

DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL Y  
BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PÉRDIDA DEL  
PODER PATÓGENO EN AGROBACTERIUM  
TUMEFACIENS

PABLO LLOP PÉREZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 d' Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Emilio Montesinos Seguí
- D. Manuel Pérez Alonso
- D. Jaime Cubero Dabrio
- D. Xavier Nesme
- D. Leandro Peña García

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Milagros López

D<sup>a</sup>. Beatriz Lastra

D. Jesús Murillo

©Copyright: Servei de Publicacions  
Pablo Llop Pérez

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5824-4

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Genética**



VNIERSITATIS GRAE REX ARAGONVM • ALEXANDER PP VI VALENTINVS FERDINANDVS DEI VALENCIA



**Caracterización molecular de la  
pérdida del poder patógeno  
en *Agrobacterium tumefaciens***

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Pablo Llop Pérez**

Dirigida por:

**María Milagros López, Jesús Murillo y Beatriz Lastra**

Valencia, 2003

Realizada en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

## RESUMEN

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria fitopatógena causante de tumores en el cuello y raíces de muchas especies vegetales de interés económico. En los viveros e invernaderos es donde más daños produce, al aparecer episodios epidémicos que pueden impedir la comercialización de producciones enteras, porque las plantas afectadas por esta enfermedad no pueden ser comercializadas. Los estudios epidemiológicos y de dinámica de poblaciones del patógeno son poco abundantes y han incidido en aspectos del desarrollo y mantenimiento de la enfermedad producida por la bacteria. Aunque se ha señalado el predominio de cepas no patógenas frente a patógenas en ambientes en los que las cepas productoras de la enfermedad verían favorecido su mantenimiento, apenas se ha investigado la pérdida del poder patógeno en aislados de tumores.

Por tanto, en esta memoria se ha pretendido ampliar el conocimiento sobre la aparición de cepas no patógenas a partir de cepas patógenas en tumores de diversas especies vegetales, huéspedes habituales y no habituales. El objetivo era comprobar si este fenómeno se presenta en la mayoría de cepas de *A. tumefaciens*, y si existen interacciones con plantas o de otro tipo que favorezcan su aparición. En primer lugar, se ha puesto a punto un método de identificación de cepas individuales de *A. tumefaciens*, por medio de un sistema de RAPDs, que emplea iniciadores inespecíficos, y que se ha comprobado que es eficaz para diferenciar entre cepas del género *Agrobacterium* sp.

En segundo lugar, se han llevado a cabo varios experimentos de inoculación de diversos huéspedes vegetales y, de los tumores producidos, se han aislado colonias de las que se ha estudiado el fenotipo patógeno, para comprobar la frecuencia de aparición de este fenómeno y estudiar los cambios que a nivel molecular habían sufrido. También se han llevado a cabo experimentos *in vitro*, mediante siembras sucesivas en un medio general, para ver si la pérdida del fenotipo patógeno se produce de forma espontánea.

El sistema de identificación mediante RAPDs ha permitido comprobar que, en el análisis de más de 5.000 colonias no patógenas procedentes de los aislamientos realizados en los tumores, solo siete de estas colonias se correspondía con la que previamente se había inoculado en alguno de los huéspedes. El resto eran cepas de *Agrobacterium* no patógenas de las que se desconoce su origen. Los resultados de este trabajo muestran por tanto, que el fenómeno de la pérdida del poder patógeno se produce, en las condiciones y cepas estudiadas, de forma muy escasa.

La caracterización molecular de los mutantes ha mostrado que 6 de 7 presentan cambios en su plásmido Ti. Entre ellos, inserciones de elementos transponibles en genes de virulencia o mutaciones puntuales. El caso más llamativo es el de dos mutantes que presentan grandes cambios en su plásmido Ti, con un tamaño doble del de la cepa salvaje. El resto de mutantes presenta variaciones en el tamaño o número de plásmidos respecto a las cepas parentales. Los cambios ocurridos parecen implicar grandes reorganizaciones en el genoma de los mutantes, no sólo a nivel del plásmido Ti.

## SUMMARY

*Agrobacterium tumefaciens* is the causal agent of crown gall in many plant species of economic interest. The losses it causes are very important in greenhouses and nurseries, because of the appearance of outbreaks that do not allow the marketing of entire productions, due to the impossibility of selling the affected plants. Studies on epidemiology and dynamic population are scarce, and they have focused on several aspects about the spread and maintenance of the disease. Although it has been noticed the predominance of non pathogenic strains against the pathogenic in environments where the disease producing strains would be favored, few studies have been developed on the loss of pathogenicity from pathogenic strains in tumors.

The goal of this work has been to increase the knowledge about the appearance of nonpathogenic strains from pathogenic bacteria in tumors produced in different plant species, common and less common hosts. The objective was to see whether this phenomenon occurs in the majority of *A. tumefaciens* strains, and if they exist interactions with plants or other different that could increase these phenotypic changes. First of all, an identification system to distinguish individual strains of *A. tumefaciens* by means of a RAPD procedure has been set up, and it has proved the validity of the system to distinguish between strains of the genus *Agrobacterium*.

Secondly, several inoculation experiments on different hosts have been performed, and from the tumors produced, colonies were isolated and analyzed to see the phenotype pathogen, to determine the frequency of this phenomenon and study the molecular changes they have undergone. *In vitro* experiments consisting in successive incubations in a general medium have been performed as well, to examine if this loss of pathogenicity takes place spontaneously.

The identification system by means of RAPDs has established that among more than 5.000 nonpathogenic colonies isolated from the tumors, only seven of them correlated with the strains previously inoculated in one or another of the hosts.

The results obtained in this work have shown that the loss of pathogenicity takes place, in the conditions and with the strains studied, very scarcely.

The molecular characterization of the mutants has shown that 6 out of 7 found have changes in the Ti plasmid. Among them, they appear insertion of DNA sequences (IS) into virulence genes or point mutations. In two of the mutants, the alterations have affected so greatly the Ti plasmid they harbour that duplicate the size comparing to the parental strain. The changes seem to be due to wide rearrangements in the genome of the mutants, not only in the plasmid.

---

# ÍNDICE

Introducción general.	
Importancia y distribución de especies patógenas de <i>Agrobacterium</i>	1
i.1 El género <i>Agrobacterium</i>	
i.1.1 Taxonomía	3
i.1.2 Características fenotípicas	4
i.1.2.1 Clasificación en biovares	6
i.1.2.2 Catabolismo de Opinas	7
i.1.3 Características genotípicas	9
i.1.3.1 El plásmido inductor de tumores (pTi)	10
i.1.3.2 genes cromosómicos	18
i.2 El proceso de inducción tumoral	19
i.2.1 Reconocimiento de la célula vegetal susceptible	20
i.2.2 Unión de la bacteria a la célula vegetal	20
i.2.3 Inducción de la expresión de los genes <i>vir</i>	21
i.2.4 Producción de una copia transferible del ADN-T	21
i.2.5 Transferencia del complejo-T a la célula vegetal	22
i.2.6 Integración del complejo-T en el genoma de la planta	23
i.2.7 Expresión de los genes del ADN-T	24
i.3 Estructura de las poblaciones de <i>Agrobacterium</i>	25
i.3.1 Mecanismos de heterogeneidad	26
i.3.2 El concepto de opina	28
i.3.3 El fenómeno de la pérdida del poder patógeno	29
i.3.3.1 Patógeno vs. Virulento	29
i.3.3.2 Relación del huésped con las formas no patógenas	31
OBJETIVOS GENERALES.	35

1. Capítulo 1. Método de identificación de cepas de <i>Agrobacterium</i> sp. mediante RAPDs.	
1.1 Introducción.	37
1.2 Objetivos.	39
1.3 Material y métodos.	
1.3.1 Puesta a punto de un sistema de identificación mediante RAPDs	41
1.3.2 Purificación del ADN de las cepas bacterianas.	41
1.3.3 Comparación de la purificación del ADN con la suspensión bacteriana.	42
1.3.4 Condiciones de amplificación	43
1.3.5 Análisis del sistema de RAPDs sobre una colección de cepas caracterizadas.	43
1.3.6 Análisis de RAPDs llevados a cabo con una cepa marcada.	45
1.4 Resultados.	
1.4.1 Puesta a punto del sistema de identificación mediante RAPDs.	47
1.4.2 Comparación ADN purificado/suspensión bacteriana.	47
1.4.3 Análisis del sistema sobre una colección de cepas.	48
1.4.4 Análisis de RAPDs de colonias aisladas de tumores producidos en un experimento de inoculación con una cepa resistente a gentamicina.	50
1.5 Discusión.	53
1.6 Conclusiones.	57
2. Capítulo 2. Obtención de mutantes no patógenos con cepas de <i>A. tumefaciens</i> inoculadas en diversos huéspedes.	
2.1 Introducción.	59
2.2 Objetivos.	63
2.3 Material y Métodos.	
2.3.1 Experimentos de inoculación con la cepa C58 resistente al antibiótico gentamicina en el huésped GF677.	65
2.3.1.1 Inoculación de las colonias para identificar mutantes no patógenos.	66
2.3.2 Inoculación de diversas cepas de <i>A. tumefaciens</i> en huéspedes herbáceos.	66

---

2.3.3	Inoculación de dos cepas de <i>A. tumefaciens</i> en huéspedes leñosos.	67
2.3.4	Identificación de las colonias aisladas de los tumores.	68
2.3.5	Análisis de confirmación de las colonias mutantes.	69
2.3.6	Amplificación de zonas del plásmido Ti involucradas en la patogenicidad.	70
2.3.7	Inoculación de los mutantes en los huéspedes origen de las cepas parentales.	71
2.3.8	Análisis de la virulencia de los mutantes obtenidos a partir de la cepa IVIA 1.102.	72
2.4	Resultados.	
2.4.1	Evaluación de la pérdida de patogenicidad en los experimentos con la cepa C58R <i>in planta</i> e identificación de las colonias aisladas.	73
2.4.2	Obtención de mutantes a partir de las inoculaciones de diversas cepas de <i>A. tumefaciens</i> en huéspedes herbáceos.	74
2.4.3	Evaluación de las colonias obtenidas a partir de los tumores producidos en los experimentos de inoculación de dos cepas de <i>A. tumefaciens</i> en huéspedes leñosos.	78
2.4.3.1	Análisis de las inoculaciones en tomate.	78
2.4.3.2	Análisis mediante RAPDs de las colonias no patógenas.	80
2.4.4	Amplificación de las zonas involucradas en la patogenicidad.	81
2.4.5	Inoculación de los mutantes en los huéspedes de donde proceden las cepas parentales.	83
2.4.6	Análisis de virulencia con los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102.	83
2.5	Discusión.	85
2.6	Conclusiones.	91
3	Capítulo 3. Estudio de la pérdida espontánea de poder patógeno en diversas cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en experimentos <i>in vitro</i> .	
3.1	Introducción.	93
3.2	Objetivos.	97
3.3	Material y métodos.	
3.3.1	Procedimiento de siembra e inoculación.	99



3.3.2	Inoculaciones en plantas de tomate y caracterización de las colonias mutantes.	102
3.4	Resultados.	
3.4.1	Inoculaciones en tomate.	103
3.4.2	Caracterización de las colonias mutantes obtenidas.	105
3.5	Discusión.	107
3.6	Conclusiones.	109
4	Capítulo 4. Caracterización molecular de los mutantes no patógenos obtenidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	
4.1	Introducción.	111
4.2	Objetivos.	115
4.3	Material y métodos.	
4.3.1	Complementación del poder patógeno en los mutantes obtenidos.	117
4.3.1.1	Complementación con los mutantes obtenidos en la inoculación de la cepa resistente a gentamicina en GF677.	120
4.3.1.2	Complementación con los mutantes obtenidos en el experimento de inoculación en plantas herbáceas con las cepas C58 e IVIA 1.102.	122
4.3.1.3	Complementación con los mutantes obtenidos en el experimento <i>in vitro</i> con la cepa C58R.	123
4.3.2	Cambios moleculares ocurridos en las zonas identificadas de los mutantes analizados con pérdida del poder patógeno y de virulencia.	123
4.3.2.1	Amplificación mediante iniciadores de las distintas zonas involucradas en la virulencia en los mutantes obtenidos.	124
4.3.2.2	Restricción con endonucleasas de los fragmentos amplificados (PCR-RFLP) y comparación de los patrones de restricción de los mutantes obtenidos con la cepa C58R.	125
4.3.2.3	Secuenciación y comparación de secuencias con los mutantes provenientes de la cepa C58R inoculada en el huésped GF677 y los mutantes del experimento <i>in vitro</i> .	126

---

4.3.2.4	Secuenciación y comparación de secuencias con el mutante T1 procedente de la cepa C58 en la inoculación de plantas herbáceas.	129
4.3.3	Confirmación de la pérdida del poder patógeno con mutantes de la cepa C58R mediante complementación con un plásmido conteniendo el gen <i>virB5</i> .	130
4.3.4	Análisis del cultivo crioconservado de la cepa C58R.	131
4.3.5	Análisis de los plásmidos Ti de los mutantes obtenidos.	
4.3.5.1	Perfil de plásmidos mediante geles Eckhardt.	132
4.3.5.2	Hibridaciones con sondas de diversas regiones del plásmido pTi.	132
4.3.5.2.1	Obtención de las sondas empleadas en las hibridaciones con el ADN de las colonias mutantes.	133
4.3.6	Análisis de la virulencia de los mutantes obtenidos a partir de la cepa IVIA 1.102 complementados con el plásmido pTHE17.	135
4.3.7	Análisis del poder patógeno de los mutantes complementados en los huéspedes de origen de las cepas parentales.	135
4.4	Resultados	
4.4.1	Identificación de las zonas involucradas en la pérdida del poder patógeno en los mutantes obtenidos en los diversos experimentos. Estudios de complementación mediante plásmidos.	137
4.4.2	Análisis molecular de los mutantes obtenidos en los distintos experimentos.	
4.4.2.1	Análisis mediante amplificación por PCR de las regiones implicadas ( <i>virB</i> y ADN-T) en la pérdida del poder patógeno de los mutantes.	139
4.4.2.2	Análisis de los mutantes procedentes de la cepa C58R en los experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> mediante RFLPs de los amplificadores de la región <i>virB</i> .	141

4.4.2.3	Secuenciación de las regiones implicadas en la pérdida del poder patógeno de los mutantes obtenidos en los experimentos <i>in planta</i> e <i>in vitro</i> .	142
4.4.2.3.1	Análisis de la secuenciación de las colonias 37 y 22 procedentes de la cepa C58R.	142
4.4.2.3.2	Análisis de la secuencia de la inserción de la colonia T1.	145
4.4.3	Confirmación de la pérdida del poder patógeno debido a una deleción en el gen <i>virB5</i> . Experimentos de complementación con los mutantes de C58R <i>in planta</i> e <i>in vitro</i> .	147
4.4.4	Verificación del cultivo crioconservado de la cepa C58R.	148
4.4.5	Análisis de los plásmidos Ti de los mutantes obtenidos.	149
4.4.5.1	Perfil de plásmidos mediante geles Eckhardt.	149
4.4.5.2	Análisis mediante sondas de los plásmidos Ti de los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102.	150
4.4.6	Recuperación de la virulencia de los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102 con el plásmido pTHE17.	152
4.4.7	Inoculación de las colonias mutantes transformadas con los plásmidos de complementación en los huéspedes de donde proceden las cepas parentales inoculadas.	153
4.5	Discusión.	155
4.6	Conclusiones.	161
5	Discusión general .	163
6	Conclusiones generales.	169
7	Bibliografía.	173
8	Anexo.	199

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### Importancia y distribución de especies patógenas de *Agrobacterium*

El género *Agrobacterium* agrupa a la bacteria fitopatógena *A. tumefaciens*, causante de tumores en cuello y raíces (CROWN GALL) en muchas especies vegetales, de interés agrícola y comercial. De Cleene y De Ley (1976) recopilando datos de la bibliografía y otros obtenidos en sus propios ensayos, concluyeron que en total 643 especies de 331 géneros, pertenecientes a 93 familias, eran susceptibles a esta bacteria. Los huéspedes principales pertenecían a la clase dicotiledóneas de la división angiospermas y a las gimnospermas, mientras que solo algunas monocotiledóneas pertenecientes a los órdenes Liliales y Arales fueron susceptibles. Dentro de ellas, las especies de interés económico más afectadas son los frutales de hueso y pepita, la vid, cultivos ornamentales como el rosal, dalia o crisantemo y especies forestales como el chopo, el aliso o el sauce (Moore y Cooksey 1981; Mougél, 2000). En los viveros e invernaderos es donde esta enfermedad es más perjudicial ya que afecta gravemente al valor comercial de las producciones provocando importantes pérdidas económicas. El material vegetal con tumores no puede ser comercializado (Directiva 93/64/CEE) y en numerosos países del norte de África y sudamérica, está considerado un patógeno de cuarentena. De forma directa, la enfermedad causa pérdidas de producción ya que provoca un descenso de vigor y solo en casos extremos puede causar la muerte de la planta (Faivre-Amiot, 1984; Garret, 1987; Nesme *et al.*, 1990).

Las cepas de *Agrobacterium* patógenas contienen un plásmido inductor de tumores (Ti) que determina en primera instancia la patogenicidad de una cepa, ya que la enfermedad se desencadena cuando determinados genes de este plásmido Ti son transferidos al genoma del huésped. Estos genes codifican las enzimas requeridas para la síntesis de fitohormonas que se sobreexpresan en la célula vegetal provocando un incremento en la división celular (hiperplasia) y en el tamaño de las células (hipertrofia) dando lugar al fenotipo *tumor*. Este proceso ha sido ampliamente estudiado no solo desde el punto de vista fitopatológico, sino también por su aplicación en el campo de la biotecnología, como método para introducir genes de interés en plantas (Melcher y Hooykas, 1987; Kado, 1991; Winnans, 1992; Hooykas y Beijersberger, 1994; Hooykas y Schilperoort, 1992; Sheng y Citovsky, 1996; Christie, 1997) y, recientemente, se ha visto que incluso es eficaz para la transformación de células humanas (Kunik *et al.*, 2001).

Los estudios genéticos en la familia *Rhizobiaceae*, que agrupa a los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, han permitido conocer detalles sobre la naturaleza de los genomas bacterianos, como la comprobación de que el paradigma propuesto de un cromosoma circular no es universal en procariotas (Krawiec y Riley, 1990; Jumas-Bilak *et al.*, 1998) o el descubrimiento de la existencia de reorganizaciones genómicas en bacterias (Flores *et al.*, 1988; Sullivan y Ronson, 1998; Mavingui *et al.*, 2002). Además, estos avances han contribuido al desarrollo de técnicas y herramientas con aplicaciones universales como las de reemplazo genético y sistemas de transferencia de transposones (Hynes y Finan, 1998).

El sistema de colonización genética desarrollado por varias especies del género *Agrobacterium* tiene como consecuencia que sólo es necesaria la presencia de la bacteria al comienzo de la infección, por lo que la lucha curativa, que busca destruir al agente patógeno una vez iniciada ésta, no tiene sentido ya que el tumor puede desarrollarse sin la bacteria, lo que condiciona que los métodos de lucha recomendados sean preventivos. Los más utilizados consisten en: control de la calidad sanitaria de las plantas y del suelo de cultivo, medidas profilácticas de desinfección del suelo (con vapor, solarización) y del material vegetal (termoterapia, tratamiento con agua caliente), rotación de cultivos con plantas no huéspedes o plantación de variedades resistentes (New y Kerr, 1972; Moore y Allen, 1986; Ophel *et al.*, 1990; Vicedo *et al.*, 1993; Raio *et al.*, 1994). La lucha química se ha mostrado prácticamente ineficaz, a pesar de las numerosas materias activas ensayadas (Canfield *et al.*, 1992; Moore y Canfield, 1996; López *et al.*, 1989) y la lucha biológica mediante la cepa K84 de *Agrobacterium*, que era el método de control más empleado, presenta diversos problemas (Vicedo *et al.*, 1996). Sin embargo, estos parecen haberse resuelto con la construcción de una cepa modificada genéticamente, K1026, que deriva de la cepa K84 (Jones *et al.*, 1988) pero la actual legislación respecto a estos organismos (OMG) es restrictiva respecto a su uso en Europa, y la cepa K1026 no ha sido registrada a nivel comercial en la UE.

La enfermedad de los tumores de cuello y raíces se encuentra extendida por todo el mundo (Bradbury, 1986). Dentro de Europa, los países de la cuenca mediterránea son los más afectados, entre ellos España (López y Montesinos, 1996). Los intercambios comerciales han contribuido a la diseminación de esta enfermedad, ya que la principal

fuelle de inóculo es el material vegetal con síntomas o con infecciones latentes. En algunas especies vegetales se ha descrito el movimiento de *Agrobacterium* en el interior de las plantas, con la posibilidad de infecciones sistémicas y la probable existencia de plantas asintomáticas en las que la bacteria está presente de forma latente (Lehoczky, 1968; Jones y Rajú, 1988; Martí *et al.*, 1999; Cubero, 1998). Con el fin de limitar la propagación de la enfermedad, es imprescindible contar con técnicas sensibles para la detección e identificación de cepas patógenas que impidan la multiplicación y plantación de plantas infectadas (Picard *et al.*, 1992; 1994; Haas *et al.*, 1995; Cubero *et al.*, 1999; 2002).

### i.1. El género *Agrobacterium*

#### i.1.1. Taxonomía

En 1907 Smith y Townsend aislaron por primera vez las bacterias inductoras de los tumores del cuello a las que denominaron *Bacterium tumefaciens*. Fue Conn quien advirtió en 1942 que ambas especies eran muy cercanas y similares a las bacterias que producían nódulos en legumbres. Por ello, propuso el establecimiento de un nuevo género al que denominó *Agrobacterium*. Actualmente, el género *Agrobacterium* se define como el grupo de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* que no fijan nitrógeno, sino que producen otros tipos de hipertrofia (Kerstens y De Ley, 1984) y son miembros de la clase alpha del *phylum Proteobacteria*. Conn incluyó en el género a los patógenos causantes de los tumores de cuello que se denominaron *A. tumefaciens*, a los saprofitos del suelo *A. radiobacter* y al patógeno *A. rhizogenes*, causante de las raíces en cabellera. Posteriormente, fue incluida una cuarta especie, *A. rubi*, que agruparía a los aislados de frambueso (Starr y Weiss, 1943). Esta clasificación por especies basada en la patogenicidad es inestable, ya que *A. tumefaciens* sólo se distingue de *A. radiobacter* por su carácter patógeno (Holmes, 1988), característica codificada por genes presentes en un plásmido que puede ser adquirido o perdido. Por ello, diferentes autores establecieron clasificaciones alternativas que se basaran en caracteres definidos por genes cromosómicos. Entre ellos, Keane *et al.*, (1970) subdividieron las cepas de *Agrobacterium* en tres biovares atendiendo a características bioquímicas y fenotípicas. Esta clasificación permitió a Sawada *et al.*, (1993) – corregido por Bouzar (1994) – agrupar a las cepas en tres especies según el biovar al que pertenecían. De este modo, los biovares suben al rango de especie y se denominan *A.*

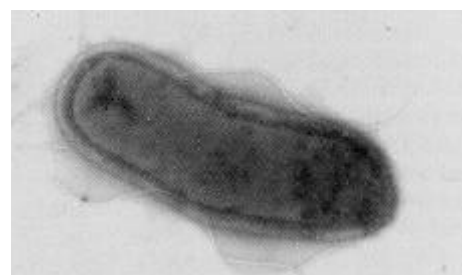
*tumefaciens* las cepas del biovar 1, *A. rhizogenes* las del biovar 2 y *A. vitis* las del biovar 3. Esta última especie fue definida previamente por Ophel y Kerr (1990) quienes demostraron que era una especie distinguible de *A. tumefaciens* basándose en que presentaba valores bajos de reasociación ADN-ADN y en las secuencias de la fracción 16S del ARN-r. Se mantienen aparte los aislados de frambueso que se agruparían en la especie *A. rubi* y se creó la especie *A. larrymoorei* que agrupa a los procedentes de *Ficus benjamina* (Bouzar y Jones, 2001). Cada especie puede comprender aislados patógenos y no patógenos y es definida por características codificadas por genes cromosómicos. Aún así, esta clasificación no ha sido aceptada por todos los investigadores ya que tiene el inconveniente de que los nombres de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* se han usado históricamente para cepas patógenas que inducen tumores de cuello y raíces en cabellera, respectivamente. Con la citada clasificación, ambas especies pueden incluir cepas patógenas o no, provocar tumores o raíces adventicias, siempre que pertenezcan a los biovars 1 y 2, respectivamente, y como es la más utilizada actualmente, se empleará a lo largo de esta Tesis.

Recientemente, ha surgido de nuevo la polémica a raíz de la reclasificación de todos los miembros del género *Agrobacterium* dentro del género *Rhizobium*, estableciéndose las especies *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis* y *R. rubi* (Young *et al.*, 2001). El rechazo por parte de la comunidad científica que trabaja con *Agrobacterium* ha sido rotundo y se han publicado contundentes argumentos en contra de esta reclasificación (Farrand *et al.*, 2002), estando a la espera de la resolución del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP) y de la publicación de nuevos trabajos en curso sobre el tema para dirimir la cuestión.

