LORKIEWICZ, Z, ZURKOWSKI, W., KOWALCZUK, E. y GORKA-HELKE, A. (1971) *Acta Microbiol. Pol. Ser. A'* 3, 101.
- LOVETT, M.A., GUHNEY, D.G. y HELINSKI, D.R. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 71, 3854-3857.
- LOVETT, M.A., KATZ, L. y HELINSKI, D.R. (1974) *Nature*, 251, 337-340.
- LOVETT, M.A., SPARKS, R.B. y HELINSKI, D.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 72, 2905-2907.
- LOWBURY, E.J., KIDSON, A., LILY, H.A., AYLIFFE, G.A.J. y JONES, R.J. *Lancet II*, 448-452.
- MAIER, R.J., BISHOP, P.E. y BRILL, W.J. (1978) *J. Bacteriol.*, 134(3), 1199-1201.
- MEADE, H.M. y SIGNER, E.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 74, 2076.
- MERGEAY, M., TSHITZNGE, G., JACQUEMIN, J.M., GERITS, Y. y LEDOUX, L. (1973) *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, 81, 805.
- MESSING, J., STAVDENBAUER, W.L. y HOFSCHEIDER, P.H. (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, 281, 465-471.
- MIELENZ, J.R., JACKSON, L.E., O'GARA, Y. y SHANMUGAM, K. T. (1979) *Can. J. Microbiol.*, 25, 803-807.
- MIKI, T., EASTON, A.M., ROWND, R.H. (1978b) *Molec. gen. Genetic.*, 158, 217-224.

MINKLEY, E.G. y IPPEN-IHLER, K. (1977) J. Bacteriol., 129, 1613-1622.

MITSUHASHI, S., KAMEDA, M., HARADA, K. y SUZUKI, M. (1969) J. Bacteriol., 97, 1520-1521.

MOODY, E.E.M y HAYES, W. (1972) J. Bacteriol., 111(1), 80-85.

MOODY, E.E.M. y RUNGE, R. (1972) Genetical Res., Cambridge, 19, 181-186.

MORRIS, C., HASHIMOTO, H., MICKEL, S. y ROWND, R. (1974) J. Bacteriol., 118, 855-866.

NAGAHARI, K., KOSHINAWA, T y SAKAGUCHI, K. (1979) Molec. gen. Genetic., 171, 115-119.

NEALE, S. (1976) Mutation Res., 32, 229-266.

NEWLON, C.S., PETES, J.D., HEREFORD, L.M. y FANGMAN, W. L. Nature, 247, 32-35.

NISHIMURA, Y., CARO, L., BERG, C.M. y HIROTA, Y. (1971) J. Mol. Biol., 55, 441-456.

NISIOKA, T., MITANI, M. y CLOWES, R.C. (1969) J. Bacteriol., 97, 376-385.

NISIOKA, T., MITANI, M. y CLOWES, R.C. (1970) J. Bacteriol., 103, 166-177.

NOVICK, R.P. (1969) Bacteriol. Rev., 33, 210-263.

NOVOTNY, C., CARNAHAN, J. y BRINTON, C.C. (1969) J. -
Bacteriol., 98, 1294-1306.

NOVOTNY, C.P. y FIVES-TAYLOR, P. (1974) J. Bacteriol.,
117, 1306-1311.

NOVOTNY, C.P. y FIVES-TAYLOR, P (1978) J. Bacteriol.,
133, 459-464.

NUTI, M.P., LEDERBOER, A. M., LEPIDI, A.A. y SCHILPEROORT,
R.A. (1977) J. Gen. Microbiol., 100, 241-248.

O'CALLAGHAN, R., BRADLEY, R. y PARANCHYCH, W. (1973)
Virology, 54, 220-229.

OCHIAI, K., YAMANAKA, K., KIMURA, K. y SAWADA, O. (1959)
Nihon Iji Shimpo., 1861, 34-46.

O'GARA, F. y DUNICAN, L.K (1973) J. Bacteriol., 116(3). -
1177-1180.