### i.1.2 Características fenotípicas

Las especies del género *Agrobacterium* agrupan bacterias Gram negativas, encapsuladas y con forma bacilar. Su tamaño oscila entre 0.6 - 1  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5 - 3  $\mu\text{m}$  de largo. No forman esporas y son móviles gracias a que poseen de uno a seis flagelos peritricos. Generalmente, las células se presentan solas o en parejas. (Figura i.1).

Figura i.1. Fotografía electrónica de *A. tumefaciens* mostrando los flagelos peritricos característicos. Tomado del Department of Plant Pathology, North Carolina State University (EE.UU)





Son bacterias aerobias, aunque se han descrito algunas cepas con capacidad de anaerobiosis en presencia de nitrato (Kerstens y De Ley, 1984). La mayoría de las cepas son capaces de crecer en bajas concentraciones de oxígeno en el interior de los tejidos de la planta. Son organismos quimioorganotrofos que pueden utilizar un amplio espectro de hidratos de carbono, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos (Tabla 1). Algunas cepas utilizan sales y nitratos de amonio como fuentes de nitrógeno y otras necesitan aminoácidos y otros factores de crecimiento adicionales (Lippincott *et al.*, 1981). Además se ha comprobado que pueden fijar el nitrógeno molecular de forma libre (Kanvinde y Sastry, 1990).

Tabla 1: Características bioquímicas del género *Agrobacterium*

<b>Actividad positiva</b>		<b>Actividad negativa</b>	
<b>ENZIMAS</b>			
Catalasa		Lecitinasas	
Ureasa		Arginina dehidrolasa	
Penicilasa		Tween 80 lipasa	
<b>CARBOHIDRATOS: fuentes de carbono</b>			
Glucosa	Ramnosa	Almidón	Formato
Galactosa	Xilosa	Pectato	Glioxilato
Arabinosa	Fucosa	Inulina	Oxilato
Fructosa	Salicina	Celulosa	Benzoato
Manitol	Inositol		Dextrina
Adonitol	Aesculina		Glucuronato
Melobiosa	Arbutina		
Manosa	Glicerol		
Maltosa	$\beta$ -hidroxibenzoato		
Trealosa			
<b>AMINOÁCIDOS: fuentes de carbono y nitrógeno</b>			
Asparagina	Histidina	Fenilalanina	Glicina
Aspartato	Serina	Triptófano	Leucina
Arginina	Lisina	Valina	Cisteína

Tomada de Lippincott *et al.*, (1981).

La temperatura óptima de crecimiento de *Agrobacterium* está entre 25 y 28° C, siendo 38° C la temperatura máxima (Kado *et al.*, 1972). La morfología de las colonias es variable según el medio en que se cultive, pero la mayor parte son de forma circular, mucosas, convexas, de tono brillante opaco y color blanco a amarillo hueso. En algunos casos adquieren tonalidad rojiza o anaranjada, según los componentes del medio. El crecimiento en medios con hidratos de carbono va acompañado de una abundante producción de polisacáridos extracelulares en forma de mucus.

Aunque se desconocen las causas, las agrobacterias pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC) (Manahan y Steck, 1997) que puede ser reversible. Una vez superado, las cepas conservan su capacidad patogénica.

#### i.1.2.1 Clasificación en biovars

Keane *et al.*, (1970) y Kerr y Panagopoulos (1977) clasificaron, basándose en una serie de características bioquímicas, las agrobacterias en tres biovars que se corresponden, en la actualidad, con tres de las especies del género. Las características de cada biovar se muestran en la Tabla 2 y se han establecido en función de las temperaturas máximas de crecimiento y su capacidad para utilizar determinados ácidos orgánicos, polialcoholes e hidratos de carbono.

La mayor parte de las cepas se corresponden a alguno de los tres biovars, aunque algunas tienen características intermedias entre los tres por lo que se consideran “biovars intermedios” o formarían nuevos biovars. Curiosamente esto último es típico de los aislados de determinados huéspedes (Holmes y Roberts, 1981; Bell y Ramey, 1991; Sawada e Ieki, 1992; Bouzar *et al.*, 1995).

Tabla 2: Principales características que diferencian las especies del género *Agrobacterium*

PRUEBAS	ESPECIES		
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
Producción de 3-cetolactosa	+	-	<b>V</b>
Crecimiento en 2 % NaCl	+	-	+
Crecimiento a 35°C	+	<b>V</b>	<b>V</b>
Acción en litmus milk	<b>Alcalina</b>	<b>Ácida</b>	<b>Alcalina</b>
Película en citrato amónico-férrico	+	-	-
Reacción oxidasa	+	<b>V-</b>	<b>V-</b>
Utilización de citrato	<b>V-</b>	+	+
<b>Producción de ácido a partir de:</b>			
Eritritol	-	+	-
Melecitosa	+	-	-
<b>Producción de álcali a partir de:</b>			
Ácido malónico	-	+	+
Ácido L-tartárico	-	+	+
Ácido múxico	-	+	-

+ : 80% o más cepas positivo; V: entre el 21-79% de cepas positivas; - : 80% o más cepas negativas.

Tomado de Moore *et al.*, (2001)

### i.1.2.2 Catabolismo de opinas

Los tumores tienen todas las características de poseer un metabolismo nitrogenado particular, ya que en los tejidos transformados se sintetizan unos compuestos específicos de bajo peso molecular llamados opinas. Son productos de la condensación de ácidos orgánicos y aminoácidos [o disacáridos], que son compuestos químicos comunes en las plantas pero que en los tumores aparecen unidos de forma poco frecuente. Estas sustancias difunden dentro y alrededor del tumor, pudiendo constituir hasta el 7% del peso seco del mismo (Tate *et al.*, 1982), y son reconocidas por bacterias que poseen plásmidos Ti que las utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno [o fósforo].

Las opinas son sintetizadas en los tumores por las células vegetales transformadas bajo la dirección de genes que se encuentran en los fragmentos de ADN que son transferidos a la planta desde la bacteria. Por otro lado, habitualmente, los genes

necesarios para su catabolismo se encuentran en una región del plásmido Ti que no se transfiere a la planta. En general, existe una estrecha relación entre el plásmido que origina la transformación y la aptitud de este plásmido para metabolizar sólo los mismos tipos de opinas que las que él induce (Petit *et al.*, 1970; Dessaux y Petit, 1994; Han *et al.*, 1997) por lo que los plásmidos Ti se clasifican según la opina que sintetiza la célula vegetal transformada por él. En la Tabla 3 se muestran las opinas que induce cada uno de los principales tipos de plásmidos, ya que una célula transformada puede producir generalmente más de una clase de opina.

Tabla 3: Clasificación de los plásmidos Ti según las opinas relacionadas.

<b>Tipo de plásmido</b>	<b>Opinas sintetizadas</b>	<b>Opinas que inducen la transferencia del plásmido</b>
Octopina	Octopina, ácido octopínico, lisopina, histopina, agropina, manopina y ácidos agropínico y manopínico	Octopina, ácido octopínico y lisopina
Nopalina	Nopalina, ácido nopalínico y agrocinopinas A + B	Agrocinopinas A + B
Agropina	Agropina, manopina, ácidos agropínico y manopínico, agrocinopinas C + D, leucinopina, lactamo de leucinopina y L,L succinamopina	Agrocinopinas C + D
Succinamopina	D, L succinamopina, lactamo de succinamopina, succinopina y nopalina	Desconocida
Lippia	Agrocinopinas C + D	Desconocida
Crisopina/ Succinamopina	Crisopina, deoxifructosil -5 oxiprolina, L,L succinamopina y L,L leucinopina	Desconocida
Crisopina /Nopalina	Crisopina, deoxifructosil -5 oxiprolina y nopalina	Desconocida
Vid tipo I	Octopina y cucumopina	Desconocida
Vid tipo II	Nopalina	Desconocida
Vid tipo III	Vitopina y rideopina	Desconocida

Tomado de Dessaux *et al.*, (1998)

Las opinas juegan un papel central en la relación huésped transformado / *Agrobacterium* patógeno, ya que son los mediadores químicos de este parasitismo (Dion *et al.*, 1996). Además de otras funciones, promueven la conjugación del plásmido Ti a cepas no patógenas (Petit *et al.*, 1978; Ellis *et al.*, 1982) y estimulan los genes de virulencia incrementando con ello la transformación (Veluthambi *et al.*, 1989).

En un principio se creyó que las cepas de *Agrobacterium* que contenían el plásmido Ti eran las únicas capaces de utilizar las opinas, pero se ha observado que una amplia variedad de microorganismos puede hacerlo. Entre ellos, existen hongos del género

*Fusarium* y *Cylindrocarpon* (Beauchamp *et al.*, 1990), bacterias Gram-positivas pertenecientes al género *Arthrobacter* (Tremblay *et al.*, 1987; Nautiyal *et al.*, 1991), Gram-negativas del género *Pseudomonas*, fluorescentes y no fluorescentes (Nautiyal y Dion, 1990; Nautiyal *et al.*, 1991; Canfield y Moore, 1991), *Rhizobium* (Bergeron *et al.*, 1993) y agrobacterias no patógenas (Lippincott *et al.*, 1973; Nautiyal y Dion, 1990; Canfield y Moore, 1991). En algunos de estos géneros mencionados, como en *Pseudomonas*, los genes responsables de su catabolismo difieren, en su estructura y regulación, de los existentes en los plásmidos Ti. En otros, como *Rhizobium meliloti*, taxonómicamente muy próximo a *Agrobacterium*, los genes para el catabolismo de las opinas están regulados de forma similar a los genes presentes en el plásmido Ti. En las cepas de *Agrobacterium* no patógenas esta capacidad parece que está codificada, en ausencia del plásmido Ti, por genes cromosómicos o más frecuentemente por genes presentes en plásmidos diferentes del Ti y probablemente derivados de él (Dessaux *et al.*, 1986b; Sans *et al.*, 1987; Cho *et al.*, 1996, 1997).

### i.1.3. Características genotípicas

Durante mucho tiempo se consideró que los genomas bacterianos consistían en un único cromosoma circular, el paradigma de *E. coli*. El descubrimiento de la existencia de múltiples cromosomas circulares o de cromosomas lineales en algunas bacterias invalidó este modelo: se han descrito dos cromosomas circulares en *Rhodobacter spheroides* (Suwanto y Kaplan, 1989), *Brucella melitensis* 16M (Michaux *et al.*, 1993) y *Leptospira interrogans* (Zuerner *et al.*, 1993), mientras que se han observado tres cromosomas en los genomas de *Rhizobium meliloti* (Sobral *et al.*, 1991) y de *Burkholderia cepacia* (Cheng y Lessie, 1994). Se observó por primera vez un cromosoma lineal en las bacterias Gram-positivas *Rhodococcus fascians* (Crespi *et al.*, 1992) y *Streptomyces lividans* (Lin *et al.*, 1993).

La estructura cromosómica de *A. tumefaciens* y de al menos un aislado de *A. rubi* consta de dos cromosomas, uno circular y otro lineal (Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2001; Goodner *et al.*, 2001). Esta organización es única dentro de las bacterias y es distinta a la de otros miembros de la familia *Rhizobiaceae* que contienen uno o dos cromosomas circulares dependiendo de la especie y del aislado (Jumas-Bilak *et al.*, 1998). Más concretamente, el genoma de la cepa C58 de *A. tumefaciens* se ha demostrado que

consta de cuatro replicones: dos cromosomas, uno circular de 2,8 Mb y otro lineal de 2 Mb, y dos plásmidos de gran tamaño (450 y 195 kb) (Allardent-Servent *et al.*, 1993; Wood *et al.*, 2001; Goodner *et al.*, 2001).

Los plásmidos presentes en la mayor parte de los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, algunos de gran tamaño, pueden llegar a constituir el 40% de su genoma. Estos plásmidos juegan un papel muy importante en la interacción de la bacteria con la planta. En un estudio realizado por Albiach y López (1992) en el género *Agrobacterium*, las cepas estudiadas, de diferentes biovars y orígenes, tenían de uno a cinco plásmidos con tamaños comprendidos entre 5 y 1000 Kb.

Durante cierto tiempo se consideró que los plásmidos eran elementos genéticos accesorios para la bacteria, actualmente se sabe que aunque no parecen ser absolutamente indispensables para el crecimiento de la misma en laboratorio, condicionan de forma esencial su capacidad para sobrevivir en su hábitat natural, para competir con otras bacterias, y para interaccionar con plantas (Moënné Loccoz y Weaver, 1995, 1996). Ejemplos de actividades codificadas en plásmidos en especies de *Rhizobiaceae* son: los genes de transporte de dicarboxilato (Finan *et al.*, 1988; Watson *et al.*, 1988), de síntesis de exopolisacáridos (Finan *et al.*, 1986), de lipopolisacáridos (Hynes y McGregor, 1990; Baldani *et al.*, 1992; Brom *et al.*, 1992); de síntesis de tiamina (Finan *et al.*, 1986); de transporte de fosfato y utilización de fosfonato (Bardin *et al.*, 1996); o de melanina (Hynes *et al.*, 1988; Mercado-Blanco *et al.*, 1993) entre otros.

#### i.1.3.1 El plásmido inductor de tumores (Ti)

La mayoría de los genes involucrados en la formación de tumores de *Agrobacterium* están codificados en plásmidos (Van Larebeke *et al.*, 1974; Hooykaas *et al.*, 1977; Costantino *et al.*, 1980; Holsters *et al.*, 1980) como lo son la mayoría de los genes de la nodulación y fijación de nitrógeno en todos los *Rhizobium* como *R. leguminosorum*, *R. etli*, y *R. meliloti*, con la excepción de *R. loti* (Sullivan *et al.*, 1995).

En el género *Agrobacterium* el plásmido más característico es el Ti y la mayoría de los genes que contiene juegan papeles directos o indirectos en la tumorigénesis. Este plásmido tiene un tamaño de entre 150 a 250 Kb (Zaenen *et al.*, 1974; Sciaky *et al.*, 1978; Wood *et al.*, 2001), aunque se han encontrado plásmidos Ti de hasta 500 Kb (Unger *et al.*,

1985). La composición media en G+C del plásmido es del 55%, aunque algunos segmentos son más ricos en A-T, como el ADN-T. Se han contabilizado hasta 198 secuencias de lectura abierta (ORFs) y probablemente todas codifican proteínas funcionales (Wood *et al.*, 2001). Dentro de ellas, hay 25 en una región contigua de 24 Kb cuyos productos no poseen funciones conocidas (Zhu *et al.*, 2000) (Figura i.2).

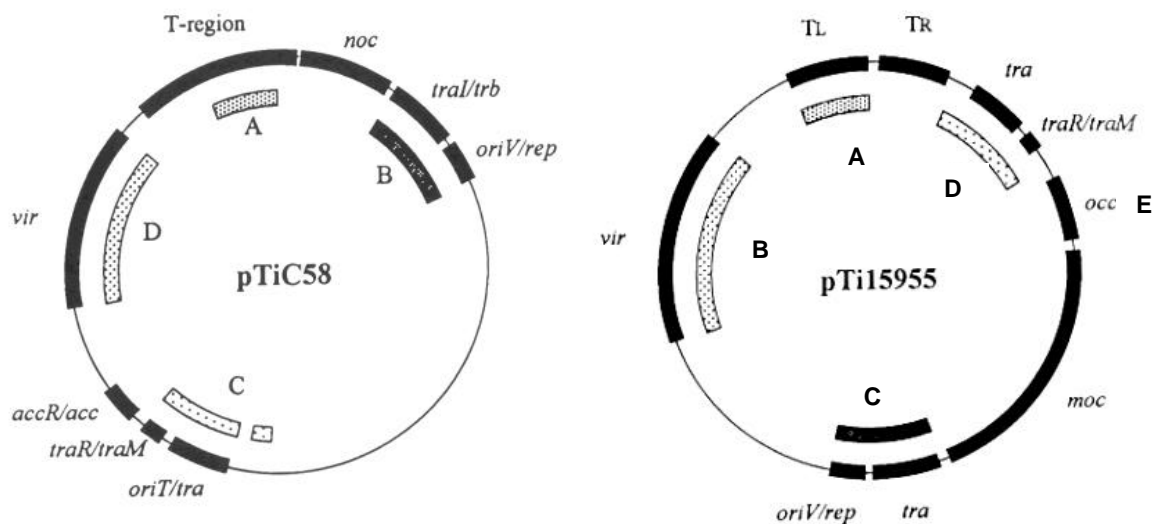


Figura i.2. Organización funcional del plásmido Ti tipo nopalina (pTiC58) con sus diferentes áreas y del plásmido tipo octopina (pTi15955). Tomado de Dessaux *et al.*, (1998)

Hay una gran diversidad de plásmidos Ti y se clasifican según el tipo de opina que sintetizan. Los más estudiados son los plásmidos de nopalina/agrocinopina (como los pTiC58, pTiT37) y los plásmidos de octopina/manopina (pTiB6, PtiAch5, pTiR10 y pTi15955) (Currier y Nester, 1976; Depicker *et al.*, 1977). Los plásmidos de tipo octopina tienen en común unas 65 Kb respecto al pTiC58, pero el resto de las 130 Kb no lo son (Engler *et al.*, 1981).

La organización genética del plásmido Ti puede verse como una disposición en mosaico donde las regiones están más o menos bien conservadas. Globalmente, presenta una estructura modular con genes de funciones similares agrupados juntos. Así, podemos definir cinco componentes: (A) la región T, que codifica las secuencias que son

transferidas a la planta huésped; (B) la región *vir*, que dirige el procesamiento y transferencia del ADN-T; (C) los loci *tra* y *trb*, que dirigen la transferencia conjugativa del plásmido Ti y que, a diferencia de los otros componentes, no están agrupados sino separados por 60 Kb; (D) la región *rep* que se requiere para la replicación del plásmido Ti; y (E) los genes que dirigen la adquisición y el catabolismo de las opinas (Zhu *et al.*, 2000).

#### A) REGIÓN T o ADN-T

Es el segmento de ADN que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal (Chilton *et al.*, 1977). A diferencia de los elementos transponibles que pueden moverse repetidamente, el ADN-T una vez transferido permanece estable, y no codifica por sí mismo los productos que median su transferencia (Joos *et al.*, 1983; Leemans *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1983). El tamaño del ADN-T varía según el tipo de plásmidos, pero sólo los extremos, llamados bordes, se reconocen durante el proceso de transferencia (Wang *et al.*, 1984; Peralta y Ream, 1985). Estos bordes están formados por 25 pb que flanquean la región del ADN-T como repeticiones directas (Zambryski *et al.*, 1982). Estas secuencias borde dirigen la transferencia de forma polar, en dirección derecha-izquierda, determinada por la orientación de los extremos repetidos, siendo el borde derecho imprescindible para la formación del tumor (Joos *et al.*, 1983; Shaw *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1984).

Los plásmidos de tipo nopalina tienen una única región ADN-T, mientras que los del tipo octopina y agropina tienen dos: T<sub>L</sub> (izquierda) y T<sub>R</sub> (derecha), separadas por una región central T<sub>C</sub> (Thomashow *et al.*, 1980). Al estar estos fragmentos rodeados de las secuencias borde, pueden transferirse de forma independiente unos de otros.

Otra diferencia entre los dos tipos de plásmidos es la presencia, en los de octopina, de una secuencia intensificadora de 24 pb llamada *OVERDRIVE*, que aumenta la eficiencia de la transferencia (Peralta *et al.*, 1986). Se sitúa a la derecha y dentro de las 60 pb siguientes de los extremos derechos de los bordes de los elementos T<sub>L</sub> y T<sub>R</sub>.

En la naturaleza, lo que transfiere *Agrobacterium* son dos grupos de genes que participan en la formación del tumor y en la síntesis de opinas. Los genes que dirigen la producción de hormonas del crecimiento responsables de la proliferación de las células vegetales transformadas son:



- *iaaM* e *iaaH* que dirigen la conversión del triptófano vía indolacetamida a la auxina ácido indolacético (Inzé *et al.*, 1984; Schroder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984)
- *ipt* o *tmr* cuyo producto condensa isopentenil pirofosfato y AMP, que convierten en isopentenil-adenosina, una citoquinina (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984).
- El producto del gen *5* dirige la síntesis de indol-3-lactato, un análogo antagonista de la auxina, que limitaría su producción por debajo de los niveles tóxicos de esta hormona (Körber *et al.*, 1991)
- El gen *6a* codifica una permeasa que transporta las opinas a través de membranas (Messens *et al.*, 1985).
- El gen *6b* aumenta la sensibilidad de las células de la planta a las fitohormonas de forma aún desconocida (Hooykaas *et al.*, 1988), pero se cree que está involucrado en la respuesta hormonal (Wabiko y Minemura, 1996).

El segundo grupo de genes transferidos dirige la producción de opinas, y dependiendo del tipo de plásmido habrá distintos genes que codifiquen las diferentes enzimas para la síntesis (Tempé y Goodman, 1982; Ellis *et al.*, 1984; Dessaux *et al.*, 1986a), a saber:

- *nos* – nopalina sintetasa
- *ocs* – octopina sintetasa
- *ags* – agropina sintetasa
- *mas 1'* y *mas 2'* – manopina sintetasa

Un plásmido determinado puede provocar, al transformar una célula vegetal, que ésta sintetice más de un tipo de opina. Así por ejemplo, un plásmido tipo octopina dependiendo si transfiere  $T_L$  y/o  $T_R$  puede inducir la síntesis de hasta ocho opinas diferentes (Tabla 3).

## B) REGIÓN *vir*

La región de virulencia es otro componente codificado por el plásmido  $T_i$  y contiene los genes necesarios para procesar y transferir el ADN-T. Está formada por un

segmento de 35 Kb que contiene 20 genes esenciales para la inducción de tumores en la mayoría de las plantas huésped. Se compone de seis operones principales: *virA-B-G-C-D-E* comunes tanto en plásmidos tipo octopina como nopalina (Figura i.3). Estos operones tienen una regulación común por lo que componen un REGULÓN (Stachel y Zambryski, 1986).

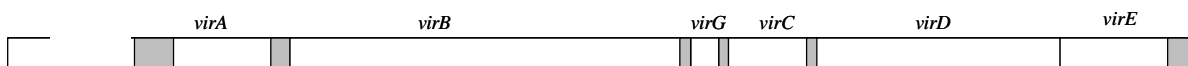


Figura i.3. Genes de la región *vir* del plásmido de nopalina de la cepa C58.

El operón *virA* codifica una única proteína con actividad autoquinasa que actúa como sensor ambiental (Melchers *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 1990b). Su producto está implicado, directa o indirectamente, en la detección de pH ácido (5 – 5.5), temperatura, monosacáridos y compuestos fenólicos.

El operón *virB* contiene 11 genes (Christie, 1997). Todos, excepto *virB1*, son esenciales para la tumorigénesis (Ward *et al.*, 1990; Berger y Christie, 1994) y codifican proteínas localizadas en la membrana interna o externa. Los productos de este operón intervienen tanto en la formación del canal transmembranar, que permite la salida de la cadena-T de la célula bacteriana y su entrada en la célula vegetal, como en el suministro de la energía necesaria en este proceso. Este canal representaría una estructura similar al PILUS que se produce en la conjugación bacteriana, aunque más frágil que éste (Fullner *et al.*, 1996).

El papel de las proteínas codificadas por cada uno de los 11 genes *virB* no está totalmente aclarado, quizás este punto, la formación del poro, sea el más oscuro dentro de todo el proceso de transformación. De algunas de las proteínas se especulan las funciones que pueden realizar dependiendo de su localización y el tipo de actividad que llevan a cabo. Así, se sabe que la proteína VirB2 es el mayor componente del PILUS (Lai y Kado, 1998). VirB5 parece estar directamente involucrada en su agregación, posiblemente como un componente minoritario (Schimdt-Eisenlohr *et al.*, 1999), mientras que las proteínas VirB6-B7-B8-B9 y B10 serían las constituyentes del poro de transporte. VirB6,

B8 y B10 forman un complejo en la parte interior de la membrana mientras VirB7 y B9 forman un complejo en la parte externa (Das y Xie, 1998). VirB7 puede ayudar a anclar el PILUS a la célula bacteriana ya que es una lipoproteína de membrana externa. VirB7 interacciona con la proteína VirB9, que está localizada en el periplasma, mediante la formación de enlaces disulfuro, creándose un heterodímero que actuaría como un centro de agregación que uniría la membrana interna y externa. Este heterodímero estabilizaría a las proteínas VirB8 y VirB10 de la membrana interna, para la formación del poro de transporte (Das y Xie, 2000). Las proteínas VirB4 y VirB11 tienen actividad ATPasa y proporcionarían la energía necesaria tanto para el montaje del canal como para el transporte de la cadena-T (Christie *et al.*, 1989 ; Shirasu *et al.*, 1994; Sagulenko *et al.*, 2001).

VirC1 y VirC2 son las dos proteínas que codifica el operón *virC*. En principio, no se requieren para el procesamiento pero sí para la transferencia eficaz del ADN-T en muchos huéspedes (Yanofsky *et al.*, 1985; Kado, 1991). Además, VirC1 se une a la secuencia OVERDRIVE del plásmido de octopina (Toro *et al.*, 1989).

Las proteínas requeridas para el corte de las secuencias borde del ADN-T son codificadas por el operón *virD*. Una vez cortada, la proteína VirD2 permanece covalentemente unida al extremo 5' de la cadena-T (Yanofsky *et al.*, 1986; Stachel *et al.*, 1987). Este enlace ADN-proteína es de tipo fosfodiéster, una unión de alta energía y reversible, por lo que su reacción inversa se cree que proporcionaría la energía suficiente para la integración de la cadena-T en el genoma vegetal (Tinland *et al.*, 1995).