OHTSUBO, E. (1970) Genetics, 64, 189-197.

OHTSUBO, E., NISHIMURA, Y. y HIROTA, Y. (1970) Genetics,
64, 173-188.

OLIVARES, J. (1964) Ars. Pharm., 5, 3.

OLSEN, R.H. y SHIPLEY, P (1973) J. Bacteriol., 113, 772-
778.

OLSEN, R. H. y GONZALEZ, C. (1974) Biochem. Biophys. Res.
Commun., 59, 377-385.

OLSEN, R.H., SIAK, J. y GRAY, R.H. (1974) J. Virol., 14,
689-699.

- OROSZ, L., PAY, A. y DALLMANN, G. (1980) *Molec. Gen. Genet.*, 179, 163-167.
- OU, J.T. y ANDERSON, T.F. (1970) *J. Bacteriol.*, 102, -648-654.
- PALOMARES, A. J., MONTOYA, E. y OLIVARES, J. (1978), *Microbios*, 21, 33-39.
- PARANCHYCH, W., AINSWORTH, S.K., DICK, A. J. y KRAHN, P.M. (1971) *Virology*, 45, 615-628.
- PARITSKAYA, A.N. (1973) *Microbiology*, 42, 119.
- PEARCE, L.E. y MEYNELL, E. (1968) *J. Gen. Microbiol.*, 50, 159-172.
- PERLMAN, D., TWOSE, T.M., HOLLAND, M.S. y ROWND, R. (1975) *J. Bacteriol.*, 123, 1035-1042.
- PERLMAN, D. y ROWND, R.H. (1976) *Nature*, 259, 281-284.
- PINNEY, R.J. y SMITH, J.T. (1971) *Genet. Res.*, 18, 173-177.
- PRIVITERA, G.A., DUBLANCHET, M y SEBAL, H. (1979) *J. Infect. Dis.* 139, 97.
- PUHLER, A., BURKARDT, H.J. y HEUMANN, W. (1972) *J. Gen. Microbiol.*, 73, xxvi.
- PUHLER, A. y BURKARDT, H.J. (1978) *Molec. gen. Genetic.*, 162, 163-171.
- RAINA, J.L. y MODI, V.V. (1972) *J. Bacteriol.*, 11, 356.

- RIEB, G., HOLLOWAY, B.W. y PUHLER, A. (1980) Genet. - Res. Camb., 36, 99-109.
- ROWND, Q., KASAMATSU, H. y MICKEL, S. (1971) Ann. N. Y. Acad. Sci., 182, 188-206.
- ROWND, R., PERLMAN, D. y GOTO, N. (1975) In: *Microbiology*, 1974.
- RUSSEL, P.E. y JONES, D.G. (1973) J. appl. Bact., 36, 567-573.
- SALISBURY, V., R. W. HEDGES, y DATTA, N. (1972) J. Gen. Microbiol., 70, 443-452.
- SANDERS, R.E., CARLSON, R.W. y ALBERSHEIM, P. (1978) Nature, 271, 240-242.
- SANDERSON, K.E. y HARTMAN, P.E. (1978) Microbiol. Rev., 42, 471-519.
- SARATHY, P.V. y SIDDIQI, O. (1973) J. Mol. Biol., 78, 443-451.
- SCHOFFL, F., WUNDER, M., TUCHER, R., HEUMANN, W. y PUHLER, A. (1974) Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 228, 155-161.
- SCHWINGHAMER, E.A. (1969) Can. J. Microbiol., 15, 611.
- SCHWINGHAMER, E.A. (1975) J. gen. Microbiol., 91, 403
- SCHWINGHAMER, E.A. y DENNIS, E.S. (1979) Aust. J. Biol. Sci., 31, 651-662.