La proteína VirD4, que se localiza en la membrana interna, es indispensable para la transferencia y parece que conecta el complejo-T (VirD2 + ADN-T) al canal transmembranar formado por las proteínas VirB (Okamoto *et al.*, 1991; Lin y Kado, 1993).

El operón *virE* codifica dos proteínas, VirE1 está implicada en el transporte de la proteína VirE2 de *Agrobacterium* a la célula vegetal (Sundberg *et al.*, 1996). VirE2 es una proteína que se asocia cooperativamente con secuencias de ADN de cadena simple (Das, 1988). Se une al complejo-T en el citoplasma de la célula vegetal (Gelvin, 1998). Al igual que la proteína VirD2, contiene señales de localización nuclear ("Nuclear Localization

Signals” NLS) que ayudan al transporte del complejo-T desde el citoplasma hasta el núcleo de la célula vegetal (Citovsky *et al.*, 1992).

El último operón imprescindible para el procesamiento y transferencia del ADN-T es el *virG*. Este operón codifica un único producto que es el activador de la transcripción de los otros genes *vir* (Jin *et al.*, 1990a). Junto a la proteína VirA, VirG regula la expresión de los genes *vir* y, con ello, todo el proceso de infección de *Agrobacterium*. La expresión tanto de *virA* como de *virG* es constitutiva (Stachel y Zambryski, 1986). (Figura i.4)

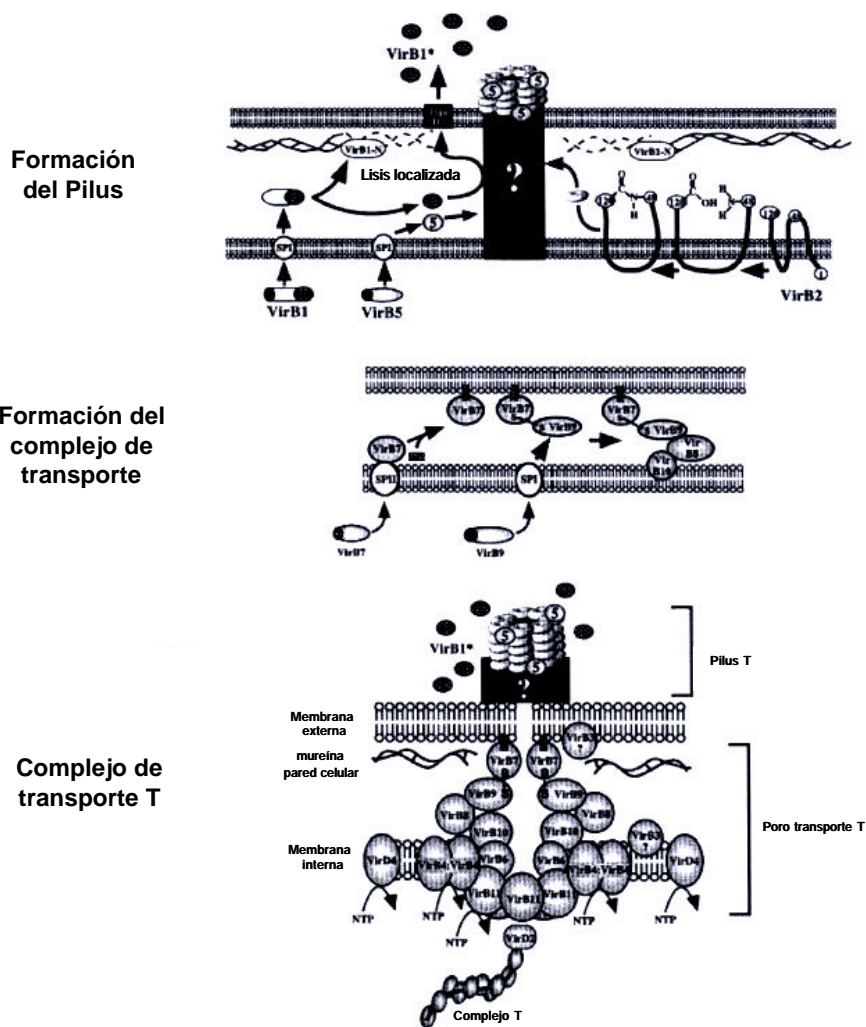


Figura i.4. Formación del complejo de transporte T por parte de las proteínas de la región *vir*. Tomado de Zupan *et al.*, (2000).

Otros miembros del regulón *vir* no son esenciales para la tumorigénesis en todos los huéspedes y puede que sean necesarios solo en algunos concretos o jugar otros papeles

en la patogénesis, estos son *virD5*, *E3*, *F*, *H*, *J*, *K*, *L*, *M*, *P* y *R* (Kalogeraki y Winans, 1998; Kalogeraki *et al.*, 2000). En algunos casos, la falta de una intervención esencial en la formación del tumor podría ser consecuencia de una redundancia funcional. Por ejemplo, *virJ*, que solo existe en los plásmidos tipo octopina, codifica una proteína que ayuda a la exportación de la cadena-T a la célula vegetal. Esta misma proteína es codificada por un gen cromosómico homólogo, *acvB* (Kalogeraki y Winans, 1995). El operón *virH* consta de dos genes cuyos productos son similares a las enzimas de la familia de las monooxigenasas del citocromo P450 y, al igual que éstas, inactivan los compuestos fenólicos inductores de los genes *vir* (Kanemoto *et al.*, 1989; Kalogeraki *et al.*, 1999).

### C) LOCI *tra* y *trb*

Ambos loci conforman el sistema de transferencia conjugativa. Basándose en la similitud con otros sistemas de conjugación, el grupo de genes *tra* se necesita, probablemente, para la transferencia y replicación del ADN, mientras que el *trb* forma el par de apareamiento y dirige la síntesis del PILUS conjugativo.

La importancia biológica de la conjugación radica en que permite la transferencia del plásmido Ti de la cepa donante de *Agrobacterium* a una cepa no patógena con lo que ésta adquiere, una vez transferido el plásmido, la capacidad de producir tumores (Genetello *et al.*, 1977; Kerr *et al.*, 1977). Este proceso es inducido por la presencia de opinas y autorregulado por un activador transcripcional (TraR). Este activador necesita una lactona específica para activar la expresión de los genes *tra* (Zhang *et al.*, 1993). Esta lactona se sintetiza en el citoplasma de la bacteria pero se difunde a través de la envuelta celular actuando como una feromona bacteriana, proporcionando un mecanismo para estimar la densidad de población (Fuqua *et al.*, 1996)

### D) REGIÓN *rep*

Para la replicación estable del plásmido Ti en *Agrobacterium* se requieren tres genes. *repA* y *repB* se encargan de que durante la división celular, cada célula hija herede al menos una copia del plásmido. El único imprescindible para la replicación vegetativa del plásmido es *repC*. Las funciones de incompatibilidad entre plásmidos también están reguladas por esta región. Se define como incompatibilidad la incapacidad de heredar dos plásmidos

determinados de forma estable, pudiendo coexistir dentro de la misma célula antes de su replicación, así, los plásmidos del tipo octopina son incompatibles con los de nopalina, por ejemplo (Hooykaas *et al.*, 1980).

## E) ADQUISICIÓN Y CATABOLISMO DE OPINAS

Esta región está compuesta aproximadamente por unos 40 genes que codifican las enzimas requeridas para estas dos funciones. Entre ellas se incluyen unas seis permeasas y doce enzimas catabólicas (Zhu *et al.*, 2000). Es característico que los plásmidos Ti codifiquen solo para el catabolismo de aquellas opinas que se corresponden con los genes de biosíntesis localizados en su ADN-T. La regulación de estos genes es inducida por las mismas opinas que catabolizan (Petit *et al.*, 1970).

### i.1.3.2 Genes cromosómicos

En el plásmido Ti están dos de los tres componentes genéticos que se requieren para la transformación de la célula vegetal: el ADN-T y la región *vir*. El tercer componente lo forman tres loci de virulencia que se encuentran en el cromosoma: *chvA*, *chvB* y *pscA* (Douglas *et al.*, 1982; 1985; Thomashow *et al.*, 1987). Los productos de estos loci afectan de forma especial a la composición de la superficie de las células bacterianas, y son esenciales para la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales durante el proceso de infección. Los loci *chvA* y *chvB* están unidos a una distancia de 15 Kb en un mismo segmento del cromosoma. La porción *chvB* codifica una proteína de membrana que actúa como intermediaria en la síntesis de  $\beta$ -glucano (Zorreguieta *et al.*, 1988), mientras *chvA* codifica una proteína que transporta el  $\beta$ -glucano al periplasma (Cangelosi *et al.*, 1989). La expresión del locus *pscA* es necesaria para la síntesis de los polisacáridos ácidos y neutros mayoritarios indispensables para la unión (Thomashow *et al.*, 1987). Al contrario que la expresión de los genes *vir*, que está fuertemente controlada, la de los genes cromosómicos es constitutiva. La secuenciación de todo el genoma de la cepa de *A. tumefaciens* C58 ha permitido la identificación de genes cuyos productos son similares a proteínas de virulencia de patógenos de plantas que se requieren para la degradación de la pared celular, que incluyen pectinasa (gen *kdgF*), lignasa (gen *ligE*) y xylanasa, así como reguladores de la producción de pectinasa y celulasa (genes *pecS/M*) (Wood *et al.*, 2001).

i.2 Proceso de inducción tumoral

Los descubrimientos más importantes del proceso tumoral se basan en las siguientes características: la tumorigénesis requiere la transferencia de fragmentos de ADN oncogénico a células de la planta infectadas; este proceso evolucionó a partir de un sistema de transferencia conjugativa; los genes que dirigen este proceso se expresan en respuesta a señales químicas que libera el huésped.

Se han descrito al menos siete pasos en la inducción tumoral: 1- Reconocimiento de una célula vegetal susceptible, 2- Unión de la bacteria a la célula vegetal, 3- Inducción de la expresión de los genes *vir*, 4- Producción de una copia transferible de ADN-T, 5- Transferencia del complejo-T a la célula vegetal, 6- Integración del complejo-T en el genoma nuclear de la planta, 7- Expresión de los genes que contiene (Sheng y Citovsky, 1996). En la Figura i.5 se representa un esquema del proceso.

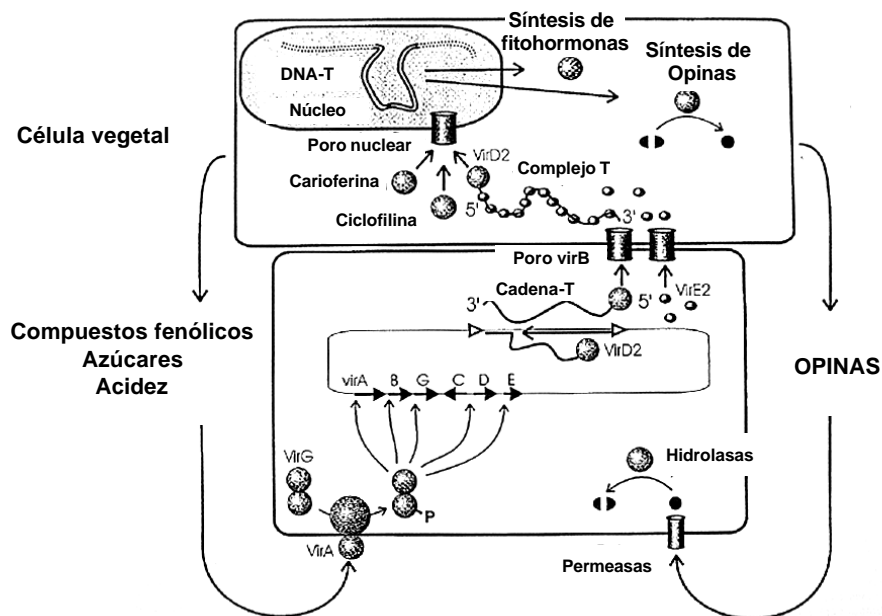


Figura i.5. Proceso de inducción tumoral. Etapas en las que intervienen las diferentes proteínas involucradas. Tomado de Zhu *et al* (2000)

Mientras que durante los pasos iniciales de la transferencia se utilizan procesos bacterianos bien conservados, en los pasos finales se requieren otras rutas relacionadas con el desarrollo y crecimiento de la planta.

### i.2.1 Reconocimiento de una célula vegetal susceptible

Desde los inicios del estudio de esta enfermedad se comprobó que la bacteria necesita heridas en la planta para causar la infección. Este hecho se podría explicar de forma simple asumiendo que las células de plantas dañadas presentan una barrera física menor a la penetración e infección que las células no dañadas, al poseer éstas las paredes celulares intactas. Sin embargo, se sabe que las células dañadas secretan compuestos fenólicos de bajo peso molecular que son reconocidos de forma específica como moléculas señal. *Agrobacterium* migra a través de un gradiente de concentración de estos compuestos hacia la herida (Kado, 1991). Estos compuestos fenólicos son principalmente acetosiringona (AS) e hidroxacetosiringona (OH-AS) (Stachel *et al.*, 1985). Estas moléculas son similares a productos del metabolismo del fenilpropanoide, una de las rutas metabólicas que proporciona la mayoría de los metabolitos secundarios de las plantas, que conduce a la producción de ligninas y flavonoides. La lignina es el mayor componente de la pared celular y proporciona una barrera física contra la invasión por patógenos, mientras que los flavonoides incluyen una variedad de compuestos que producen aroma, color y sabor, así como moléculas antimicrobianas específicas como las fitoalexinas (Darvill y Albersheim, 1984). *Agrobacterium*, por tanto, usa estos compuestos como señales de la presencia de una planta potencialmente susceptible.

### i.2.2 Unión de la bacteria a la célula vegetal

Una vez que *Agrobacterium* llega a la herida se produce una débil unión inicial, de forma polar y que es reversible (Matthysse, 1983). Posteriormente, las bacterias elaboran fibrillas de celulosa que las anclan firmemente a la superficie del huésped (Matthysse *et al.*, 1981). Los genes cromosómicos de virulencia *chvA*, *chvB* y *pscA* son los que están implicados en esta unión.

La unión bacteriana a la célula vegetal es saturable y, probablemente, está mediada por una molécula sensible a la proteasa que se encuentra en la superficie de la célula



vegetal. Dos proteínas de la pared celular se han propuesto como responsables de la unión: una proteína similar a la vitronectina (Wagner y Matthyse, 1992) y una proteína de unión ricoadhesina (Swart *et al.*, 1994). Sin embargo, el posible papel de estas proteínas vegetales aún no ha sido demostrado mediante análisis genéticos (Figura i.6).

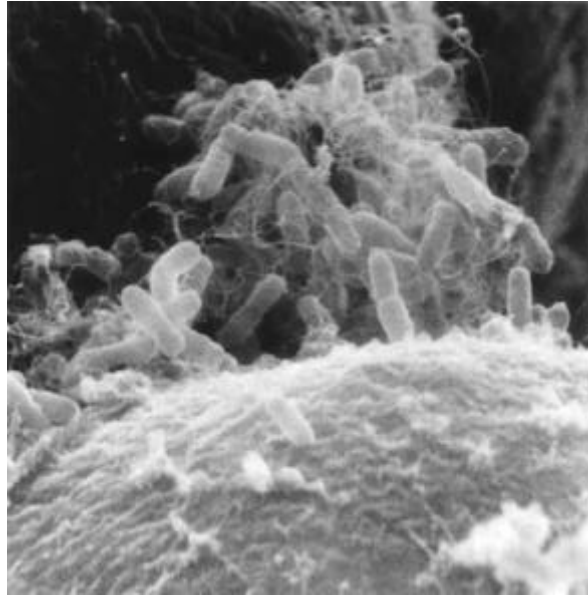


Figura i.6. Unión de la bacteria a la célula vegetal. Microfotografía que muestra la agregación de bacterias a la célula vegetal. Tomado de Matthyse *et al.*, (1981).

### i.2.3 Inducción de la expresión de los genes *vir*

Cuando los compuestos fenólicos de bajo peso molecular están a una concentración de  $10^{-5}$  M y el pH se encuentra entre 5.0 y 5.8 se activan los genes *vir* (Kado, 1991). La acidez es necesaria para protonar los compuestos fenólicos y así incrementar su permeabilidad de membrana. Esta inducción es un proceso lento que tarda en llegar a los máximos niveles de expresión de 8 a 16 horas (Klee *et al.*, 1987).

Esta activación de los genes *vir* es inducida también por azúcares de forma sinérgica o no con la acetosiringona (Ankenbauer y Nester, 1990; Shimoda *et al.*, 1990). Todos los inductores actúan sobre el operón *virA* cuyo producto se autofosforila y, directa o indirectamente, este grupo fosfato de alta energía es transferido a la proteína VirG que pasa a su forma activa y estimula la transcripción del resto de genes del REGULÓN *vir* (Jin *et al.*, 1990b; 1990c).

#### i.2.4 Producción de una copia transferible de ADN-T

Una vez que los operones *vir* empiezan a transcribirse se produce el proceso de síntesis de la cadena-T. Las proteínas codificadas por el operón *virD* reconocen las secuencias terminales que delimitan el ADN-T (Yanofsky *et al.*, 1986). La proteína VirD1 pasa el ADN superenrollado a la forma relajada (Ghai y Das, 1989) y, a continuación, VirD2 corta la cadena de ADN inferior por los extremos repetidos – en el plásmido del tipo octopina cada borde es cortado exactamente a cuatro nucleótidos de su extremo izquierdo- y se une covalentemente, a través de un residuo de tirosina 29, al extremo 5' de cada cadena rota (Ward y Barnes, 1988; Vogel y Das, 1992). Mientras la cadena superior permanece en forma de dúplex, aproximadamente la mitad de las inferiores están en forma lineal de cadena simple y se denominan cadena-T (Stachel *et al.*, 1986). Se piensa que la cadena-T se forma por desplazamiento durante la síntesis del ADN mediante el mecanismo de círculo giratorio “rolling-circle” que se inicia a partir del extremo 3' de cada borde derecho. La proteína VirD2, que está fuertemente unida a la cadena-T, le confiere polaridad asegurando que el extremo 5' sea el que entre primero en el núcleo de la célula vegetal. Este complejo ácido nucleico / proteína está compuesto por una única molécula VirD2 –que actúa de piloto gracias a sus secuencias tipo NLS - unida a un ADN de cadena simple que se denomina complejo-T (Howard *et al.*, 1992; Narasimhulu *et al.*, 1996; Zupan *et al.*, 2000).

#### i.2.5 Transferencia del complejo-T a la célula vegetal

En este proceso un segmento de ADN específico, el complejo-T, es reconocido y movilizado. Esta copia debe ser transportada hasta la membrana bacteriana, atravesar en primer lugar la membrana y pared bacterianas y, posteriormente, la pared celular y la membrana de la célula vegetal. Una vez en la célula vegetal debe moverse a través del citoplasma y cruzar la membrana nuclear hasta llegar al núcleo de la célula vegetal.

VirD2 guía a la cadena-T a través del PILUS compuesto por las proteínas VirB y la proteína VirD4. Aunque se sabe que la formación del PILUS es imprescindible para la transformación, no se sabe si el complejo pasa a través del él o si el PILUS simplemente serviría como un gancho para acercar la bacteria a la célula vegetal (Gelvin, 2000).

La proteína VirE2 también parece jugar un papel importante como guía del complejo-T ya que posee, como VirD2, secuencias NLS que median en su transporte del citoplasma al núcleo de la célula vegetal (Citovsky *et al.*, 1992; Zupan *et al.*, 2000). Esta proteína se une firme y cooperativamente a ácidos nucleicos de cadena simple formando filamentos cilíndricos enrollados (Citovsky *et al.*, 1997). Se creyó en un principio que VirE2 se unía al complejo-T dentro de la bacteria pero se han encontrado evidencias genéticas que demuestran que se transfieren de forma separada a la célula vegetal, formando un complejo en su citoplasma (Sundberg *et al.*, 1996; Gelvin, 1998, 2000). Por tanto, ambas proteínas VirD2 y VirE2 dirigen la cadena-T hacia el núcleo de la célula vegetal, pero también pueden hacerlo en levaduras o en células animales (Guralnick *et al.*, 1996; Relic *et al.*, 1998).

En el transporte hacia el núcleo también están implicadas diferentes proteínas de las plantas como la  $\alpha$ -carioferina (Ballas y Citovsky, 1997) o la ciclofilina (Deng *et al.*, 1998) que interaccionan con las secuencias NLS de las proteínas Vir. Las ciclofilinas parece que mantienen a la proteína VirD2 en una conformación adecuada para la transferencia, mientras el complejo-T se mueve por el citoplasma.

En muchos aspectos la transferencia del complejo-T recuerda a la transferencia conjugativa del ADN plasmídico (Lessl y Lanka, 1994) y se ha comprobado que existen grandes similitudes de secuencia entre las proteínas Vir y las Tra (Kado, 1994 ; Lessl *et al.*, 1992), lo que sugiere que el aparato de transferencia del ADN evolucionó a partir del sistema de transferencia conjugativa.

#### i.2.6 Integración del complejo-T en el genoma nuclear de la planta

Esta etapa del proceso es poco conocida. En principio, el ADN-T se integra en el cromosoma vegetal por recombinación ilegítima, que es la forma mayoritaria de integración de ADN foráneo en plantas (Matsumoto *et al.*, 1990; Gheysen *et al.*, 1991; Mayerhofer *et al.*, 1991). Es probable que la mayor parte del ADN-T transferido al núcleo no se integre establemente, ya que el nivel de expresión transitoria es muy superior comparado con la estable (Castle y Morris, 1990 ; Janssen y Gardner, 1990; Nam *et al.*, 1997).

El ADN-T entra en el núcleo como una molécula de cadena simple (Tinland *et al.*, 1994; Yusibov *et al.*, 1994; Gelvin *et al.*, 2000). Se desconoce si se integra en una zona del ADN vegetal localmente desnaturalizado como cadena simple y después se sintetiza la segunda cadena o si pasa a ser de doble cadena antes de la integración.

El punto de integración parece que es al azar y que no hay requisitos de secuencia específicos en el genoma vegetal para que se produzca (Mayerhofer *et al.*, 1991), aunque se ha descrito que la integración se produce preferentemente en zonas con la secuencia de ADN en estado de transcripción activa (Koncz *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990).

Además de los componentes bacterianos, hay también funciones de la planta esenciales para la integración como las enzimas para la recombinación y reparación del ADN. Actualmente, la implicación de otras proteínas vegetales en esta etapa se está investigando (Nam *et al.*, 1999; Mysore *et al.*, 2000).

#### i.2.7. Expresión de los genes del ADN-T

Una vez que las copias del ADN-T se insertan establemente en el genoma vegetal, se transmiten a las células hijas mediante meiosis o mitosis, comportándose como un locus más de la planta y confiriendo el fenotipo transformado a las células que lo alojan (Spielman y Simpson, 1986).

Una vez integrado, los genes del ADN-T se expresan en altos niveles ya que contienen señales de transcripción eucariota (Chilton *et al.*, 1980; Willmitzer *et al.*, 1983). De este modo, se transcriben los genes que producen la síntesis de auxinas y citoquininas que, finalmente, provocan la aparición del tumor y también los que sintetizan las opinas que, a su vez, regulan positivamente los genes para su catabolismo, para la conjugación bacteriana y que estimulan la expresión de los genes de virulencia.

La aparición del tumor no solo depende de la expresión del ADN-T integrado, sino también de la respuesta de la célula vegetal a las hormonas sintetizadas. Esta respuesta del huésped, fenotipo TUMOR, depende en última instancia del metabolismo de las hormonas, ya que se requiere un nivel mínimo para que se produzca y, aunque se transforme la célula, si no es alcanzado éste, no se traduce en tumor.

Un fallo en cualquiera de los siete pasos del proceso que se acaba de exponer implicaría un fracaso en la transformación, en la formación del tumor o una reducción de

la virulencia. Sin embargo, se ha visto que son deficiencias en la inducción de los genes *vir* o en el ADN-T los que más frecuentemente contribuyen o bien a reducir el rango de huéspedes o bien a una pérdida del poder patógeno (Kao *et al.*, 1982; Buccholz y Thomashow, 1984; Hirooka y Kado, 1986; Jin *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1990).

### i.3. Estructura de las poblaciones de *Agrobacterium*

La explosión de información molecular acerca del proceso de infección de *Agrobacterium* en condiciones controladas contrasta con el menor conocimiento acerca de la ecología de la bacteria (Duncan *et al.*, 1992; Picard *et al.*, 1994; Mougél *et al.*, 2001). Sin embargo, un manejo adecuado de la enfermedad precisa comprender la diversidad y la dinámica de las poblaciones de *Agrobacterium*. De hecho, determinados trabajos de investigación que se realizan con pocas cepas pueden llevar a conclusiones falsas sobre la biología de las agrobacterias por no tener en cuenta la heterogeneidad de sus poblaciones. Por ello, son necesarios estudios que aborden estos aspectos ecológicos.

Las agrobacterias patógenas y no patógenas se encuentran en suelos en todo el mundo, cultivados o no. A pesar de ser organismos ubicuos del suelo son más abundantes en zonas cercanas a las raíces de las plantas (Kado, 1991), siendo la rizosfera y los tumores que inducen sus principales biotopos. Bajo condiciones experimentales se sabe que pueden sobrevivir en el suelo más de dos años (Patel, 1928; Bouzar *et al.*, 1993).

El suelo es el principal reservorio de diversidad microbiana, del cual solo el 5% ha sido identificada (Bakken, 1985). En él, las cepas no patógenas son más abundantes que las patógenas (Kerr, 1969; Michel *et al.*, 1990; Canfield y Moore, 1991). Además, si no están cultivados con plantas huéspedes, la relación no patógenas respecto a patógenas puede llegar a ser 500:1, reduciéndose a una proporción 13:1 en plantaciones de frutales (Schroth *et al.*, 1971; Bouzar *et al.*, 1993). El predominio de no patógenos en suelo y rizosfera ocurre incluso si un 80% de las plantas de una parcela están infectadas (Moore y Cooksey, 1981), lo que contradice lo que teóricamente cabría esperar. Otra discrepancia se plantea tras una epidemia, ya que la población de patógenos debería incrementarse y esto aumentaría la persistencia de la enfermedad en los años siguientes, pero es un hecho que son esporádicas. Así, en un estudio realizado en campos que habían sufrido una

epidemia un año antes, se recuperaron en mayor número cepas no patógenas que patógenas (Krimi *et al.*, 2002). Entender cómo se producen es difícil, básicamente por la falta de técnicas suficientemente sensibles para la detección de patógenos en su hábitat natural, aunque ya se han desarrollado diversos sistemas que han sido aplicados con buenos resultados (Frostegard *et al.*, 1999; Mougel *et al.*, 2001; 2002). Esta deficiencia ha impedido, hasta hace poco, establecer la relación entre la incidencia de la enfermedad y el nivel de patógenos en suelo.

Las cepas no patógenas aisladas de suelo o de tumores en huéspedes concretos, pueden ser cepas patógenas que han perdido el plásmido Ti o que han sufrido mutaciones en uno o varios de los genes requeridos para la infección. La diversidad de las poblaciones de *Agrobacterium* no patógenos ha sido poco investigada y aún menos respecto a los genes involucrados en la patogenicidad. A pesar de ello, observaciones realizadas en poblaciones de *Agrobacterium* aisladas de suelos y tumores, muestran que se encuentra una gran diversidad (Nesme *et al.*, 1987; 1992; Moore y Canfield, 1996). De hecho, en *Rhizobiaceae* parece normal la existencia de poblaciones heterogéneas en sus hábitats naturales (Flores *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1991), sin embargo, un estudio sobre una colección de 180 aislados no patógenos del suelo reveló que 179 de ellos pertenecían al biovar 2 y solo uno al biovar 1, y que ninguno de ellos presentaba el plásmido Ti (Krimi *et al.*, 2002). En el tumor, que es el nicho ecológico más estudiado, se ha visto por el contrario que existe un nivel de diversidad importante ya que en él conviven cepas patógenas y no patógenas, así como distintos tipos de plásmido Ti, en el caso de las primeras (Anderson y Moore, 1979; Nesme *et al.*, 1987, 1992; Pionnat, 1997; Pionnat *et al.*, 1999). La diversidad, por tanto, es la norma entre los cientos de cepas de *Agrobacterium* aisladas y caracterizadas. La raíz de esta heterogeneidad no se conoce bien, pero sí los distintos mecanismos que intervienen para producirse.

### i.3.1. Mecanismos responsables de la heterogeneidad

Los cambios genéticos en cepas de *Agrobacterium* pueden ser debidos a tres causas principales: el intercambio genético entre plásmidos, las mutaciones espontáneas y las transposiciones (Kerr, 1971; Cooksey y Moore 1982a; Otten *et al.*, 1992).

#### A.- Intercambio genético entre plásmidos

La frecuencia de la transferencia de plásmidos puede ser alta en tumores debido a la presencia de las opinas que actúan como inductores de la conjugación (Petit *et al.*, 1978; Ellis *et al.*, 1982). La variabilidad surgiría por el intercambio entre los plásmidos Ti y conduciría a nuevos genotipos. Aunque en principio no debería haber límites para el intercambio entre plásmidos, excepto en el caso de incompatibilidad entre los mismos, hay datos que sugieren una asociación preferente del plásmido Ti con fondos cromosómicos concretos (Guyon *et al.*, 1993). El biovar 1 se puede subdividir, según los resultados de análisis de ADN y proteínas, en cinco subgrupos distintos y las cepas patógenas con plásmido Ti están asociadas a determinados subgrupos que no coinciden con los subgrupos a los que se asocian las no patógenas (Michel *et al.*, 1990; Nesme *et al.*, 1992; Bouzar *et al.*, 1993).

#### B.- Mutaciones espontáneas

Se han observado a frecuencias de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  y si afectan a genes clave en el proceso de infección, el genotipo resultante sería no patógeno, de menor virulencia o con distinto rango de huéspedes (Cooksey y Moore, 1982a; Moore y canfield, 1996). Estas mutaciones podrían involucrar tanto al plásmido como al cromosoma, que contiene la mayor parte del genoma bacteriano. Existen diferentes factores, como se verá más adelante, que parecen favorecer la existencia de mutaciones.

#### C.- Transposiciones

Se considera que es el tercer mecanismo para introducir variabilidad en *Agrobacterium* a raíz del trabajo de Yamada *et al.*, (1986). Este grupo descubrió que los genes *iaa* del plásmido Ti de tipo octopina de la cepa Ach5 eran homólogos a los de *Pseudomonas savastanoi*. Cada gen estaba unido a un elemento de inserción (IS51), truncado en *Agrobacterium* y a cierta distancia de los genes *iaa*. Por ello, propusieron que estos genes procedían de un transposón [IS51-*iaa*-IS51]. Otten *et al.*, (1992) analizando distintos elementos de inserción similares a éste y cercanos a los genes *iaa* en distintos tipos de plásmidos Ti, advirtieron que, en ninguno de los casos, las secuencias que formarían parte del transposón inicial se parecen. Aún así, es un mecanismo que no debe ser descartado,

ya que existen diversos trabajos en los que se han encontrado elementos de inserción en distintas cepas de *Agrobacterium* (Bonnard *et al.*, 1989; Paulus *et al.*, 1989; De Meirsmann *et al.*, 1990; Paulus *et al.*, 1991; Wabiko, 1992; Fournier *et al.*, 1993; Ponsonnet *et al.*, 1995).

La frecuencia, significado y contribución de estos tres mecanismos a la variabilidad de aislados no se conoce claramente. De este modo, las cepas de *Agrobacterium* no patógenas que contienen derivados del plásmido Ti que incluyen los genes para el catabolismo de opinas podrían haber aparecido gracias a una combinación de los tres mecanismos: por cointegración del plásmido Ti con otro replicón indígena seguido de reorganizaciones moleculares, mutaciones puntuales, inserción de ADN extraño en genes esenciales para la virulencia o deleciones en esos genes. Todo ello da una imagen clara de la gran complejidad genética del género *Agrobacterium*. Sin embargo, como ya se ha dicho, a pesar de esta diversidad existe un predominio claro de las cepas no patógenas en los distintos hábitats naturales de la bacteria. Esto puede ser provocado por la existencia de una ventaja selectiva de estas cepas frente a las patógenas o a un fenómeno de pérdida de poder patógeno que sufren las cepas patógenas bien de forma espontánea o por la influencia del huésped.

### i.3.2. El concepto de opina

Este concepto asigna un papel ecológico a las opinas y establece que la transformación de los tejidos vegetales, que conduce a la producción de opinas crea un nicho favorable para las cepas que poseen los genes de su catabolismo, favoreciendo su multiplicación clonal. Además, al inducir la transferencia conjugativa del plásmido Ti, favorecen la diseminación del mismo hacia cepas inicialmente no patógenas (Petit *et al.*, 1978). Posteriormente se ha descubierto que las opinas también son quimioatrayentes de *Agrobacterium*, lo que permite tanto que las cepas exploren los alrededores del tumor y puedan volver a él, como la atracción de cepas con un plásmido Ti del mismo tipo que el de la cepa inductora del tumor y que exista una posibilidad de recombinación que produciría nuevos tipos de plásmidos (Kim y Farrand, 1998). La ausencia de estos compuestos en los tejidos vegetales sanos parece indicar un papel importante en la ecología del plásmido Ti.



La obtención de plantas transgénicas capaces de sintetizar opinas ha corroborado los distintos supuestos del concepto que, hasta el momento, era teórico (Lam *et al.*, 1991; Savka y Farrand, 1997; Oger *et al.*, 1997). Este concepto explicaría las ventajas teóricas para la supervivencia de las cepas patógenas dentro de los tumores respecto al suelo, pero, de nuevo, esto contrasta con la dificultad demostrada de aislar bacterias patógenas de los tumores (Cubero, 1998; Picard, 1993). De hecho, en este último, hay una falta de nutrientes para las bacterias y el plásmido no les confiere ninguna ventaja competitiva. El predominio de las cepas no patógenas en suelo implicaría o que el plásmido Ti debe llevar genes que harían a la bacteria más susceptible a los estreses físicos o biológicos fuera de los tumores, o que algunos genes directamente involucrados en la inducción tumoral producirían ese descenso en la adaptabilidad de las cepas en el suelo. En consecuencia, la pérdida del plásmido o mutaciones significativas en determinados genes incrementarían su competitividad en este hábitat provocando su predominio.

### i.3.3. El fenómeno de la pérdida del poder patógeno

En diversos estudios en los que se caracterizaron cepas no patógenas se observó que poseían plásmidos de tamaños similares al Ti y que algunas eran capaces de catabolizar opinas (Michel *et al.*, 1990; Moore y Canfield, 1996). Por ello, parece que derivarían de cepas patógenas que han perdido la capacidad de inducir tumores. Este tipo de cepas se aísla frecuentemente de tumores de determinados huéspedes, donde a veces son mayoritarias (Canfield y Moore, 1991; Bélanger *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1997). Esto ha llevado a pensar que determinadas especies vegetales son capaces de seleccionar ciertos genotipos (Latour, 1996), pero como indican los datos de Krimi *et al.*, (2002), en el que se aislaron cepas no patógenas en suelos cultivados que habían sufrido epidemias de *Agrobacterium*, éstas no poseían el plásmido Ti, por lo que la pérdida del mismo podría ser otra causa que justificaría su abundancia.

Antes de revisar la relación entre el huésped y las formas no patógenas de *Agrobacterium*, se considera conveniente definir los conceptos de patogenicidad y virulencia, que se emplearán a lo largo de esta memoria.

### i.3.3.1 Patógeno vs. Virulento.

La precisión de los nombres asignados a conceptos, estructuras y fenómenos es indispensable para la comunicación en ciencia. El problema surge cuando, a raíz del desarrollo biotecnológico, investigadores extraños al ámbito de la patología vegetal no crean nuevos términos que expliquen sus estudios sino que toman conceptos ya existentes y modifican su significado (Hunt, 1994). Cuando este nuevo significado se publica y no es corregido porque los revisores desconocen la definición clásica, pasa a ser aceptado y citado por la comunidad científica y puede inducir a errores.

Esta falta de precisión causa serios problemas que trascienden el ámbito académico. Así, por ejemplo, en los años 80 la agencia de protección ambiental de EE.UU. creó su propia definición de PATÓGENO al no poder consensuar las definiciones existentes en la literatura ni las recibidas por parte de reputados fitopatólogos consultados. Por ello, definieron como patógeno a cualquier organismo que produjera compuestos tóxicos, y a los ácidos nucleicos como compuestos tóxicos. Bajo estos términos, cualquier microorganismo se convierte en un patógeno, y por tanto estaría sometido a regulación. Afortunadamente esta definición ha sido posteriormente corregida (US Environ. Prot. Agency, 1986).

Entre los términos más controvertidos están el de PATOGENICIDAD, que se define como la capacidad de un patógeno para producir enfermedad y VIRULENCIA, referida al grado de patogenicidad de un patógeno dado (Agrios, 1988). Según estas definiciones la PATOGENICIDAD expresa un carácter cualitativo mientras que VIRULENCIA muestra la cuantificación del mismo.

El problema se presenta cuando se utilizan como sinónimos y esto ocurre especialmente con *Agrobacterium*. La región *vir* del plásmido Ti se llamó así porque contiene genes implicados en el rango de huéspedes. Después se descubrió que mutaciones en muchos de los genes *vir* eliminaban completamente la tumorigénesis. Estos cambios, se dice, provocan “pérdida de virulencia” o “pérdida de patogenicidad” (o poder patógeno). Sin embargo, lo que puede ocurrir es un bloqueo de procesos anteriores a la patogénesis, como aquellos relacionados con la transferencia o producción del ADN-T. En este caso, tendrían que ver más con las fases del ciclo de la enfermedad como penetración o infección más que con la VIRULENCIA o la PATOGENICIDAD. No debería denominarse un

locus como *vir* (virulencia), *pen* (penetración), *inf* (infección) o *pat* (patogenicidad) hasta conocer la función exacta que lleva a cabo su producto (Shanner *et al.*, 1992).

Otro término que contribuye a la confusión es el de “avirulencia” ya que puede conducir a la idea errónea que un gen de “avirulencia”, en cepas virulentas, puede ser reemplazado por un gen *vir*, como si fuesen alelos de un mismo carácter. Pero los genes *vir* y los denominados *avr* no tienen ningún tipo de relación. Más aún, la interacción huésped/patógeno es continua y, por eso, las categorías dicotómicas (virulento/avirulento) no sirven para definirlos. Una cepa puede ser más o menos virulenta y su falta de patogenicidad, o sea, la incapacidad para causar enfermedad es más correcto calificarla como “no patógena”. Quizás se podría asignar el calificativo de “atenuada”, utilizado entre los virólogos vegetales, o “poco virulenta” más que avirulenta a aquella cepa que produce enfermedad de forma reducida.

En esta memoria se conserva, como aparece en la descripción genética de *Agrobacterium*, la nomenclatura de los genes y loci existentes en la literatura. El término PATOGENICIDAD se referirá a la capacidad de producir enfermedad, por lo que PÉRDIDA DEL PODER PATÓGENO implica la incapacidad de producir tumores por parte de una cepa. El grado de enfermedad que un patógeno produce se define mediante el término VIRULENCIA, por lo que PÉRDIDA DE VIRULENCIA implicará la inducción de tumores más pequeños, en menor número o una reducción del rango de huéspedes.

#### i.3.3.2 Relación del huésped con las formas no patógenas

Fortin *et al.*, (1992) descubrieron que ciertas cepas patógenas de *Agrobacterium* mutaban a no patógenas en presencia de acetosiringona, compuesto fenólico presente en las heridas de las plantas que actúa como inductor de la actividad de la maquinaria de virulencia. En algunos mutantes, la patogenicidad se restauraba por complementación con los operones *virA* o *virG*, implicados ambos en el reconocimiento de señales procedentes de la planta. Parece, por ello, que determinados componentes de la planta pueden presentar una presión de selección hacia cepas no patógenas dentro de los tumores. Esto podría explicar la preponderancia de cepas no patógenas en aislados de determinadas especies como manzano o arándano (Bélanger *et al.*, 1995). Los mutantes no patógenos aislados en estas especies contenían deleciones que afectaban a toda la región *vir* y parte del

ADN-T o presentaban mutaciones puntuales en el operón *virG* (Bélanger *et al.*, 1995; Moore y Canfield, 1996). Dentro de los genes de virulencia también se encontraron elementos de inserción que los inactivaban, aunque no es evidente que la acetosiringona sea la responsable de la activación de este tipo de elementos (Dion *et al.*, 1996).

La selección por parte de la planta hacia cepas no patógenas podría formar parte de una estrategia que limitara la propagación de *Agrobacterium* patógenos. Para confirmar esta hipótesis se llevaron a cabo una serie de estudios sobre la competencia entre cepas salvajes y mutantes aislados de manzano. Al cabo de cinco semanas, tras la inoculación en plántula de manzano, la cepa salvaje era casi indetectable mientras que la población de mutantes permanecía inalterable (Bélanger *et al.*, 1995). Esto apoya la teoría de que estos mutantes presentan una ventaja en el ambiente de estas plantas. De todos modos, hay que tener en cuenta dos limitaciones importantes antes de considerar el alcance de esta estrategia, por un lado, en manzano se producen más mutantes que en otros huéspedes inoculados en experimentos paralelos y, además, no todas las bacterias inoculadas en manzano presentan inestabilidad, ésta aparece generalmente con cepas aisladas de tumores de este huésped no, por ejemplo, con la cepa de *A. tumefaciens* C58 (Dion *et al.*, 1996).

Las técnicas moleculares desarrolladas en los últimos años son herramientas útiles para el estudio de la ecología y la evolución de *Agrobacterium* en ambientes naturales. Este tipo de trabajos, especialmente enfocados hacia el estudio de la diversidad geno- y fenotípica de *Agrobacterium* patógenos y no patógenos en ecosistemas agrícolas podrían explicar las contradicciones señaladas en este apartado (Picard *et al.*, 1992; Nesme *et al.*, 1992; Picard, 1993; Ponsonnet y Nesme, 1994; Nesme *et al.*, 1995) y, en el futuro, podrían ayudar en la elección de un método de control de la enfermedad o en el diseño de nuevas técnicas de lucha. Esta es una de las líneas de investigación más desarrolladas en los últimos años que discurre paralela a un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares de la inducción tumoral preferente para el avance de la biotecnología. Este interés sobre los aspectos moleculares contrasta con el menor conocimiento acerca de la ecología de la bacteria. A pesar de los numerosos estudios sobre la genética del proceso de formación tumoral, para la puesta a punto de un manejo adecuado de la enfermedad es necesaria una comprensión de la diversidad de las poblaciones y la dinámica de *A. tumefaciens*. Por ello, la realización de trabajos de investigación que aborden estos aspectos,

como la estructura genética de las poblaciones (Mougel, 2000), fluctuación y persistencia a largo plazo de poblaciones de agrobacterias patógenas en suelo (Krimi *et al*, 2002), estudios de asociación entre los plásmidos y los cromosomas que contienen las poblaciones de *Agrobacterium* (Bouzar *et al*, 1993) o la influencia que puede tener el huésped en las poblaciones naturales de *Agrobacterium* son de especial interés (Moore y Canfield, 1996).

En los estudios de poblaciones de agrobacterias en medios naturales se ha encontrado que la mayoría de las aisladas de suelo, rizosfera y tumores son no patógenas (Kerr, 1969; Canfield y Moore, 1991; Krimi *et al*, 2002), llegando en ocasiones a obtenerse hasta un 90% de aislados de tumores y hasta un 100% de aislados de suelo no patógenos. Pero las investigaciones sobre la epidemiología de la bacteria que tengan en cuenta esta característica han estado dificultadas en el pasado por la falta de eficaces herramientas de diagnóstico que permitieran procesar un gran número de cepas a partir de hábitats concretos. El desarrollo de las técnicas moleculares han mejorado la capacidad de detectar y caracterizar ese gran número de *Agrobacterium* aislados a partir de suelo o tumores (Nesme *et al*, 1989; Dong *et al*, 1992; Haas *et al*, 1995; Sawada *et al*, 1995; Cubero *et al*, 1999; 2002; Llop *et al*, 2003). Empleando estos métodos para llevar a cabo estudios sobre la ecología y la evolución de agrobacterias se obtendrá información necesaria para mejorar el control de la enfermedad.

## **OBJETIVOS GENERALES**

## **OBJETIVOS GENERALES**

- 1) Poner a punto un método de identificación molecular que permita distinguir cepas de *Agrobacterium tumefaciens* de forma sencilla y rápida.
- 2) Evaluar la aparición de mutantes no patógenos a partir de cepas inoculadas en diversos huéspedes, y analizar la posible interacción huésped-patógeno en este fenómeno.
- 3) Evaluar la aparición de mutantes no patógenos de forma espontánea, en cultivo continuado en dos cepas de *A. tumefaciens*
- 4) Caracterizar los mutantes no patógenos obtenidos a nivel molecular, para determinar las causas que los han originado y restaurar mediante complementación el poder patógeno para confirmarlas.

Con estos objetivos se pretende aportar nueva información sobre las causas de la pérdida del poder patógeno en *A. tumefaciens* que podrían contribuir al diseño de nuevas estrategias de control de la enfermedad causada por esta bacteria.

**CAPÍTULO 1: IDENTIFICACIÓN DE**  
***Agrobacterium* sp. MEDIANTE RAPDs**



## 1.1 Introducción

*A. tumefaciens* es una bacteria del suelo, un nicho ecológico en el que el número de especies bacterianas es muy elevado, y en el que se presume aún existe un gran número de especies no identificadas (Bakken, 1985; Teyssier-Cuvelle *et al.*, 1999). Incluso en el caso de entornos más restringidos se han encontrado poblaciones heterogéneas de bacterias (Anderson y Moore, 1979), como en los tumores producidos por este patógeno, donde el ambiente en principio sería más favorable para agrobacterias patógenas que para cepas no patógenas del mismo género *Agrobacterium* o para otras especies bacterianas. Esta preferencia se explicaría por la presencia en el medio de las opinas, sustancias producidas por las plantas transformadas y que sirven de sustrato a las cepas patógenas, las cuales poseen los genes del catabolismo de estos compuestos. Así, en un estudio llevado a cabo por Cubero (1998) en tumores producidos de forma natural en nogal, se observó la presencia de distintas cepas de *A. tumefaciens* patógenos en el interior de los tumores, coexistiendo naturalmente. Todo ello muestra que la estructura de las poblaciones de agrobacterias naturales es muy compleja y diversos estudios han mostrado la presencia de mezcla de poblaciones que contienen cepas de *Agrobacterium* con diferentes cromosomas y con diferentes tipos plasmídicos (Nesme *et al.*, 1992; Pionnat *et al.*, 1999).

Los estudios en ciertos nichos ecológicos de *Agrobacterium* (suelo, raíces, tumores, material asintomático), con una microflora compleja y en los que un sistema de aislamiento selectivo de este género bacteriano no es plenamente eficiente, nos plantean la necesidad de técnicas que nos permitan un análisis rápido para la identificación de las bacterias aisladas. Esta identificación es generalmente compleja (Lelliot y Stead, 1987), y los métodos existentes, tanto serológicos (Alarcón *et al.*, 1987; Benjama *et al.*, 1996) como bioquímicos (análisis de ácidos grasos o patrones de utilización de fuentes de carbono) (Bouzar *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 1992) permiten diferenciar entre los biovars de *Agrobacterium*, pero no distinguen entre cepas. Los métodos de caracterización molecular que se han puesto a punto hasta la fecha (PCR-RFLP; secuenciación de la fracción 16S del ARN ribosómico; amplificación al azar de ADN (RAPDs); caracterización cromosómica y/o plasmídica) (Nesme *et al.*, 1992; Yanagi y Yamasato, 1993; Ponsonnet y Nesme, 1994; Irelan and Meredith, 1996; Oger *et al.*, 1997; Momol *et al.*, 1998) se han utilizado para la agrupación de cepas con características comunes, pero no para la

distinción entre dos cepas dentro de un mismo grupo. Todo esto nos lleva a concluir que no existe un sistema de identificación rápido y de fácil empleo para el análisis de un gran número de colonias con vistas a su identificación individual y a la distinción entre ellas. En estudios moleculares sobre clones bacterianos es esencial confirmar su identidad en los casos donde no poseamos marcadores (como resistencia a antibióticos) o medios de cultivo selectivos para recuperar los clones de interés.

En este capítulo se describe la puesta a punto de un sistema de identificación mediante la amplificación por la técnica de PCR utilizando iniciadores inespecíficos en condiciones de baja especificidad de la reacción (RAPDs), que presenta varias ventajas: rapidez de análisis, un alto grado de polimorfismo, la posibilidad de emplear suspensiones bacterianas en vez de ADN purificado, la distribución de los marcadores a lo largo de todo el genoma bacteriano y la alta reproducibilidad de los resultados. Este sistema se ha evaluado frente a una colección de 39 cepas de *Agrobacterium* sp. pertenecientes a la colección del IVIA, consiguiendo diferenciar cada una de ellas. Posteriormente a este estudio, el sistema de análisis por RAPDs se validó con las colonias aisladas de los tumores producidos en un experimento de inoculación empleando una cepa marcada con resistencia al antibiótico gentamicina.

Este sistema de identificación se empleará en los capítulos posteriores para el análisis de las colonias obtenidas en los experimentos de inoculación que se llevarán a cabo durante el desarrollo de esta memoria.

## 1.2 OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este capítulo fueron:

- Puesta a punto de un sistema de identificación mediante RAPDs que permita la discriminación de colonias de *A. tumefaciens* mediante la comparación de los patrones de bandas obtenidos
- Ensayo de la especificidad del sistema analizando una colección de cepas caracterizadas de *Agrobacterium* sp.
- Validación del sistema en un experimento de inoculación con el empleo de una cepa marcada con resistencia a un antibiótico

### 1.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.3.1 Puesta a punto del sistema de identificación mediante RAPDs

Para la puesta a punto del sistema se escogieron cinco cepas de *Agrobacterium* procedentes de colección y bien caracterizadas (Tabla 1.1) y con ellas se realizaron análisis con distintos iniciadores de 10 nucleótidos de longitud diseñados al azar, para ver con cuáles se obtenían patrones de bandas suficientemente polimórficos para distinguir entre ellas, que dieran resultados estables y reproducibles. Las cepas se sembraron en medio general PYGA (Lelliot y Stead, 1987) a partir de suspensiones crioconservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se incubaron durante 48 horas a  $26^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se realizaron suspensiones en agua de estas siembras para los ensayos de amplificación directa y para la extracción del ADN de las colonias. Se ensayaron 5 grupos de 10 iniciadores cada uno de la casa Operon Technologies (Alameda, Ca, USA) (iniciadores OP D-E-F-I-J).