- SHANMUGAM, K.T. y VALENTINE, R.C. (1975) *Science*, 187, 919.
- SHARP, P.A., HSU, M., OHTSUBO, E. y DAVIDSON, N. (1972) *J. Mol. Biol.* 71, 471.
- SHARP, P.A., COHEN, S.N. y DAVIDSON, N. (1973) *J. Mol. Biol.*, 75, 235-256.
- SIDDIQI, O. y FOX, M.S. (1973) *J. Mol. Biol.*, 77, 101-123.
- SIK, T. y OROSZ, L. (1971) *Plant and Soil*, Special vol. p. 57.
- SIK, T, HORVATH, J. y CHATTERJEE, S. (1980) *Molec. gen. Genetic.*, 178, 511-516.
- SISTROM, W.R. (1977) *J. Bacteriol.*, 131, 526-532.
- SPITZBARTHA, M., PUHLER, A. y HEUMANN, W. (1979) *Arch. Microbiol.*, 121, 1-7.
- STANISICH, V.A. y HOLLOWAY, B.W. (1971) *Genet. Res. Camb.*, 17, 169.
- STANISICH, V.A. (1974) *J. Gen. Microbiol.*, 84, 332-342.
- STANLEY, J. y DUNICAN, L.K. (1979) *Molec. gen. Genet.*, 174, 211-220.
- STARLINGER, P. y SAEDDLER, H. (1976) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 75, 112-152.

STARLINGER, P. (1980) *Plasmid*, 3(3), 359-361.

STIFFLER, P.W., KELLER, R. y TRAUB, N. (1974) *J. Infect. Dis.*, 130, 544.

SUMMERS, A.O. y JACOBY, G.A. (1977) *J. Bacteriol.*, 129, 276-281.

SUAB, Z., KONDOROSI, A y OROSZ, L. (1978) *J. Gen. Microbiol.*, 106, 321-327.

SYKES, R.B. y RICHMOND, M.H. (1970) *Nature*, 226, 952-954.

TALLY, F.P., SNYDMAN, D.R., GORBACH y MALAMY, M.H. (1979) *J. Infect. Dis.*, 139, 83.

TANAKA, T., TSUNODA, M. y MITSUHASHI, S. (1975). In *Microbial Drug Resistance*, ed. by S. Mitsuhashi y H. Hasimoto, pp. 187-199, Univ. Tokyo Press, Tokyo/ Univ. Park Press, Baltimore y London.

TAYLOR, A. L. y ADELBERG. E.A. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 5, 400.

TAYLOR, A.L., TROTTER, (1972) *Bacteriol Rev.* 36, 504.

TOWNER, K.J.VIVIAN, A. *J. Gen. Microbiol.*, 93, 335.

TWEATS, D.J. Pinney. y SMITH, J.I.. *J. Bacterio.* 118, 790-796.

VAPNEK, D. y RUPP, W.D. (1971) *J. Mol. Biol.*, 60, 413-424.

VINCENT, J.M. (1970) *IBP Hand back*, n° 15, Blacwell.

- VIVIAN, A (1971) J. Gen. Microbiol., 69, 353-364.
- WATANABE, T. y LYANG, K.W (1962) J. Bacteriol., 84, 422-430.
- WATANABE, T., OGATA, C. y SATO, S. (1964) J. Bacteriol., 88, 922-928.
- WATANABE, T., FURUSE, C, y SAKAIZUMI, S. (1968) J. Bacteriol., 96, 1791-1795.
- WATANABE, T. (1973) Bacteriol. Rev., 27, 87-115.
- WATSON, J.M. (1977) Ph. D. thesis. Monash Univ. Clayton.
- WILLETTS, N.S. (1972) Ann. Rev. Genet., 6, 257-268.
- WILLETTS, N.S. (1972) J. Bacteriol., 112, 773-778.
- WILLETTS, N.S. y ACHTMAN, M. (1972) J. Bacteriol., 110, 843-851.
- WILLETTS, N.S. (1974) J. Bacteriol., 118, 778-782.
- WILLETTS, N.S. (1974) Mol. Gen. Genet., 129, 123-130.
- WILLETTS, N.S. y MAVIE, J. (1974) Genet. Res., 24, 81-89.
- WILLETTS, N.S. (1977a) In: *R Factors*. S. Mitsuhashi, Ed. Univ. of Tokyo Press.
- WILLETTS, N.S. y Mc-INTERE, S. (1978) J. Mol. Biol., 126, 525-549.
- WILLETTS, N.S. y MAULE, J. (1979) Genet. Res., 24, 81-89.