Tabla 1.1 Cepas de *Agrobacterium* empleadas para el estudio inicial de los iniciadores

CEPA	ORIGEN	BIOVAR	OPINA
C58	<i>Prunus cerasus</i>	1	nopalina
K84	Suelo	2	nopalina
IVIA 325-4	<i>Prunus persica</i>	1	nopalina
IVIA 678-2	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	1	nopalina
IVIA 1.102	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	crisopina

#### 1.3.2 Purificación del ADN de las cepas bacterianas.

Se prepararon suspensiones bacterianas en agua MQ estéril hasta tener una concentración de *ca.*  $10^8$  ufc/ml ( $0,5 \text{ DO}_{600}$ ). El ADN se purificó a partir de estas suspensiones siguiendo un método rápido, que minimiza la purificación de inhibidores de la PCR (Llop *et al.*, 1999). El método consiste en centrifugar 1 ml de las suspensiones a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (t.a.) y eliminar el sobrenadante. Al precipitado se le añaden 500  $\mu\text{l}$  de un tampón de extracción (200

mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; 2% PVP) y posteriormente los tubos se agitan suavemente durante una hora a t. a. Seguidamente se centrifugan a 5.000 rpm durante 5 min para llevar al fondo restos celulares y se recogen 450 µl del sobrenadante, que se transfieren a otro tubo de microcentrífuga. A este sobrenadante se le añade un volumen de isopropanol, para precipitar el ADN extraído. Se centrifuga finalmente a 13.000 rpm durante 5 min, se descarta el sobrenadante y se seca posteriormente al aire. Las extracciones se resuspenden en un volumen apropiado de agua estéril (por ejemplo, 100 µl). La concentración de las muestras se determinó mediante lectura de la absorbancia a 260 nm, y la pureza de las mismas, mediante la relación de la absorbancia a 260/280 nm. Se ensayaron diversas cantidades de ADN y se encontró que el mejor resultado en cuanto a número de bandas e intensidad de las mismas fue de 70 ng de muestra por reacción.

### 1.3.3 Comparación de la purificación de ADN/suspensión bacteriana

Los ensayos de RAPD-PCR se suelen llevar a cabo utilizando ADN purificado, lo cual conlleva un proceso más laborioso, al tener que realizar la extracción y cuantificar las suspensiones de ADN. Por la necesidad de aplicar este procedimiento a un gran número de colonias en el curso de esta investigación, se decidió evaluar la posibilidad de simplificar el método mediante la utilización de suspensiones celulares en vez de ADN purificado. Como describe Mazurier *et al.* (1992), no es necesario realizar extracciones de ADN para obtener perfiles reproducibles mediante RAPDs, por lo que una vez puesto el sistema a punto con ADN purificado, se procedió a realizar pruebas con esas mismas cepas en suspensiones de una concentración de  $10^8$  ufc/ml. Las suspensiones se mantuvieron en cámara a 8°C y también congeladas a -20°C, para observar si había diferencias en los patrones obtenidos frente al empleo de ADN purificado.

### 1.3.4 Condiciones de amplificación

Los análisis se realizaron empleando un programa de PCR optimizado para los iniciadores y termociclador empleados (Perkin-Elmer modelo 9600). La mezcla de reacción contenía 70 ng de ADN genómico, 1x del tampón de reacción (20 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 μM dNTPs; 5 pmoles de iniciador y 1 unidad de enzima polimerasa termoestable (polimerasa *Taq*, Life Technologies) en un volumen total de 25 μl. En el caso de suspensiones bacterianas, se añadieron 3 μl de la suspensión a 22 μl de la mezcla de reacción. Los ciclos de amplificación utilizados fueron: un paso de desnaturalización de 94°C durante 3 min seguido de 5 ciclos a 94°C durante 30 s, 36°C durante 1 min y 72°C 1 min, con un tiempo de retardo de 1 min 48 s; y 30 ciclos de 94°C durante 30 s; 45°C 1 min y 72°C 1 min, con un tiempo de retardo de 1 min. Las bandas de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% después de su tinción en bromuro de etidio (50 μgr/ml) y observación bajo luz U.V.

### 1.3.5 Análisis del sistema de RAPDs sobre una colección de cepas caracterizadas

Para comprobar la validez del sistema para identificar cepas de *Agrobacterium* se escogieron 39 cepas de la colección del IVIA, que provinieron tanto de colecciones internacionales como de aislados obtenidos en el propio laboratorio. Las características de las cepas empleadas, los huéspedes de donde se han obtenido y sus lugares de origen se muestran en la Tabla 1.2. Estas cepas se escogieron con el propósito de tener una representación lo más amplia posible del género *Agrobacterium*, por lo que se incluyeron cepas patógenas y no patógenas, con distintos perfiles de plásmidos y diferentes fondos cromosómicos, provenientes de distintos orígenes geográficos y aisladas de distintos huéspedes. Los análisis se realizaron con los cuatro iniciadores empleando suspensiones bacterianas únicamente. Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados (cluster) utilizando como algoritmo de clasificación el enlace promedio (UPGMA) para confirmar que los patrones de bandas obtenidos en cada caso diferían lo suficiente para discriminar las cepas estudiadas. Como medida de la distancia se empleó el índice de Jaccard (1908). Los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

## Identificación de *Agrobacterium* sp. mediante RAPDs

Tabla 1.2. Cepas de *Agrobacterium* empleadas en los análisis de RAPDs.

CEPA	COLECCION	ORIGEN	OPINA	HUESPED	
<i>A. tumefaciens</i>	IVIA 251-1	Badajoz	nopalina	Almendro	
	IVIA 251-22	"	nopalina	Cerezo	
	IVIA 325-4	Tarragona	nopalina	Melocotonero x almendro	
	IVIA 347-4	Valencia	nopalina	Melocotonero	
	IVIA 360-54	Navarra	ND	Vid	
	IVIA 436-46	Zaragoza	nop/manopina	Melocotonero x almendro	
	IVIA 576-80	Cuenca	nopalina	Mimbres	
	IVIA 678-2	Valencia	nopalina	Melocotonero x almendro	
	IVIA 1.102	"	crisopina	Crisantemo	
	172-17T*	Orense	octopina	Vid	
	225-226T*	"	octopina	Vid	
	B6	EEUU	octopina	Tomate	
	CFBP 42	Francia	ND	Tomate	
	CFBP 1903	EEUU	nopalina	Ciruelo	
	NCPPB 2437	EEUU	ND	-	
	A281	-	agropina	-	
	Ach5	EEUU	octopina	Cerezo	
	K84	Australia	nopalina	Suelo	
	IVIA 014	Zaragoza	nopalina	Melocotonero	
	IVIA 66R	Sevilla	ND	Rosal	
<i>A. rizhogenes</i>	IVIA 251-21	Badajoz	nopalina	Cerezo	
	IVIA 254-2	Valencia	nopalina	Melocotonero	
	IVIA 260-67	Badajoz	nopalina	Chopo	
	IVIA 282-64	Tenerife	nopalina	Rosal	
	IVIA 325-7	Tarragona	nopalina	Melocotonero x almendro	
	IVIA 354-35	Valencia	nopalina	Almendro	
	IVIA 388-30	Zaragoza	nopalina	Almendro	
	IVIA 545-45	Castellón	nopalina	Membrillo	
	IVIA 796-6	Valencia	ND	Melocotonero x almendro	
	IVIA 1853-2	Zaragoza	ND	Melocotonero	
	ATCC 15834	EEUU	ND	-	
	NCIB 8196	Desconocido	ND	-	
	<i>A. vitis</i>	NCPPB 1649	Sudáfrica	ND	Rosal
		NCPPB 2659	Reino Unido	ND	Pepino
		IVIA 339-26	Ourense	octopina	Vid
194-459V*		"	octopina	Vid	
NCPPB 3554		Australia	ND	Vid	

ATCC: American Type Culture Collection, USA.

CFBP: Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, Francia.

IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

NCIB: National Collection of Industrial Bacteria, Reino Unido.

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Reino Unido.

ND: No determinado

\* Cepas descritas por Lastra (1998)

### 1.3.6 Análisis de RAPDs llevados a cabo con una cepa marcada

Una vez comprobada la validez del sistema mediante el análisis de cepas de la colección del IVIA, se llevó a cabo un ensayo en condiciones de trabajo de campo con una cepa de *A. tumefaciens* marcada con resistencia al antibiótico gentamicina. Esta cepa, denominada NT1 pTiC58::289 Gm<sup>r</sup> (Von Bodman *et al.*, 1992) es la cepa C58 a la que se ha introducido un plásmido, pJB1JI, que confiere resistencia a este antibiótico. El ensayo se realizó con el híbrido melocotonero x almendro GF677 mediante inoculación de la cepa marcada en el suelo estéril, a una concentración de 10<sup>7</sup> ufc/g de sustrato. Las plantas, en número de 10, se cultivaron durante un año. En el cuello de estas plantas se realizaron incisiones justo antes de su plantación para favorecer la aparición de tumores. Después de 12 meses de la inoculación se recogieron los tumores producidos y se realizaron aislamientos en medio general PYGA suplementado con 40 µg/ml del antibiótico gentamicina. En este medio se esperaba que sólo las colonias que presentaran el plásmido pJB1JI podrían crecer, y todas ellas deberían presentar el mismo patrón de bandas al analizarlas por RAPDs.

Los tumores se analizaron mediante el dilacerado de fragmentos en 2 ml de agua estéril (tamaño aproximado de 0,10-0,20 cm<sup>3</sup>). Los dilacerados se dejaron macerar 30 min y posteriormente se sembraron 50 µl de estos extractos en el medio general PYGA suplementado con gentamicina (40 µg/ml). Las colonias que aparecieron se purificaron en el mismo medio PYGA + gentamicina. Las colonias se sometieron al análisis mediante RAPDs con los cuatro iniciadores escogidos utilizando ADN purificado o suspensiones bacterianas, siempre comparando con la cepa madre inoculada. La identidad de las bacterias seleccionadas se confirmó mediante diversas pruebas bioquímicas (presencia del enzima ureasa (Ferguson modificado *cf* Cassagne, 1966); esculina (Sneath y Collins, 1974); Hugh-Leifson (1953); presencia de 3-cetolactosa (Bernaerts y DeLey, 1963); análisis del perfil plasmídico (Fortin *et al.* 1992), y análisis de diversos marcadores específicos de *Agrobacterium* mediante PCR (Ponsonnet y Nesme, 1994; Sawada *et al.*, 1995; Haas *et al.*, 1995) .



## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 Puesta a punto del sistema de identificación mediante RAPDs

Los resultados de los análisis realizados con las cinco cepas de *Agrobacterium* (Tabla 1.1) con los 50 iniciadores ensayados, permitieron seleccionar cuatro que producían patrones altamente polimórficos, compuestos, para la mayoría de las cepas, por tres o más bandas reproducibles. Estos iniciadores fueron los siguientes: OPE-2 (5'-GGTGCGGGAA-3'); OPE-7 (5'-AGATGCAGCC-3'); OPE-14 (5'-TGCGGCTGAG-3') y OPE-20 (5'-AACGGTGACC-3'). Cada una de las cepas examinadas producían un patrón característico con cada uno de los cuatro iniciadores, por lo que el empleo de uno solo de los mismos se consideró suficiente para identificar un clon determinado, mientras los tres restantes se emplearían para confirmar los resultados o clarificar aquéllos potencialmente ambiguos.

### 1.4.2 Comparación entre ADN purificado/suspensión bacteriana

Para todas las cepas analizadas se obtuvieron los mismos perfiles de bandas al utilizar ADN purificado o suspensiones bacterianas. Igualmente, no se observaron variaciones significativas en el perfil de bandas utilizando suspensiones bacterianas recién preparadas o mantenidas hasta dos semanas a 8°C o hasta un año a -20°C (Figura 1.1). Por ello, y por la facilidad de uso que implica, todos los análisis posteriores se llevaron a cabo empleando suspensiones bacterianas, con el consiguiente ahorro de tiempo y reactivos.

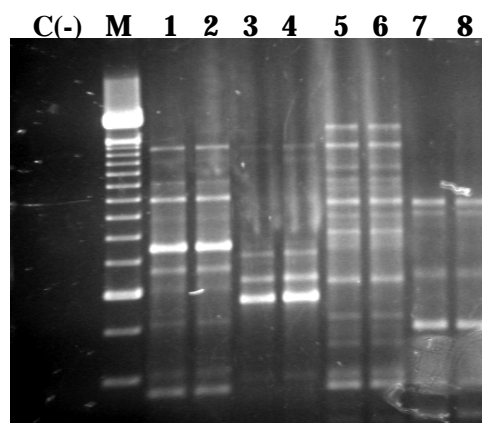
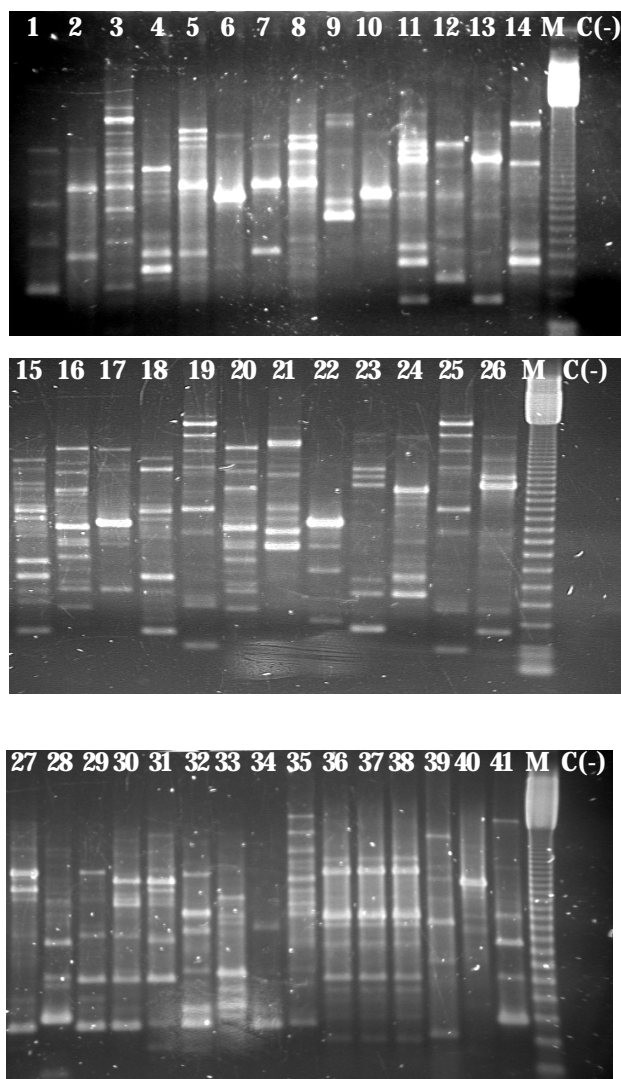


Figura 1.1 Análisis de RAPDs realizados sobre cepas mantenidas en frío y en congelación con el iniciador OPE-2. Calles 1 y 2, cepa Ach5; calles 3 y 4, cepa IVIA 251-1; calles 5 y 6, cepa IVIA 678-2; calles 7 y 8, cepa IVIA 1.102. M: marcador 100 pb (Life Technologies); C(-): control negativo. Calles impares, cepas conservadas a 8°C; calles pares, cepas mantenidas en congelación (-20°C). La conservación en ambas temperaturas no produce cambios significativos en los patrones de bandas.

### 1.4.3 Análisis del sistema sobre una colección de cepas

Los patrones de RAPDs de 39 cepas bacterianas diferentes fueron específicos con los cuatro iniciadores empleados. En la Figura 1.2 se muestran los patrones obtenidos con uno de los iniciadores ensayados (OPE-14). El dendrograma obtenido con estos patrones de bandas (Figura 1.3) muestra que todas las cepas se distinguen unas de otras, con la excepción de tres de ellas: A281, C58 y C58R. En estos casos, los patrones son idénticos, ya que se trata de cepas que poseen los mismos cromosomas y una de ellas posee distinto plásmido inductor de tumores (pTi), la cepa A281 (pTiBo542). Aunque no pueda asegurarse en todos los casos, aquí parece que los plásmidos no ejercen influencia apreciable sobre el patrón de bandas obtenido frente a los cromosomas. El resto de cepas presentaron patrones diferenciados.

Figura 1.2 Patrón de bandas obtenido con el iniciador OPE 14 con 39 cepas de *Agrobacterium* de diferentes orígenes. A: Calle 1: IVIA 251-22; 2: IVIA 388-30; 3: IVIA 436-46; 4: IVIA 282-64; 5: IVIA 260-67; 6: IVIA 576-80; 7: IVIA 014; 8: IVIA 339-26; 9: 194-459V; 10: IVIA 325-7; 11: IVIA 251-21; 12: IVIA 360-54; 13: IVIA 254-1; 14: IVIA 545-45; M: 123 bp ladder (Life Technologies); C (-): control negativo. B: Calle 15: B6; 16: K84; 17: IVIA 347-4; 18: NCPPB 3554; 19: 172-17T; 20: K84; 21: IVIA 251-1; 22: 225-226T; 23: IVIA 325-4; 24: CFBP 42; 25: 172-17T; 26: IVIA 678-2; M: 123 bp ladder (Life Technologies); C (-): control negativo. C: Calle 27: IVIA 354-35; 28: NCIB 8196; 29: IVIA 1853-2; 30: NCPPB 1649; 31: IVIA 796-6; 32: Ach5; 33: NCPPB 2437; 34: ATCC 15834; 35: IVIA 1.102; 36: C58R; 37: C58; 38: A281; 39: IVIA 254-2; 40: NCPPB 2659; 41: IVIA 66R; M: 123 bp ladder (Life Technologies); C (-): control negativo.



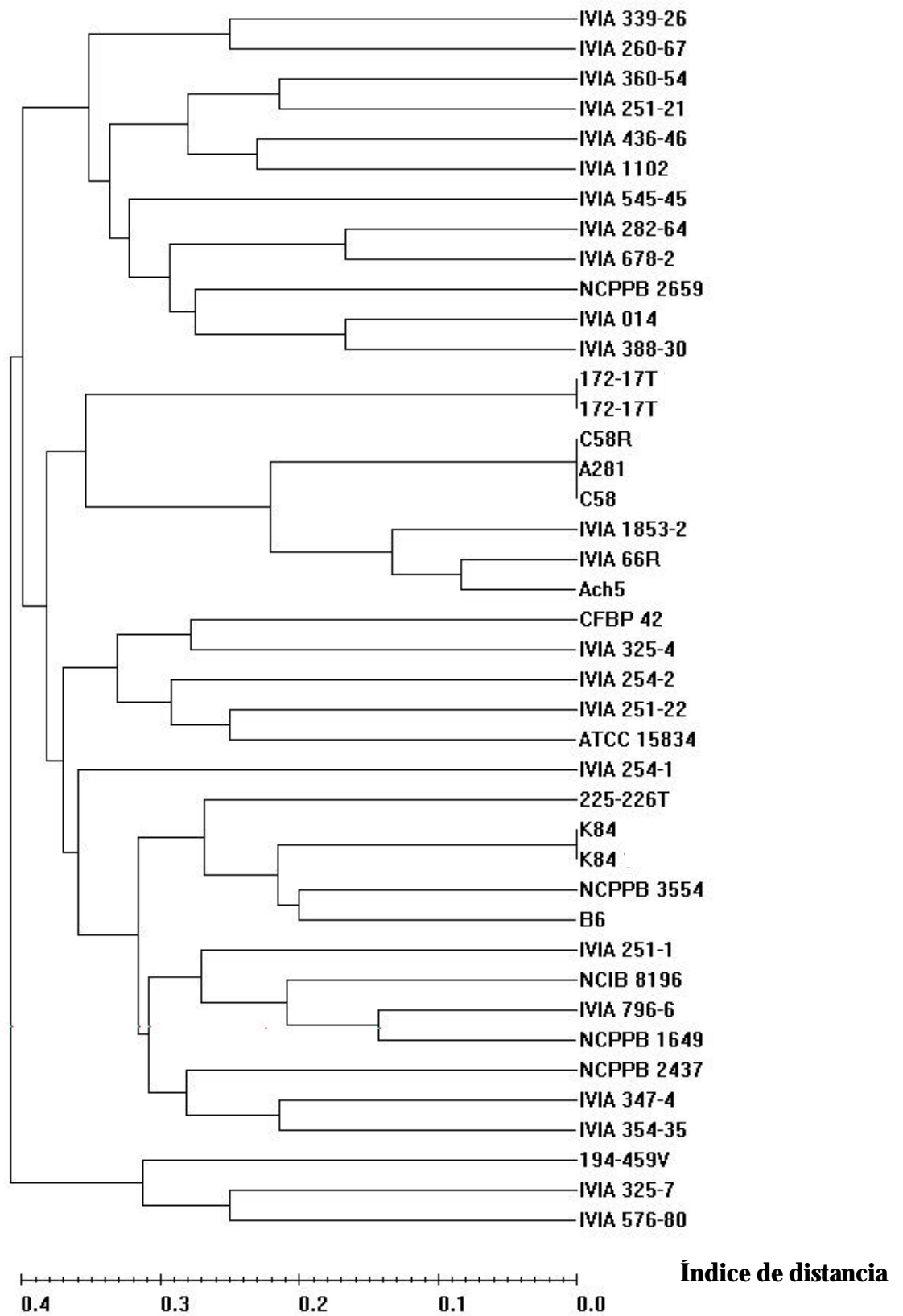


Figura 1.3 Análisis mediante UPGMA de los patrones de bandas obtenidos con las 39 cepas de colección de la Fig. 1.2. El índice de distancia se calculó según Jaccard (1908). Las cepas 172-17T y K84 se incluyeron por duplicado para observar la reproducibilidad del análisis.

Los análisis realizados en nuestro trabajo han demostrado que los patrones de bandas obtenidos se mantienen estables en número e intensidad, con pequeñas variaciones que no afectan a nuestros resultados. Para comprobar la reproducibilidad dentro de un mismo experimento se incluyeron algunas cepas varias veces en los análisis de la colección de cepas. Estos controles mostraron los mismos resultados, como puede verse en las calles 16-20 y 19-25 de la Fig. 1.2, y que se confirmó en el análisis de conglomerados (Fig. 1.3).

También se comprobó la reproducibilidad a lo largo del tiempo y comparando diferentes suspensiones de la misma muestra. Los resultados de estos análisis de RAPDs realizados con dos iniciadores (OPE-7 y OPE-20) utilizando cinco cepas de *Agrobacterium* en dos tandas de experimentos llevados a cabo con cuatro meses de diferencia se muestran en la Figura 1.4. Todas las cepas produjeron los mismos patrones.

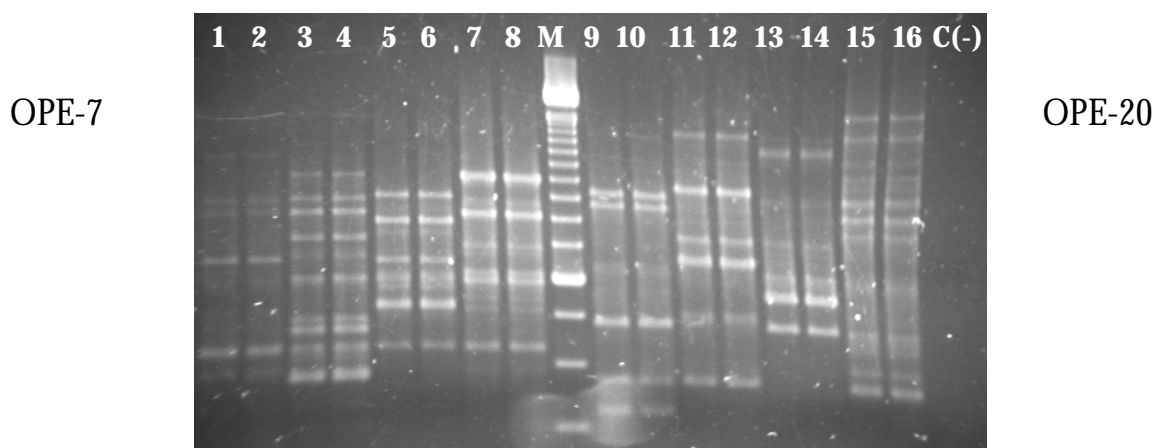


Figura 1.4 Ensayo de reproducibilidad de la técnica de RAPDs. Análisis realizados sobre diferentes suspensiones de cepas bacterianas con 4 meses de diferencia con 2 de los iniciadores, OPE-7 Y OPE-20. Calles 1-2 y 9-10, cepa IVIA 678-2; calles 3-4 y 11-12, cepa Ach5; calles 5-6 y 13-14, cepa IVIA 251-1; calles 7-8 y 15-16, cepa IVIA 1.102. M: marcador 250 pb (Life Technologies); C(-): control negativo

#### 1.4.4 Análisis de RAPDs realizados con colonias aisladas de tumores producidos en el experimento de inoculación empleando la cepa resistente a gentamicina C58R.

El sistema de RAPDs que se ha puesto a punto y que ha permitido la identificación comparativa de un grupo de cepas de colección de *Agrobacterium* debía ser validado en un experimento de inoculación semejante a los que posteriormente se iban a llevar a

cabo para alcanzar otros objetivos de esta memoria. Para ello, se realizó un experimento de inoculación utilizando una cepa de *A. tumefaciens* que presenta resistencia al antibiótico gentamicina (cepa NT1 pTiC58::289 Gen<sup>r</sup>, Von Bodman *et al.*, 1992) . Después de llevada a cabo la inoculación y haberse obtenido tumores en las plantas, se realizaron aislamientos en el medio descrito en Material y Métodos. Todas las colonias obtenidas fueron resistentes al antibiótico gentamicina, y las pruebas bioquímicas y moleculares realizadas para determinar que se trataban de colonias de *Agrobacterium* dieron los mismos resultados para todas. Con ellas se realizó el análisis de RAPDs, empleando ADN según el método apuntado anteriormente y las suspensiones de las colonias en agua. En todos los casos, y con los 4 iniciadores empleados, las colonias produjeron un patrón de bandas idéntico al de la cepa inoculada (Figura 1.5).

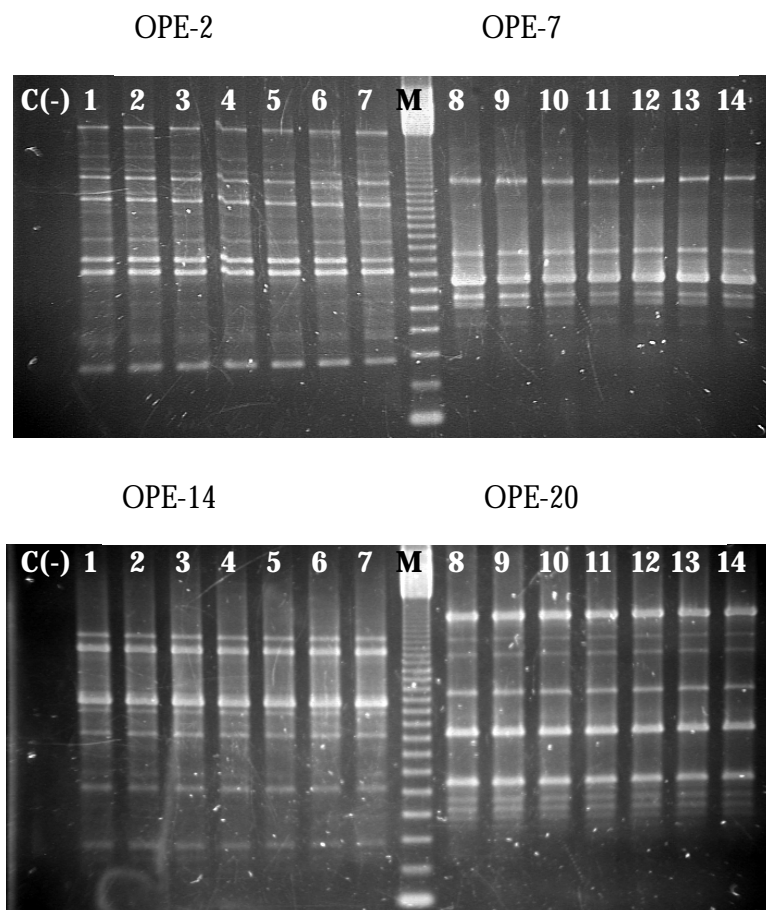


Figura 1.5 Análisis por RAPDs con los iniciadores OPE-2, OPE-7, OPE-14 y OPE-20 de colonias aisladas en el huésped GF 677 de tumores obtenidos con la inoculación de la cepa marcada C58R. Calles 1 a 6 y 8 a 13, diversas colonias aisladas; calles 7 y 14, cepa C58R; M, marcador 123 pb (Life Technologies); C(-): control negativo.

## 1.5 DISCUSIÓN

El objetivo principal de este capítulo consistió en poner a punto un sistema sencillo y rápido para la identificación de colonias de *A. tumefaciens* recuperadas del medio ambiente (suelo, tumores) mediante comparación de los patrones de bandas obtenidos con los de otra cepa de referencia. No se pretendió realizar estudios de filogenia como en otros trabajos publicados (Aznar *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 1995; Parent *et al.*, 1996; Momol *et al.*, 1998), ya que en ese caso se hubiera buscado la obtención de bandas específicas en patrones de bandas comunes, y así poder agrupar las cepas por características comunes. Lo que se quería obtener en nuestro caso eran patrones de bandas suficientemente diversos unos de otros para poder diferenciar entre cepa y cepa. En nuestros estudios posteriores lo que se pretende es poder comparar los aislados obtenidos de tumores producidos en experimentos de inoculación en diversos huéspedes y distinguir las colonias provenientes de las cepas previamente inoculadas de las que no lo son.

El sistema desarrollado ha permitido discriminar entre las cepas bajo estudio, y se ha aplicado tanto con ADN purificado como con suspensiones bacterianas, sin diferencias en los resultados obtenidos, ya que los patrones de bandas obtenidos con las cepas de *Agrobacterium* de distintos orígenes y huéspedes permitieron una distinción clara entre todas ellas. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de conglomerados.

Para la extracción del ADN de las colonias se ha empleado un método que comprende el uso de un tampón de extracción que contiene polivinilpirrolidona (PVP), pero sin la utilización de compuestos tóxicos como el fenol o el cloroformo. Este método se ha empleado con diverso material vegetal (hojas, tallos, tumores, frutos, flores, yemas, tubérculos, semillas, etc.) para la extracción del ADN de material infectado con distintas bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium chrysantemi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) con buenos resultados. Este método se eligió frente a otros para la extracción de ADN porque se lleva a cabo con

menos pasos, lo que facilita el procesamiento de un gran número de muestras, y porque no hace uso de sustancias tóxicas.

La reproducibilidad de la técnica de RAPDs ha sido uno de los aspectos más criticados frente a otras técnicas de identificación o taxonómicas como REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR, AFLP, PCR-RFLP, secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico, entre otras. Sin embargo existe una amplia bibliografía de estudios comparativos entre RAPDs y otras técnicas obteniendo, en general, resultados comparables en unos casos, mejores en otros, respecto a las técnicas comparadas (Pooler *et al.*, 1996; Clerc *et al.*, 1998; Louws *et al.*, 1999; Toth *et al.*, 1999; Giovannacci *et al.*, 1999; Gonçalves y Rosato, 2000). Los distintos análisis realizados con diferentes suspensiones de las mismas muestras en diferentes momentos del trabajo demuestran que los patrones obtenidos son altamente reproducibles. Como se señala en el trabajo de Penner *et al.* (1993), el mayor inconveniente de la técnica de los RAPDs es la reproducibilidad entre distintos laboratorios. Ello es debido a diversos factores, como los reactivos empleados, condiciones de trabajo, material utilizado, etc, pero el más importante es la falta de reproducibilidad en los perfiles de temperatura entre distintos termocicladores, incluso de la misma marca y modelo. Por ello, para evitar cualquier influencia que pudiera modificar el patrón de una cepa con un iniciador dado, siempre se empleó el mismo termociclador y los reactivos de la misma casa comercial, así como el mismo modelo o marca de cualquier otro aparato o reactivo que pudiera influir en la reacción.

En principio, la técnica de RAPDs es más adecuada porque implica un barrido al azar de todo el ADN cromosómico frente a otras técnicas de diferenciación que hacen uso de una parte limitada del genoma (caso de la PCR-RFLP o la secuenciación del fragmento 16S del ARN ribosómico) o emplean secuencias concretas, aunque se encuentren diseminadas a lo largo del genoma (caso de la REP-PCR o ERIC-PCR), proporcionando una mayor variabilidad y, por tanto, mejor poder discriminativo entre cepas. El hecho de disponer de 4 iniciadores permite una mayor seguridad en caso de obtener resultados dudosos en un análisis, ya que en los casos en que se obtengan patrones idénticos a los de la cepa control con un iniciador, se podría realizar el análisis con los tres restantes para confirmar el resultado.

El sistema está diseñado para trabajar con cultivos bacterianos puros, tanto se trate de suspensiones en agua como de ADN purificado. En el caso de que exista una mezcla de bacterias, los RAPDs nos darán una información equívoca, porque el patrón final será la suma de los de los organismos presentes o del que se encuentre en mayor cantidad, sin poder discriminar entre ellos. Se ha descrito anteriormente la existencia de mezclas de bacterias en supuestos cultivos axénicos, incluso cuando se han empleado las buenas prácticas de laboratorio (Li *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto repetidamente la existencia de poblaciones mixtas de *Agrobacterium* en tumores (Cubero *et al.*, 1999, Martí *et al.*, 1999). Por ello es necesario realizar varios pasos de purificación para asegurar que trabajamos con cultivos axénicos de *Agrobacterium*, siendo esta técnica también un método adecuado para controlar la pureza de los cultivos (Nesme, comunicación personal).

Este sistema podría emplearse además para monitorizar la supervivencia de una cepa dada de *Agrobacterium* en diferentes ambientes, en estudios de diversidad microbiológica o para averiguar el origen de un foco epidémico en un vivero, evaluando la posibilidad de que la bacteria responsable se encuentre en el material de partida sospechoso. En nuestros trabajos de identificación, este sistema de RAPDs nos permitió identificar cada colonia analizada, en todos los casos, la identificación se confirmó con otra serie de pruebas analíticas (bioquímicas, fenotípicas, moleculares), que siempre coincidieron con los resultados esperados a partir de la identificación por RAPDs.



## 1.6 CONCLUSIONES

- 1- Se ha puesto a punto un sistema de identificación de cepas de *Agrobacterium* sp. válido tanto para cepas de la especie *A. tumefaciens* (biovar 1), como de las otras especies de este género, *A. rhizogenes*, (biovar 2) y *A. vitis*, (biovar 3) mediante la amplificación al azar con iniciadores inespecíficos (RAPDs)
- 2- El sistema permite la discriminación a nivel de cepa y permite, comparando los patrones obtenidos con los de una cepa determinada, confirmar la identidad de colonias aisladas, sin necesidad de realizar más análisis.
- 3- El sistema se puede emplear tanto con ADN purificado como con suspensiones bacterianas. Estas suspensiones pueden mantenerse tanto en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) como en frío ( $8^{\circ}\text{C}$ ), sin mostrar alteración en los resultados.
- 4- El sistema ha confirmado su validez en un experimento de campo con el empleo de una cepa de *A. tumefaciens* marcada con la resistencia a un antibiótico.

## **CAPÍTULO 2: OBTENCIÓN DE MUTANTES NO PATÓGENOS EN DISTINTOS HUÉSPEDES**

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El origen de los mutantes no patógenos de *Agrobacterium*, y las razones de su aparición en mayor abundancia en un nicho ecológico como los tumores, que teóricamente favorecería a las cepas silvestres patógenas, no se conoce con certeza. Dion *et al.* (1996) propusieron diversas hipótesis cuyo punto central se basa en la generación de agrobacterias no patógenas que son capaces de utilizar las opinas, y su significado ecológico en el género *Agrobacterium*. La presencia en la naturaleza de cepas de *Agrobacterium* no patógenas que catabolizan opinas podría explicarse mediante dos mecanismos. En primer lugar, en condiciones de laboratorio se ha observado la aparición de mutantes espontáneos capaces de utilizar opinas en agrobacterias desprovistas del plásmido Ti (LaPointe *et al.*, 1992). Alternativamente, también podrían producirse derivados del plásmido Ti en los que los elementos genéticos que determinan la patogenicidad, como la región *vir* o el ADN-T, se habrían perdido parcial o totalmente, dando lugar a un pTi “desarmado”. Varias observaciones independientes sugieren que estos derivados desarmados del plásmido Ti se producen en la naturaleza, como en el caso de un megaplásmido de *R. meliloti*, que contiene los genes del catabolismo de la octopina (LaPointe *et al.*, 1992). El plásmido Ti puede transferirse a *R. meliloti* y replicarse en este nuevo huésped, teniendo la oportunidad de recombinar con plásmidos residentes, con la consecuente pérdida de ciertas funciones codificadas por el plásmido Ti original.

Uno de los factores de inestabilidad que provocarían la generación de agrobacterias no patógenas serían las sustancias que producen la inducción de los genes de virulencia, compuestos fenólicos como la acetosiringona, el ácido sinapínico y otros (Fortin *et al.*, 1992). En las heridas producidas en los tejidos vegetales se generan estas sustancias, que al ser percibidas por las cepas patógenas, provocan la activación de los genes de virulencia (Stachel *et al.*, 1985; Spencer y Towers, 1988; Bélanger *et al.*, 1995). Algunos autores (Fortin *et al.*, 1993) han sugerido que la inducción de los genes *vir*, como consecuencia de la activación de la maquinaria de virulencia, podría desencadenar rearrreglos del plásmido Ti que conducirían a la pérdida del poder patógeno. Los genes *virD1* y *virD2* poseen actividad endonucleasa, responsable de la excisión de la región de transferencia (ADN-T) del plásmido Ti (Yanofsky *et al.*, 1986), y podrían dar lugar a derivados no patógenos con deleciones del ADN-T como resultado de estos cortes endonucleolíticos. Esto llevó a la

realización de los primeros experimentos de obtención de mutantes no patógenos en *A. tumefaciens* y se comprobó que la hipótesis no era cierta. Se cultivó la cepa C58 con acetosiringona y se observó que el 100% de los clones individuales analizados habían perdido su capacidad de inducir tumores en tomate y otras plantas huésped, aunque seguían catabolizando la nopalina (Fortin *et al.*, 1992). Cuando se analizó su pTi, se observó que estaban afectados distintos operones de la región *vir*, pero no el ADN-T. Con otro inductor de estos genes, el ácido sinapínico, los efectos sobre la cepa C58 fueron semejantes. Asimismo, el efecto de la acetosiringona fue también el mismo sobre otra cepa diferente de nopalina, la T-37. Sin embargo, con cepas utilizadoras de octopina como la B6S3 o con cepas de C58 conteniendo en lugar del plásmido nativo, los plásmidos de octopina pTiA6NC o de agropina pTiBo542, la acetosiringona no produjo la aparición de mutantes no patógenos (I. Loubens y P. Dion, no publicado).

El estudio detallado de algunos de los clones no patógenos obtenidos con la cepa C58 resaltó el papel de los elementos de inserción endógenos como otro factor de mutagénesis (Cooksey, 1986; Vanderleyden *et al.*, 1986; Fortin *et al.*, 1993). Se observó que tras la activación de los genes de virulencia por parte de los compuestos fenólicos, se producía la mutagénesis por la actuación del elemento de inserción IS426, que está presente en tres copias en el cromosoma de la bacteria pero ausente del plásmido pTi. En estos mutantes, aparecía una copia extra en la región del catabolismo de nopalina o en la región del ADN-T, que causaba la pérdida del poder patógeno.

Por último, la interacción huésped-patógeno podría estar actuando en la generación de mutantes al provocar una inestabilidad genética y mediante un proceso de selección que daría ventajas de supervivencia a las cepas no patógenas. Para confirmar esta hipótesis se realizaron experimentos mediante la inoculación de plantas de manzano cultivadas *in vitro*, de peral y de mora, con varias cepas de *Agrobacterium* y se evaluó la aparición de mutantes no patógenos (Bélanger *et al.*, 1995). Se escogió el manzano como huésped origen de cepas a evaluar y como planta huésped en la que examinar el efecto que la formación de tumores tiene sobre las bacterias con fenotipo patógeno, debido a la dificultad de recuperación de agrobacterias patógenas aisladas de tumores de este huésped, observada en diversos trabajos (Beaulieu *et al.*, 1983; López *et al.*, 1983; Rossignol y Dion, 1985; Tremblay *et al.*, 1987; Canfield y Moore, 1991; Bélanger *et al.*, 1993), lo que

podría indicar una interacción huésped-patógeno que provocaría una marcada inestabilidad genética. Los resultados de la inoculación de las cepas aisladas de tumores de manzano mostraron que algunas de ellas produjeron colonias no patógenas después de su reinoculación en manzanos cultivados *in vitro* y en plantas de peral, mientras que una mostró cierta inestabilidad en mora. Los porcentajes de aparición de colonias no patógenas oscilaron entre un 7% y un 90%, dependiendo de la cepa analizada. En distintos clones no patógenos obtenidos del mismo tumor, el motivo de la pérdida de poder patógeno fue muy parecido en su naturaleza, se presentaron distintas mutaciones en la región *vir* idénticas o muy similares (mutación puntual en *virG*, delección de la región *vir*, mutación puntual en la región promotora del gen *virG*). Con clones aislados de distintos tumores se encontraron diversos tipos de mutaciones, pero todas ellas también en la región *vir*. Sin embargo, cepas aisladas de cerezo y de mora y la cepa C58 no mostraron signos de inestabilidad genética después de su inoculación en manzano.

A lo largo de diversos experimentos de inoculación, realizados durante los últimos años en el laboratorio de Bacteriología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, con distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en distintos huéspedes, para realizar estudios de sensibilidad y control biológico de estas cepas, se observó con frecuencia, cuando se intentaban aislar colonias a partir de los tumores obtenidos, una baja proporción de colonias patógenas o incluso la imposibilidad de aislar colonias con este fenotipo. Esto se produjo independientemente de la cepa inoculada y el huésped empleado.

En este capítulo se describen los experimentos realizados con distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* inoculadas en diversos huéspedes, para estudiar la aparición de mutantes no patógenos en los tumores producidos en las plantas inoculadas y su caracterización molecular preliminar. A diferencia de las investigaciones sobre aparición de mutantes mencionados anteriormente, en los que este fenómeno se observaba exclusivamente en cepas del biovar 2 de *Agrobacterium* (ahora *A. rizhogenes*) obtenidas de manzano, y después de su inoculación en unos pocos huéspedes, los ensayos de este Capítulo se llevaron a cabo con cepas del biovar 1 de diversos orígenes e incluían un rango de huéspedes mayor.

## **2.2. OBJETIVOS**

- Obtener mutantes no patógenos a partir de distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* inoculadas en huéspedes habituales y huéspedes no frecuentes de esta bacteria.
- Identificar las colonias mutantes mediante RAPDs y pruebas bioquímicas.
- Realizar una caracterización molecular preliminar de las posibles causas de la pérdida del poder patógeno.

## 2.3. MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1. Experimentos de inoculación empleando la cepa C58 resistente al antibiótico gentamicina en el huésped GF677.

Se inocularon plantas del híbrido melocotonero x almendro GF677 con la cepa C58 marcada con resistencia al antibiótico gentamicina mediante el plásmido pJB1JI, que da lugar a la cepa denominada C58R (Von Bodman *et al.*, 1992). En estos experimentos se inocularon las cepas de *Agrobacterium* en suelo en macetas, que se llenaron de una mezcla de turba y arena al 50% previamente esterilizada al vapor a 120°C durante una hora. Las bacterias se cultivaron 48h en botellas Roux. Se prepararon suspensiones de una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0,45 a 0,50, lo que equivale a una concentración de bacterias de entre  $8 \times 10^8$  a  $9 \times 10^8$  por ml. Se mezclaron 15 ml de estas suspensiones con 500 ml de agua, que se vertieron posteriormente en la maceta de forma que quedara uniformemente distribuida, regando a continuación. La concentración final de bacterias fue de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  bacterias por g de sustrato. El número de tumores analizados fue de 5, y el número de colonias aisladas que se emplearon en la inoculación de plantas de tomate de 90 (Tabla 2.1). El procedimiento a seguir para el aislamiento de las colonias a partir de los tumores producidos fue el siguiente: los tumores se lavaron exteriormente con jabón y después se flamearon con alcohol. Después de quitar la superficie del tumor con bisturí estéril, de cada uno se escogió aproximadamente 0,1 g de tejido tierno de la parte interna, se dilaceró el trozo en 2 ml de agua estéril y se dejó reposar unos 30 min, posteriormente se realizaron siembras en placas de medio general PYGA suplementado con el antibiótico gentamicina (40 µg/ml), sembrando 50 µl del dilacerado y de las diluciones 1:10 y 1:100. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 h. Las colonias aisladas se purificaron mediante tres pasos sucesivos consistentes en una suspensión en agua estéril y siembra en placa en triple estría, para obtener una colonia bien separada, y repetir este proceso dos veces más. Posteriormente se sembraron las colonias purificadas en el mismo medio para obtener mayor cantidad, y parte de ellas se guardaron en suspensión en agua a 8°C para realizar análisis posteriores. El resto se empleó en las inoculaciones en plantas de tomate. Este proceso de purificación se llevó a cabo con todas las colonias aisladas en todos los experimentos llevados a cabo en esta memoria.

Tabla 2.1. Características de las colonias aisladas de tumores producidos con la cepa C58R en el híbrido melocotonero x almendro GF677.

PLANTA	Frecuencia (clones no patógenos/nº total de clones ensayados) <sup>a</sup>	Presencia de genes <sup>b</sup>		Patrones de RAPDs obtenidos*
		<i>Ipt/tmr</i>	<i>vir</i>	
1	4/18	+	+	1
2	6/20	+	+	1
3	2/22	+	+	1
4	1/15	+	+	1
5	3/15	+	+	1
Total	16/90	+	+	1

a: Los clones se aislaron de tumores en medio de cultivo, y se comprobó su poder patógeno mediante inoculación en plantas de tomate.

b: Análisis mediante PCR con iniciadores específicos de los genes *ipt/tmr* (FGP530-701 y CYT1-2) y *vir* (*virDA-DE*). Las parejas CYT1-2 y *virDA-DE* se utilizaron en combinación en PCR multiplex.

\*: Análisis realizado con cuatro iniciadores de RAPDs. El número indica cuántos patrones diferentes se obtuvieron comparando los mutantes y la cepa C58R entre sí. El 1 indica que se obtuvo el mismo patrón con todos los iniciadores ensayados.

### 2.3.1.1. Inoculación de las colonias para identificar mutantes no patógenos.

Las colonias aisladas se inocularon en plantas de tomate, que se empleó como indicador del poder patógeno tras realizar lecturas a los 30 días. Las plantas fueron del cultivar Roma, mantenidas en invernadero a una temperatura de 20-24°C y una humedad relativa del 60-70%.

La inoculación se realizó mediante un punzón estéril o con palillos esterilizados previamente. Este inóculo se depositó en el tallo de la planta de tomate mediante punción, para hacer una herida al mismo tiempo que se depositaba la bacteria. La inoculación se realizó en dos puntos del tallo separados unos 5 cm. En los casos en los que se obtuvo un resultado negativo, las colonias se volvieron a sembrar en medio PYGA+Gm para realizar una nueva inoculación en planta de tomate.

### 2.3.2. Inoculación de diversas cepas de *A. tumefaciens* en huéspedes herbáceos.

Se inocularon cinco cepas de *A. tumefaciens* en dos huéspedes, uno de ellos tomate como huésped sensible y el otro en pimiento, un huésped recalcitrante a la inoculación y no habitual de esta bacteria. Las cepas empleadas, sus orígenes y características se presentan en la Tabla 2.2. Las plantas de tomate empleadas fueron de la variedad Roma, y



las de pimiento de la variedad Toledo. Se preparó un inóculo de 0,3 (DO<sub>600</sub>) de cada cepa bacteriana y se impregnó un algodón de 2 mm<sup>2</sup> con 30 µl del inóculo. En los tallos de las plantas a inocular se realizaron dos cortes con bisturí estéril dando lugar a una lengüeta, donde se depositó el algodón impregnado y se sujetó con parafilm. Se llevaron a cabo dos inoculaciones de cada planta por cepa a analizar. El experimento se llevó a cabo en dos años sucesivos.

Tabla 2.2. Cepas inoculadas en los experimentos con los huéspedes herbáceos tomate y pimiento.

Cepa	Origen	Biovar	Opina
C58	<i>Prunus cerasus</i>	1	nopalina
A281*	-	1	agropina
Ach5**	<i>Prunus</i> sp.	1	octopina
CFBP 42	Tomate	1	nd
IVIA 1.102	Crisantemo	1	crisopina

\*: Cepa C58 con el plásmido pTiBo542, cedida amablemente por X. Nesme, Francia

\*\* : Cedida amablemente por M.D. Chilton, USA

nd: No determinado

El procedimiento a seguir para el aislamiento de las colonias a partir de los tumores producidos fue el mismo que en el apartado 2.3.1. Con los dilacerados se realizaron siembras en placas de medio Schroth (Schroth *et al.*, 1965), semiselectivo para el biovar 1, sin antibióticos marcadores. Se escogieron 50 colonias aisladas por tumor para ser inoculadas en tomate por cada planta ensayada, en total 200 colonias de cada cepa (dos plantas, dos tumores por cada planta). Se conservaron de la misma manera que en el apartado anterior, en suspensión en agua a 8°C y el resto se inoculó en tallo de tomate.

### 2.3.3. Inoculación de dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en huéspedes leñosos.

Se llevaron a cabo dos estudios de susceptibilidad frente a *Agrobacterium tumefaciens* en 10 huéspedes distintos (Tabla 2.3). En estos experimentos las cepas de *Agrobacterium* se inocularon también en suelo en macetas, con el mismo procedimiento que en 2.3.1.