- WU, T.T. (1966) *Genetics*, 54, 405-410.
- YAGI, Y. y CLEWELL, D. B. (1976) *J. Mol. Biol.*, 102, 583-600.
- YATES, M (1976) *Trends Biochem. Sci.*, 17.
- YOSHIDA, Y, TERAWAKI, Y y NAKAYA, R. (1974) *Biochem. - Biophys. Res. Commum.*, 59, 361-369.
- ZELAZNA, I (1963) *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.*, 12, 166.
- ZELAZNA, I. (1964) *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.*, 13, 291.
- ZELZNA- KOWALSKA, I. (1971) *Plant and Soil, Special vol.* p.67.
- ZELZNA-KOWALSKA, I y LORKIEWICZ, Z (1971) *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.*, 3, 11.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I. (1977) *J. Bacteriol.*, 132(1), 8-12.
- ZURKOWSKI, W, HOFFMAN, M. y LORKIEWICZ, Z. (1973) *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.*, 5, 55.
- ZURKOWSKI, W. y Z. LORKIEWICZ, Z. (1978) *Acta Microbiologica Polonica*, 27(1), 309-310.
- *NUTI, M.P., LEDEBOER, A.M., LEPIDI, A.A. y SCHILPEROORT, R.A. (1977) *J. Gen. Microbiol.*, 100, 241-248
- *PRAKASH, R.K., HOOYKAAS, P.J.J., LEDEBOER, A.M., KIJNE, J., SCHILPEROORT, R.A., NUTI, M.P., LEPIDI, A.A., CASSE, F., BOECHER, C., JULLIOT, J.S. y DENARIE, J. (1979) *Proc. Third Int. symp. on Nitrogen Fixation* (Eds W.E. Newton y W.H. Orme-Johnson.) University Park Press.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a los que de alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo. A la Facultad de Farmacia por pertenecer a ella.

Quiero citar, ante todo, al Prof. Cerdá Olmedo que influyó decisivamente en mi elección profesional. Guardo un recuerdo entusiasta de sus enseñanzas y puedo decir sin rodeos que gracias a ellas comencé a pensar como genético.

Al Prof. Pérez Silva por su orientación microbiológica y la favorable acogida dispensada para la realización de esta Tesis en su Departamento. Al prof. Palomares Díaz por sus valiosas sugerencias y críticas, así como la humanidad y colaboración aportada.

Al Prof. Romero Raya, el que me haya permitido la continuación de mi trabajo y su elaboración en nuestro Departamento de Farmacia.

A mis compañeros de los Departamentos que de alguna forma han contribuido a hacer más ameno y llevadero este trabajo. Especialmente a Isabel, por su inestimable colaboración en la redacción de esta Tesis; a Josep y Prof. Olivares por sus críticas y ayuda y muy especialmente a Miguel Angel por su desinteresada colaboración y por los buenos y malos ratos pasados juntos.

A Coral, quien con su aliento, paciencia y ayuda me ha hecho soportable la terminación de la Tesis.

Y finalmente, a todos aquellos que me soportan y me han soportado.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes

en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de:

D. Manuel Mejías Guiso
titulada: "Embriología y ontogenia de *Rhizophora tripedunculata*"

Se acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
"cum laude"

Sevilla, 14 de Noviembre 1981

El Vocal, El Vocal, El Vocal,

J. Verdá Olmedo

Antonio

M. C.

El Presidente,

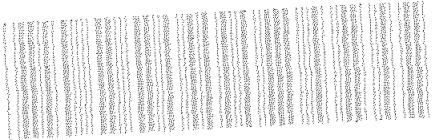
El Secretario,

El Doctorado,

J. Verdá Olmedo

Antonio

M. Mejías



500292311

FBI E TO-023

292311