En un experimento se empleó la cepa IVIA 325-4, obtenida a partir de un tumor del híbrido melocotonero x almendro GF677, que se inoculó en los huéspedes Adafuel (híbrido melocotonero x almendro), GF677, peral, manzano y cerezo. En el otro se

empleó la cepa IVIA 678-2, procedente de melocotonero, que se inoculó en los huéspedes Montclar (melocotonero), Mirobolan (ciruelo), GxN15 y GxN22 (ambos híbridos melocotonero x almendro), albaricoquero y GF677. En ambos experimentos el número de plantas empleado fue de 10 por huésped, se arrancaron a los nueve meses de su plantación y se procesaron. Para el aislamiento de las colonias de los tumores se escogieron, en los casos en que fue posible, cinco tumores de cada huésped procedentes de plantas diferentes, y se procesaron siguiendo el procedimiento del Apdo 2.3.1. Se realizaron siembras en placas de medio Schroth, sembrando 50 µl del dilacerado y de las diluciones 1:10 y 1:100. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 h. La purificación e inoculación de las colonias se realizó de la misma manera que en los apartados anteriores. De cada placa de aislamiento se escogieron 50 colonias por tumor, por lo que a partir de cada huésped se inocularon 250 colonias. En algunos huéspedes no se consiguió aislar este número de colonias, por lo que se inoculó el total que se pudo obtener en los aislamientos (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Tumores obtenidos y colonias aisladas en los experimentos de inoculación en huéspedes leñosos

Inoculación con la cepa IVIA 325-4			Inoculación con la cepa IVIA 678-2		
Huésped	Nº tumores	Nº colonias inoculadas	Huésped	Nº tumores	Nº colonias inoculadas
Adafuel	5	250	Albaricoquero	5	200
GF677	5	250	Montclar	5	69
Peral	1	250	Mirobolan	2	100
Manzano	3	0	GxN15	5	50
Cerezo	5	250	GxN22	5	100
			GF677	5	100

#### 2.3.4. Identificación de las colonias aisladas de los tumores.

Las colonias obtenidas en los aislamientos, procedentes tanto de los tumores de las plantas de las inoculaciones en huéspedes herbáceos y leñosos, como de las procedentes de los experimentos de inoculación con la cepa marcada C58R, se sometieron a pruebas bioquímicas rápidas típicas del género *Agrobacterium* para eliminar aquellas colonias que no dieran resultados positivos. Las pruebas rápidas fueron la de la presencia del enzima ureasa, que debe ser positiva en 24 h en el medio Urea-indol y la de la esculina. Todas las

colonias que posteriormente se inocularon fueron positivas en ambas pruebas. En caso de que una de las pruebas diera negativo, se escogió de la placa de aislamiento otra colonia que sí diera positivo en ambas, hasta completar el número de 50 colonias por tumor.

Las pruebas de identificación mediante RAPDs se realizaron sobre las colonias no patógenas, y sólo como controles se realizaron análisis con algunas patógenas. Los análisis se realizaron empleando suspensiones de aprox.  $10^8$  ufc/ml con la mezcla de reacción y condiciones de amplificación descritas en el Capítulo 1 (Apdo 1.3.4). El iniciador empleado para este primer análisis fue el OPE-7.

Varias de las cepas empleadas en los experimentos de inoculación presentan resistencia a antibióticos (la cepa IVIA 1.102 es resistente a kanamicina, la cepa A281 es resistente a cloranfenicol, la cepa C58 a carbenicilina y cloranfenicol). En estos casos, las colonias que presentaron pérdida del poder patógeno y dieron los mismos patrones de RAPDs que la cepa inoculada se sembraron en medio general PYGA con esos antibióticos (carbenicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), cloranfenicol (20  $\mu\text{g/ml}$ ) y kanamicina (100  $\mu\text{g/ml}$ )), para comprobar si presentaban las mismas resistencias que la cepa inoculada.

#### 2.3.5. Análisis de confirmación de las colonias mutantes.

Con las colonias que presentaron ligeras diferencias en los patrones de bandas con uno de los iniciadores de los RAPDs respecto a la cepa inoculada IVIA 1.102 se realizaron análisis con otros métodos empleados en taxonomía bacteriana para identificar y agrupar especies bacterianas (PCR-RFLP (Ponsonnet y Nesme, 1994); REP-PCR (De Bruijn, 1992); ERIC-PCR (De Bruijn, 1992); BOX-PCR (Louws *et al.*, 1994) para eliminar la posibilidad de que no fueran mutantes procedentes de las cepas inoculadas. El análisis mediante PCR-RFLP se llevó a cabo empleando los iniciadores FGPS6-FGPL132', que amplifican la región intergénica 16S-23S del ADN ribosómico con el protocolo siguiente: tampón de reacción, 1x; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 200  $\mu\text{M}$  dNTPs; 2% (v/v) formamida; 5 pmoles de cada iniciador; 1 unidad de enzima *Taq* polimerasa. Se emplearon 5  $\mu\text{l}$  de muestra en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ . La restricción de los amplificados se llevó a cabo con los enzimas *CfoI*, *HaeIII*, *NdeII* y *TaqI* empleando 10  $\mu\text{l}$  del amplificado correspondiente, 1,5  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 5 unidades del enzima a emplear, en un volumen total de 15  $\mu\text{l}$ . Con el enzima *NdeII* se emplean 1.5  $\mu\text{l}$  de DTT en la mezcla de digestión. Las

condiciones de reacción fueron de 37°C durante 3 h, excepto con el enzima *TaqI*, que se incubó a 65°C. Los análisis mediante REP, ERIC y BOX-PCR se llevaron a cabo con los protocolos siguientes: tampón de reacción, 1x; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 μM dNTPs; 50 pmoles de cada iniciador, 1 unidad de enzima *Taq* polimerasa. Se utilizaron 2 μl de muestra en un volumen final de 25 μl. Esta mezcla fue la misma para todos los análisis. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: con ERIC y BOX-PCR se empleó un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 7 min, 30 ciclos de amplificación de 94°C 1 min, 52°C 1 min y 65°C 8 min, con una elongación final de 65°C durante 16 min. La REP-PCR se llevó a cabo con los mismos ciclos pero con una temperatura de anillamiento de los iniciadores de 44°C. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 0.5x y se visualizaron después de su tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV. Los iniciadores se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Iniciadores empleados en la identificación de las colonias

Iniciador	Secuencia 5' -3'	Análisis	Fuente
FGPS6	GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G	} PCR-RFLP	Ponsonnet y Nesme (1994)
FGPL132'	CCG GGT TTC CCC ATT CGG		
ERIC-1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	} ERIC-PCR	De Bruijn (1992)
ERIC-2R	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G		
BOXAIR	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	→ BOX-PCR	Louws <i>et al.</i> , (1994)
REP1R-I	III ICG ICG ICA TCI GGC	} REP-PCR	De Bruijn, (1992)
REP2-I	ICG ICT TAT CIG GCC TAC		

### 2.3.6. Amplificación de zonas del plásmido Ti involucradas en la patogenicidad.

Los iniciadores escogidos fueron la pareja FGP tmr530-701, que da lugar a un fragmento de 172 pb interno al gen *ipt*, responsable de la síntesis de citoquininas, y que se encuentra en la región del ADN-T (Nesme *et al.*, 1989), y las parejas virDA-DE y CYT1-2 (Haas *et al.*, 1995), que amplifican respectivamente una zona de la región *vir* del plásmido Ti, en el operón *virD*, de 338 pb, y un fragmento de 427 pb del mismo gen *ipt* que los iniciadores FGP tmr530-701, en el ADN-T pero en una zona adyacente, sin solapamiento con éstos. Estas dos últimas parejas se emplearon en una amplificación simultánea (PCR-

multiplex). Con todos estos iniciadores se realizaron análisis de las colonias que resultaron no patógenas en tomate así como con alguna patógena como control. Las condiciones de amplificación y mezclas de reacción fueron, con los iniciadores FGPtr530-701: tampón de reacción, 1x; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 μM dNTPs; 2.5% (v/v) formamida; 12.5 pmoles de cada iniciador; 1 unidad de enzima *Taq* polimerasa, con un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C 3 min; 40 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 1 min 30 s, con una elongación final de 72°C 10 min. La PCR multiplex empleó las siguientes condiciones: tampón de reacción 1x; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 μM dNTPs; 2% (v/v) formamida; 4 pmoles de los iniciadores CYT-1 y CYT-2; 1.5 pmoles de los iniciadores VirDA-DE; 1 unidad de enzima *Taq* polimerasa, empleando 40 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 2 min. En los dos tipos de amplificación se emplearon 5 μl de muestra (suspensión bacteriana de ca. 10<sup>8</sup> ufc/ml) en un volumen final de 50 μl. Una vez obtenidos, los amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 0.5x bajo luz UV después de su tinción con bromuro de etidio (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Iniciadores empleados en la amplificación de las dos zonas del plásmido Ti (región de virulencia y ADN-T).

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Análisis	Fuente
FGPtr530	CCA TGT TGT TTG CTA GCC AG	PCR	Nesme <i>et al.</i> , (1989)
FGPtr701	CCT TCG AAT CCG TCG AAA GC		
VirDA	ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT	} PCR multiplex	Haas <i>et al.</i> (1995)
VirDE	CCT GAC CCA AAC ATC TCG GCT GCC CA		
CYT-1	GAT CGG GTC CAA TGC TGT		
CYT-2	GAT ATC CAT CGA TCC CTT		

### 2.3.7. Inoculación de los mutantes en los huéspedes origen de las cepas parentales.

Todos los clones mutantes que presentaron los mismos perfiles de bandas en los análisis por RAPDs que su cepa parental fueron inoculados en los huéspedes de donde se aislaron las cepas patógenas en estudio (C58 y C58R de cerezo, IVIA 1.102 de crisantemo). Para ello, se realizó un corte con bisturí estéril produciendo una lengüeta y depositando 10 μl de una suspensión de ca. 10<sup>8</sup> cfu/ml en ambos tipos de huéspedes.

### 2.3.8 Análisis de la virulencia de los mutantes obtenidos a partir de la cepa IVIA 1.102.

Con los dos clones que presentaron pérdida de virulencia en los experimentos de inoculación de la cepa IVIA 1.102 en tomate, se llevó a cabo un análisis para determinar si la reducción era significativa o si esa reducción no era suficiente para calificarlas como mutantes de virulencia. Para ello se preparó un inóculo de *ca.*  $10^8$  cfu/ml de la cepa salvaje IVIA 1.102 y de las dos colonias mutantes T32 y T76 ( $0,65$  DO<sub>600</sub>) y se inocularon 15 tomates de igual tamaño y edad con un volumen de 10  $\mu$ l de esta suspensión después de hacer una herida en el tallo con bisturí estéril. Al cabo de 30 días se recogieron los tumores y se pesaron, cortando de la zona que sobresalía del tallo el tejido tumoral.

Los pesos de los tumores obtenidos para la cepa parental y los mutantes se compararon utilizando un análisis de varianza de un factor (Oneway ANOVA) mediante el programa estadístico *SPSS para windows* Version 10.1.3. Se realizó un contraste *a priori* para contrastar el peso de los tumores inducidos por la cepa parental frente a los producidos por los dos mutantes.

## 2.4. RESULTADOS

2.4.1. Evaluación de la pérdida de patogenicidad en los experimentos con la cepa C58R *in planta* e identificación de las colonias aisladas.

La cepa C58R fue inoculada en 10 plantas del híbrido melocotonero x almendro GF677, que se mantuvieron durante 12 meses en invernadero. Al cabo de este tiempo, se aislaron un total de 90 colonias a partir de los tumores generados, y se comprobó su poder patógeno mediante inoculación en plantas de tomate. De las 90 colonias, 16 de ellas presentaron pérdida del poder patógeno, al no ser capaces de producir tumores en el tallo de las plantas.

Los resultados de la identificación de las colonias mutantes con los análisis mediante RAPDs empleando los cuatro iniciadores se muestran en la Figura 2.1 y en la Tabla 2.1. En todos los casos, las colonias presentaron perfiles de bandas idénticos a los de la cepa inoculada, lo que indica que eran mutantes provenientes de la cepa patógena inoculada previamente. Los análisis bioquímicos (ureasa y esculina) también fueron positivos para todas las colonias.

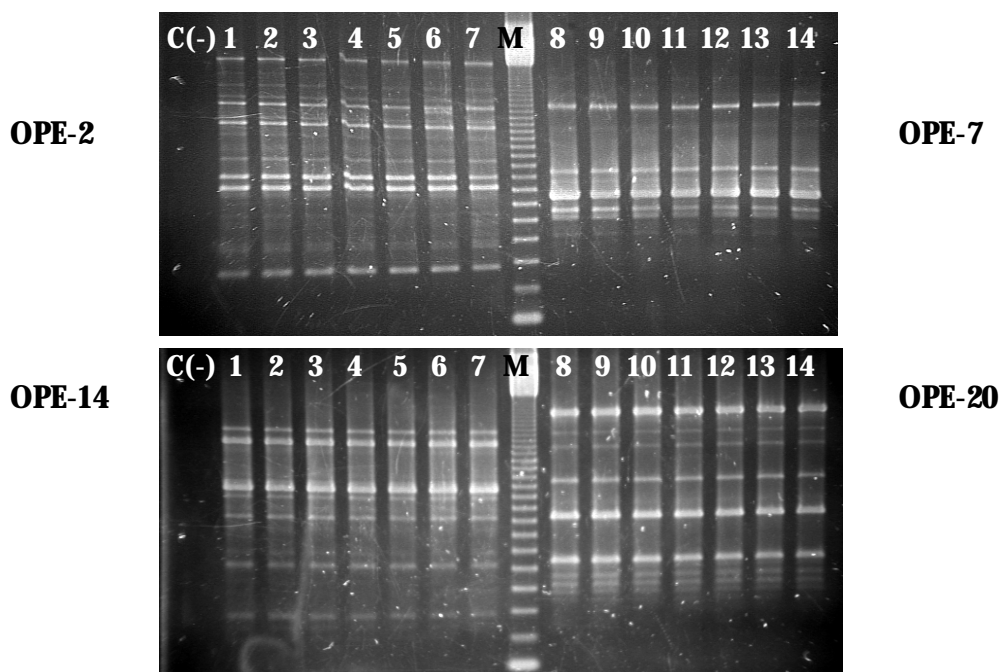


Figura 2.1 Análisis por RAPDs con los iniciadores OPE-2, OPE-7, OPE-14 y OPE-20 de colonias aisladas en el huésped GF 677 de tumores obtenidos con la inoculación de la cepa marcada C58R. Calles 1 a 6 y 8 a 13, colonias aisladas; calles 7 y 14, cepa C58R; M, marcador 123 pb (Life Technologies); C(-): control negativo.

2.4.2. Obtención de mutantes a partir de las inoculaciones de diversas cepas de *A. tumefaciens* en huéspedes herbáceos.

Para obtener resultados en el objetivo de aislar mutantes con pérdida del poder patógeno, se siguió como estrategia adicional a la inoculación en huéspedes naturales de *A. tumefaciens*, el empleo de huéspedes no habituales en este patógeno, como es el caso del pimiento y el tomate, aunque éste último se emplee normalmente para evaluar el poder patógeno de la especie al ser inoculada artificialmente. De los tumores resultantes de la inoculación se aislaron 200 colonias por cada cepa, de las cuales se comprobó su patogenicidad. Los resultados de las inoculaciones de estas colonias en plantas de tomate se muestran en la Tabla 2.6, correspondiente a los experimentos realizados en dos años sucesivos. A pesar de producirse tumores en la inoculación de las cepas de *A. tumefaciens* en el huésped pimiento, en el experimento del primer año no se consiguió aislar colonias tipo *Agrobacterium* con la cepa CFBP42 para su inoculación posterior en plantas de tomate. En el experimento del segundo año esto se produjo también con la cepa Ach5 en el mismo huésped.

 Tabla 2.6. Características de los mutantes no patogénicos aislados de diversas cepas de *A. tumefaciens* en tumores en huéspedes herbáceos (tomate y pimiento).

Cepa y huésped inoculado	Frecuencia (clones no patógenos /nº total de clones ensayados) <sup>a</sup>	Presencia de genes <sup>b</sup>		Nº de patrones de RAPDs con las colonias (-)/Nº de colonias con patrones iguales a la parental
		<i>ipt/tmr</i>	<i>vir</i>	
<b>Primer experimento</b>				
Ach5-tomate	170/200	170(-)	170(-)	2/0
Pimiento	0/200	NA	NA	NA
CFBP42-tomate	0/200	NA	NA	NA
Pimiento	No aislados	NA	NA	NA
C58-tomate	1/200	+	+	1/1
Pimiento	1/200	+	+	1/1
A281-tomate	0/200	NA	NA	NA
Pimiento	0/200	NA	NA	NA
1.102-tomate	2/200	2 (+)	2 (+)	1/2
Pimiento	0/200	NA	NA	NA
<b>Segundo experimento*</b>				
IVIA 1.102-tomate	3/200	3 (-)	3 (+)	1/3**
Pimiento	0/200	NA	NA	NA

a: Los clones se aislaron de tumores en medio de cultivo, y se comprobó su poder patógeno mediante inoculación en plantas de tomate.

b: Análisis mediante PCR con iniciadores específicos de los genes *ipt/tmr* (FGPtmr530-701 y CYT1-2) y *vir* (VirDA-DE). Las parejas CYT1-2 y virDA-DE se utilizaron en combinación en PCR multiplex.

\*: En el segundo experimento sólo aparecieron colonias no patógenas en las inoculaciones con la cepa IVIA 1.102, por lo que únicamente se muestran los datos obtenidos con esta cepa en ambos huéspedes.

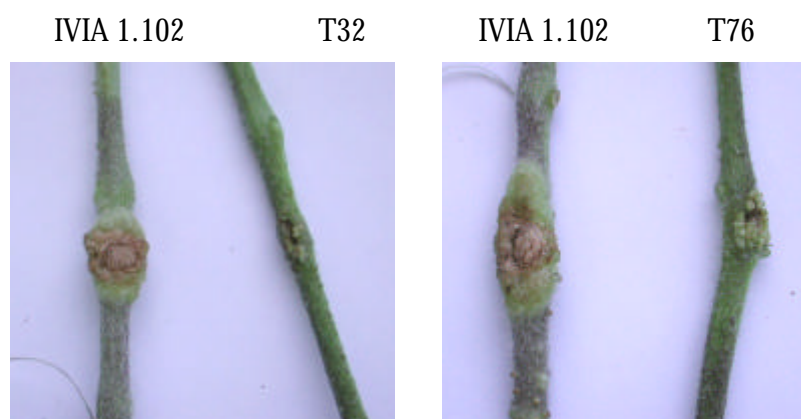
\*\* : Casos en los que aparecieron patrones de bandas ligeramente diferentes con uno de los cuatro iniciadores de RAPDs.

NA: no aplicable



En el experimento del primer año aparecieron un gran número de colonias que presentaron pérdida del poder patógeno en el huésped tomate con la cepa Ach5 (170 de 200 inoculadas), mientras que con la cepa C58 apareció una colonia en tomate y otra en pimiento. Con la cepa IVIA 1.102 aparecieron dos colonias que presentaron pérdida de virulencia en el huésped tomate, ya que producían pequeñas formaciones tumorales al inocularlas en plantas de tomate, mucho más pequeñas que las producidas por la cepa salvaje (Figura 2.2). Estas colonias se aislaron de la misma planta de tomate y procedían del mismo tumor.

Figura 2.2. Tamaño de tumores obtenido con los mutantes T32 y T76 comparados con la cepa IVIA 1.102 en inoculaciones en tallo de tomate.



En el experimento del segundo año únicamente se obtuvieron tres colonias que presentaron pérdida del poder patógeno con la cepa IVIA 1.102 en el huésped tomate, procedentes de la misma planta y tumor. En el resto de cepas todas las colonias aisladas e inoculadas en plantas de tomate dieron tumores, siendo todas ellas patógenas.

Las colonias obtenidas en los aislamientos de los tumores de las plantas inoculadas se analizaron mediante pruebas bioquímicas rápidas (ureasa y esculina) para descartar aquellas que no dieran positivo en alguna de ellas. Con las colonias no patógenas se llevó a cabo el análisis de identificación mediante RAPDs con el iniciador OPE-7. En el experimento del primer año, de las 170 colonias aisladas de tumores provenientes de la inoculación de la cepa Ach5 en el huésped tomate, todos los patrones obtenidos con este iniciador fueron diferentes a los de la cepa inoculada, lo que las descarta como clones mutantes de la cepa inoculada. Sin embargo, las dos colonias poco virulentas aisladas de los tumores producidos por la cepa IVIA 1.102 dieron un resultado idéntico al de esta cepa en los patrones de RAPDs con ese iniciador. Cuando se sometieron a análisis con los

demás iniciadores, los patrones de bandas obtenidos fueron igualmente idénticos (Figura 2.3; Tabla 2.6). En el caso de las colonias mutantes provenientes del experimento con la cepa C58 los análisis por RAPDs fueron idénticos con los cuatro iniciadores empleados (Figura 2.4). La siembra en medio general (PYGA) con los antibióticos cloranfenicol y carbenicilina, en el caso de las colonias aisladas de las inoculaciones con la cepa C58, y con kanamicina con las colonias obtenidas con la cepa IVIA 1.102, dieron positivo en todos los casos.

En el experimento del segundo año, en el que sólo aparecieron tres colonias no patógenas con la cepa IVIA 1.102 provenientes de tumores de tomate, los patrones obtenidos con tres de los iniciadores fueron también idénticos comparando con la cepa inoculada. Con el iniciador OPE-7 se observaron diferencias en unas bandas del perfil obtenido, mientras el resto del patrón permanecía idéntico (Fig. 2.3). Estas colonias fueron resistentes al mismo antibiótico (kanamicina) que la cepa IVIA 1.102.

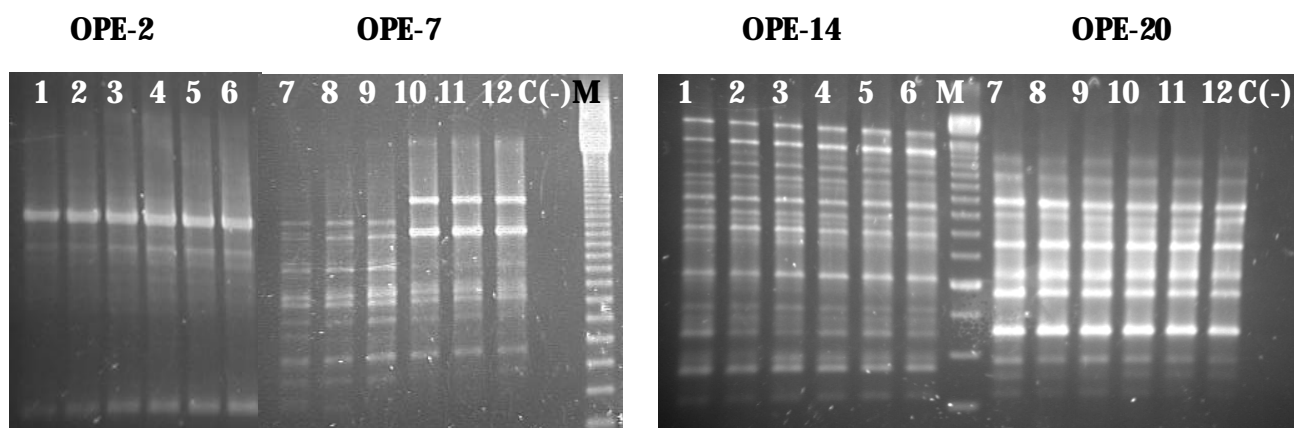


Figura 2.3. Análisis por RAPDs de las colonias mutantes procedentes de la cepa IVIA-1.102. Calles 1 y 7, colonia T22; calles 2 y 8, colonia T38; calle 3 y 9, colonia T67; calles 4 y 10, colonia T32; calles 5 y 11, colonia T76; calles 6 y 12, cepa IVIA 1.102. Análisis con el iniciador OPE-7. Con este iniciador aparecen diferencias parciales en los patrones obtenidos respecto a la cepa inoculada en las colonias de las calles 7 a 9 (T22, T38 y T67). Calle 10, colonia T32; calle 11, colonia T76; calle 12, cepa IVIA 1.102. C(-): control negativo; M: marcador 123 pb (Life Technologies).

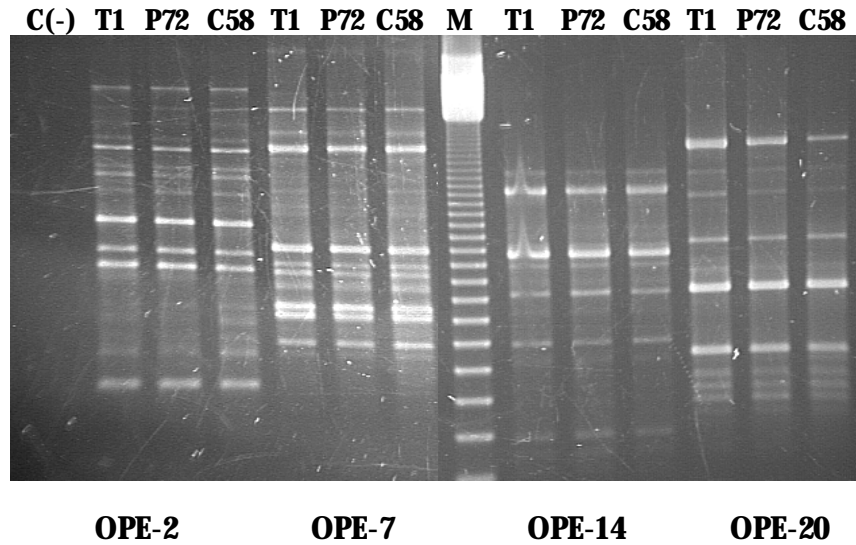


Figura 2.4. Análisis por RAPDs con los 4 iniciadores OPE (2-7-14-20) con las colonias no patógenas aisladas en los experimentos de inoculación del primer año con la cepa C58. No se observan diferencias significativas en los patrones con los cuatro iniciadores. M: marcador 123 bp (Life Technologies); C(-): control negativo.

Con las colonias que presentaron ligeras diferencias en los patrones de bandas con uno de los iniciadores de los RAPDs respecto a la cepa inoculada IVIA 1.102, los análisis con otras técnicas moleculares (PCR-RFLP; REP-PCR; ERIC-PCR y BOX-PCR, Figuras 2.5 y 2.6) dieron el mismo patrón que la cepa parental, lo que apoya la conjetura de que sean clones de esta cepa. El hecho de que aparezcan diferencias en las bandas del perfil de RAPDs con uno de los iniciadores podría deberse a los cambios sufridos por estas colonias, que además de afectar al poder patógeno se podrían reflejar en los análisis realizados mediante RAPDs.

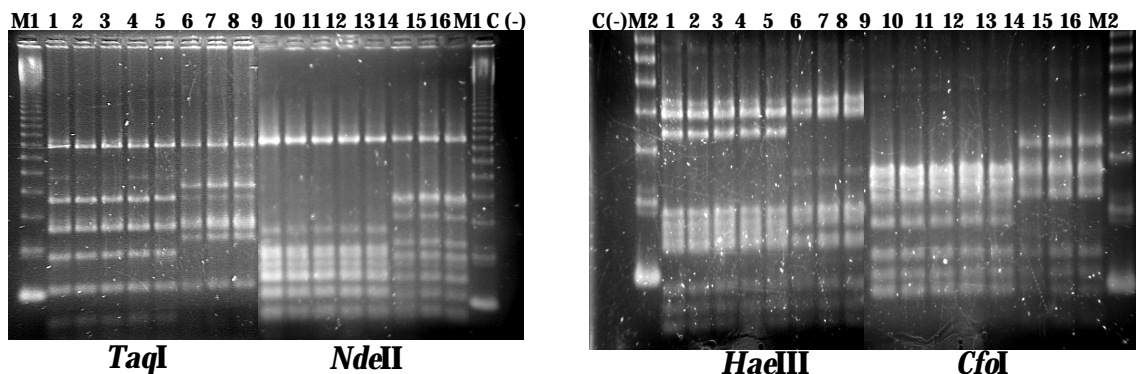


Figura 2.5. Análisis mediante PCR-RFLP de las colonias mutantes obtenidas en las inoculaciones de huéspedes herbáceos a partir de las cepas C58 e IVIA 1.102 con los enzimas *TaqI*, *NdeII*, *Hae III* y *Cfo I*. Calles 1 y 9, cepa IVIA 1.102. Calles 6 y 14, cepa C58. Calles 2 y 10, colonia T22; calles 3 y 11, colonia T38; calles 4 y 12, colonia T67; calles 5 y 13, colonia T32. Calles 7 y 15, colonia T1; calles 8 y 16, colonia P72. M1: marcador 250 pb (Life Technologies); M2: marcador 250 pb (Life technologies); C(-): control negativo.

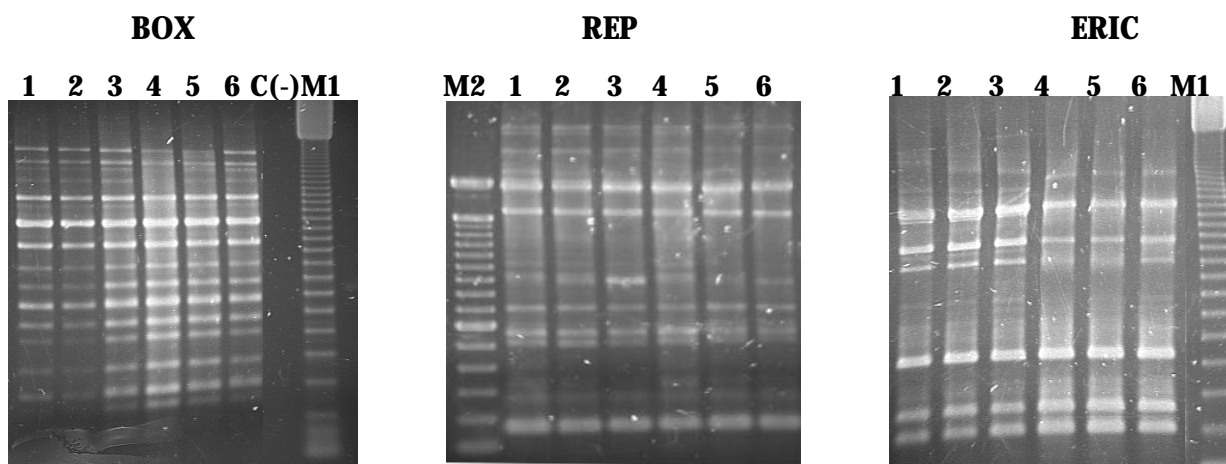


Figura 2.6. Análisis mediante BOX, REP y ERIC-PCR de las colonias mutantes obtenidas con la cepa IVIA 1.102. Calle 1, colonia T22; calle 2, colonia T38; calle 3, colonia T67; calle 4, colonia T32; calle 5, colonia T76; calle 6, cepa IVIA 1.102; C (-), control negativo; M1: marcador de 123 pb (Life Technologies); M2: marcador de 100 pb (Life Technologies)

#### 2.4.3. Evaluación de las colonias obtenidas a partir de los tumores producidos en los experimentos de inoculación de dos cepas de *A. tumefaciens* en huéspedes leñosos.

Los experimentos de inoculación de cepas de *A. tumefaciens* para obtener mutantes no patógenos se completaron con el empleo de diversos huéspedes habituales de este patógeno para observar posibles diferencias en los resultados debidos a una posible interacción huésped-patógeno.

##### 2.4.3.1 Análisis de las inoculaciones en tomate

Los resultados de los aislamientos e inoculaciones en tomate de los aislados obtenidos en los experimentos realizados con la cepa IVIA 325-4 se muestran en la Tabla 2.7. El número de tumores obtenidos no fue el mismo en todos los huéspedes, por lo que en algún caso se tomaron dos o más muestras del mismo tumor hasta completar el número de cinco aislamientos por cada huésped. A partir del huésped manzano no se consiguieron aislar colonias tipo *Agrobacterium*. En los huéspedes Adafuel, cerezo y GF677 las colonias que no produjeron tumores en tomate fue elevado aunque variable según la planta inoculada. En peral no se obtuvieron colonias no patógenas, aunque en este caso, al producirse sólo un tumor de las 10 plantas inoculadas, todas las colonias aisladas (250) provinieron del mismo.

Tabla 2.7. Características de los mutantes no patogénicos de la cepa IVIA 325-4 aislados de tumores en diversos huéspedes leñosos.

Huésped y tumor	Frecuencia (clones no patógenos /nº total de clones ensayados) <sup>a</sup>	Presencia de genes <sup>b</sup>		nº patrones de RAPDs obtenidos
		<i>Ipt/tmr</i>	<i>vir</i>	
Adafuel-1	50/50	50 (-)	50 (-)	1
Adafuel-2	0/50	NA	NA	NA
Adafuel-3	50/50	50 (-)	50 (-)	2
Adafuel-4	50/50	50 (-)	50 (-)	2
Adafuel-5	50/50	Nd	Nd	Nd
Cerezo-1	50/50	50 (-)	50 (-)	3
Cerezo-2	2/50	2 (-)	2 (-)	1
Cerezo-3	50/50	50 (-)	50 (-)	2
Cerezo-4	0/50	NA	NA	NA
Cerezo-5	3/50	3 (-)	3 (-)	1
GF677-1	3/50	3 (-)	3 (-)	2
GF677-2	0/50	NA	NA	NA
GF677-3	50/50	50 (-)	50 (-)	1
GF677-4	0/50	NA	NA	NA
GF677-5	31/50	31 (-)	31 (-)	2
Peral-1	0/250	NA	NA	NA

a: Los clones se aislaron de tumores en medio de cultivo, y se comprobó su poder patógeno mediante inoculación en plantas de tomate.

b: Análisis mediante PCR con iniciadores específicos de los genes *ipt/tmr* (FGP530-701 y CYT1-2) y *vir* (*virDA-DE*). Las parejas CYT1-2 y *virDA-DE* se utilizaron en combinación en PCR multiplex.

NA: No aplicable

Nd: no determinado

Los resultados de los aislamientos e inoculaciones en tomate de las colonias obtenidas en los experimentos realizados con la cepa IVIA 678-2 se muestran en la Tabla 2.8. Con esta cepa no se consiguió aislar colonias tipo *Agrobacterium* de varios de los tumores obtenidos en los distintos huéspedes, lo que hace que el número de colonias analizadas sea menor que en el caso de la cepa IVIA 325-4. Así, los aislamientos obtenidos fueron algo más de la mitad (619 aislamientos frente a 1.000). El número de colonias inoculadas que presentaron el fenotipo no patógeno resultó elevado en los huéspedes albaricoquero y Mirobolan, mientras que en GF677 no se aislaron colonias no patógenas. Con las colonias que no produjeron tumores en tomate, y dos positivas como control, se procedió a realizar los análisis de identificación mediante RAPDs. En caso de semejanza en los patrones obtenidos, comparando con las cepas inoculadas, se procedería a analizar las colonias con los otros tres iniciadores descritos en el Capítulo 1 para confirmar la identidad de las colonias.

Tabla 2.8. Características de las colonias no patógenas de la cepa IVIA 678-2 aisladas de tumores en diversos huéspedes leñosos.

Huésped y tumor	Frecuencia (clones no patógenos /nº total de clones ensayados) <sup>a</sup>	Presencia de genes <sup>b</sup>		Nº patrones de RAPDs obtenidos
		<i>ipt/tmr</i>	<i>vir</i>	
Mirobolan-1	5/50	5 (-)	5 (-)	1
Mirobolan-2	10/50	10 (-)	10 (-)	1
Al-1	0/50	NA	NA	NA
Al-2	33/50	Nd	Nd	Nd
Al-3	32/50	32 (-)	32 (-)	3
Al-4	0/50	NA	NA	NA
Montclar-1	5/50	5 (-)	5 (-)	1
Montclar-2	0/19	NA	NA	NA
GxN22-1	0/50	NA	NA	NA
GxN22-2	0/50	NA	NA	NA
GxN15-1	4/50	4 (-)	4 (-)	1
GF677-1	0/50	NA	NA	NA
GF677-2	0/50	NA	NA	NA

a: Los clones se aislaron de tumores en medio de cultivo, y se comprobó su poder patógeno mediante inoculación en plantas de tomate.

b: Análisis mediante PCR con iniciadores específicos de los genes *ipt/tmr* (FGP530-701 y CYT1-2) y *vir* (*virDA-DE*). Las parejas CYT1-2 y *virDA-DE* se utilizaron en combinación en PCR multiplex

NA: No aplicable

Nd: no determinado

#### 2.4.3.2 Análisis mediante RAPDs de las colonias no patógenas

Los resultados obtenidos, a diferencia de lo que se esperaba, mostraron que tanto en el experimento de inoculación con la cepa IVIA 325-4 como con la cepa IVIA 678-2, ninguna de las colonias negativas en tomate presentó perfiles de RAPDs semejantes a las cepas inoculadas. Incluso, el número de patrones de bandas obtenido en colonias provenientes del mismo huésped y tumor llega en algunos casos a dar tres diferentes (cerezo, Adafuel, albaricoquero) (Tablas 2.7 y 2.8; Figuras 2.7 y 2.8). Ninguna de estas colonias es, en principio, mutante, ya que no son clones procedentes de las cepas patógenas inoculadas inicialmente en un huésped determinado, o al menos, no son mutantes de estas cepas en concreto. En estos experimentos, por lo tanto, no se consiguió obtener mutantes con pérdida del poder patógeno. Las colonias patógenas que se analizaron como control en los dos experimentos (dos colonias por cepa y huésped) dieron el mismo perfil de bandas que la cepa inoculada con los cuatro iniciadores en los análisis por RAPDs.

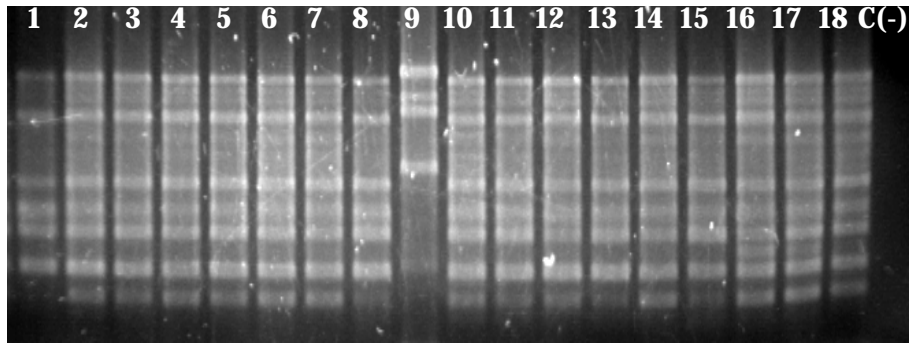


Figura 2.7. Análisis por RAPDs de colonias aisladas de tumores en el huésped GF 677 inoculado con la cepa IVIA 325-4. Calles 1 a 18, colonias aisladas en los distintos tumores analizados; Calle 9, cepa inoculada IVIA 325-4. Todas las colonias son iguales entre sí y diferentes a la cepa inoculada IVIA 325-4. C(-): control negativo.

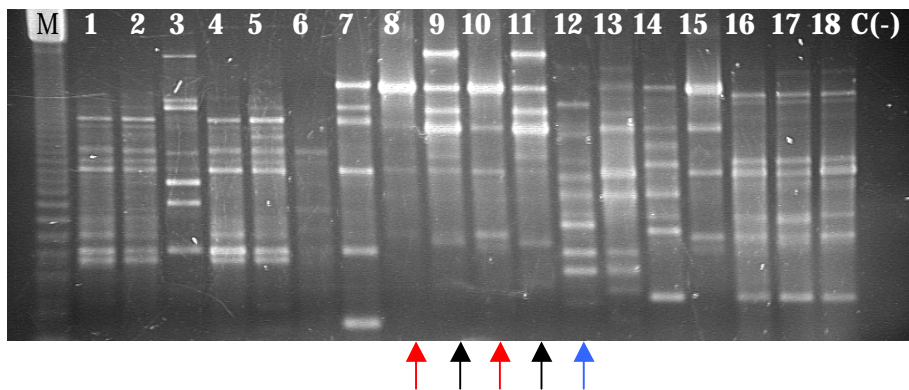


Figura 2.8. Diversidad de patrones de RAPDs obtenidos en colonias aisladas de tumores analizados de varios huéspedes: Calle 1, colonia aislada del huésped Adafuel, tumor 1; Calles 2, 3 y 4, colonias del mismo huésped y tumor 3; Calles 5-6, colonias del mismo huésped y tumor 4; Calle 7, cepa inoculada IVIA325-4; Calles 8 a 18, colonias aisladas del huésped cerezo. Calles 8 a 12, colonias del tumor 1; Calle 13, colonia del tumor 2; Calles 14-15, colonias del tumor 3; Calles 16-18, colonias del tumor 5. M, marcador 123 bp (Life Technologies); C(-), control negativo. Las flechas señalan los distintos patrones obtenidos con colonias provenientes del tumor 1 de cerezo.

#### 2.4.4. Amplificación de las zonas involucradas en la patogenicidad.

En los experimentos con la cepa marcada C58R, todos los clones mutantes dieron positivo con los tres pares de iniciadores, lo que indica que todos poseen el plásmido Ti, y que la causa de la pérdida del poder patógeno debe residir en cambios moleculares bien a nivel del plásmido, bien en los genes cromosómicos (Tabla 2.1).

En el primer experimento de inoculación en huéspedes herbáceos, y como se observa en la Tabla 2.6, las colonias aisladas de tumores obtenidos con la cepa Ach5 no produjeron señal de amplificación con iniciadores de la región del ADN-T, y tampoco

ninguna dió positivo con los de la región *vir*. Con las colonias procedentes de las cepas C58 e IVIA 1.102, todas amplificaron con los iniciadores empleados, tanto del ADN-T como de la región *vir*. En el segundo experimento, con las colonias provenientes de la cepa IVIA 1.102 se observó que con los iniciadores del gen *ipt*, de la región del ADN-T no hubo señal de amplificación, mientras con los iniciadores VirDA-DE, de la región *vir*, sí se obtuvo amplificación (Figura 2.9). Esto conduce a pensar que debe ser una zona del ADN-T, que incluye este gen *ipt*, la afectada en estos mutantes, y la probable causa de su pérdida del poder patógeno.

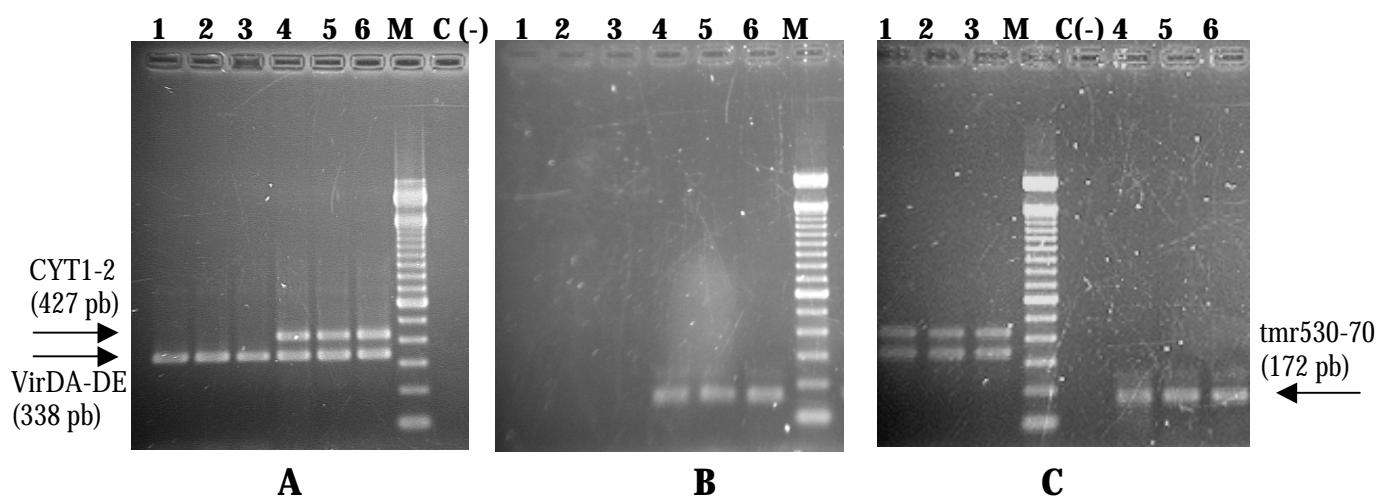


Fig. 2.9. Análisis de amplificación de las regiones del ADN-T y de la región *vir* de los clones no patógenos obtenidos en las inoculaciones en huéspedes herbáceos. A) Análisis mediante PCR multiplex de los mutantes obtenidos de la cepa IVIA 1.102 y B): Análisis mediante los iniciadores FGP tmr 530-701, de la región del ADN-T: calle 1: T22; calle 2: T38; calle 3: T67; calle 4: T32; calle 5: T76; calle 6: cepa IVIA 1.102. C): Análisis de los clones no patógenos procedentes de la cepa C58 mediante PCR multiplex (calles 1 a 3) y con los iniciadores FGPTmr de la región del ADN-T (calles 4 a 6). Calle 1: T1; calle 2: P72; calle 3: cepa C58; calle 4: T1; calle 5: P72; calle 6: cepa C58. M: marcador 100 pb (Life Technologies); C(-): control negativo.

En los experimentos de inoculación en huéspedes leñosos se llevaron a cabo los análisis por amplificación de regiones del plásmido Ti en todas las colonias tipo *Agrobacterium* que dieron negativo en la inoculación en plantas de tomate, aunque sus perfiles de RAPDs no fueran iguales a los de la cepa inoculada. Los resultados de estos análisis se muestran en las Tablas 2.7 y 2.8. En ellos se observa que no se obtuvo señal de



amplificación con los iniciadores de ambas zonas de patogenicidad en ninguna de las colonias no patógenas.

2.4.5. Inoculación de los mutantes en los huéspedes de donde proceden las cepas parentales.

Los clones negativos en tomate con el mismo perfil de bandas en los análisis de RAPDs obtenidos en los aislamientos de los experimentos de inoculación realizados con la cepa C58R y la cepa IVIA 1.102 dieron también resultado negativo al ser inoculados en los huéspedes correspondientes a cada cepa (cerezo con C58R, crisantemo con IVIA 1102). Los mutantes que presentan pérdida de virulencia (T32 y T76) dieron tumores del mismo tamaño que la cepa parental (IVIA 1.102) en crisantemo. Con los mutantes procedentes de la cepa C58, la colonia P72, obtenida de un tumor en pimiento, dió negativo en el huésped cerezo, mientras la colonia T1, obtenida en tomate, proporcionó tumores del mismo tamaño que la cepa inoculada C58 (Figura 2.10). El clon T1 presenta una reducción en el rango de huéspedes, lo que estaría dentro de lo que se denomina pérdida de virulencia.

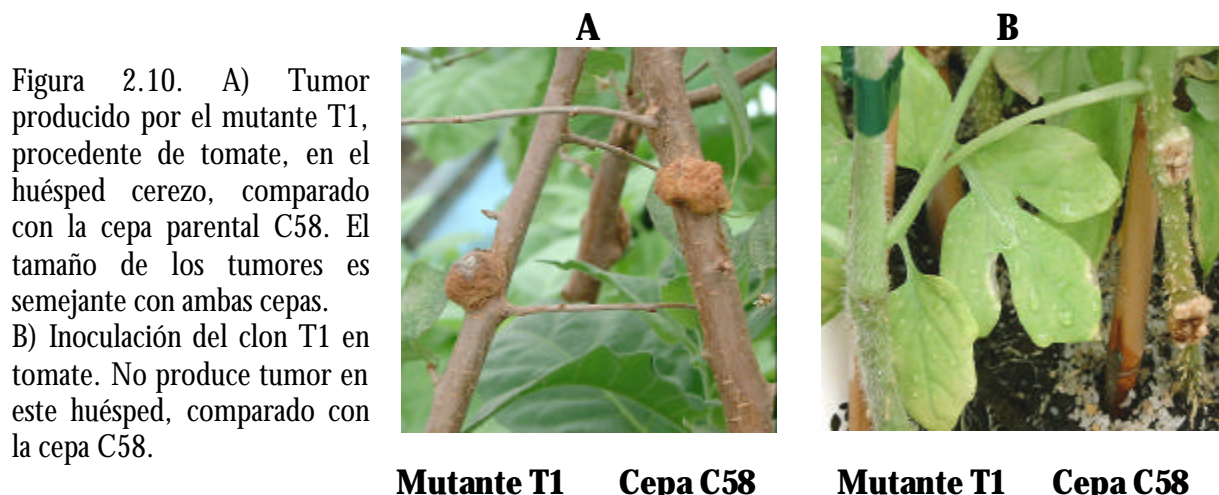


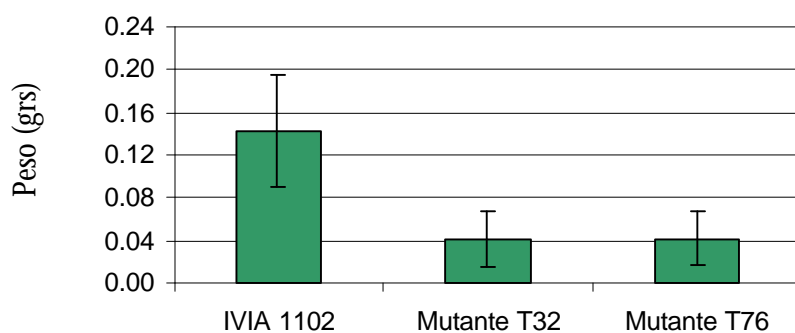
Figura 2.10. A) Tumor producido por el mutante T1, procedente de tomate, en el huésped cerezo, comparado con la cepa parental C58. El tamaño de los tumores es semejante con ambas cepas. B) Inoculación del clon T1 en tomate. No produce tumor en este huésped, comparado con la cepa C58.

2.4.6 Análisis de virulencia con los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102

Los resultados obtenidos con las inoculaciones de las suspensiones de cada uno de los mutantes y de la cepa salvaje IVIA 1.102 se muestran en la figura 2.11. En ella se observa que el tamaño aparente de los tumores provocados por la cepa salvaje son mayores, en general, que los producidos por estos dos mutantes. Los pesos de los tumores

obtenidos de cada tallo inoculado se compararon entre sí, y los resultados obtenidos en el análisis de varianza indican que existen diferencias significativas entre los tumores inducidos por la cepa parental (IVIA 1102) y los mutantes con pérdida de virulencia.

Fig.2.11. Tumores producidos por los mutantes T32 y T76 que presentan pérdida de virulencia. Se observa una reducción en los tamaños comparado con los de la cepa parental.



Gráfica 2.1. Gráfico comparativo de las medias de los pesos de los tumores producidos con la cepa IVIA 1.102 y los mutantes T32 y T76 obtenidos en el experimento de inoculación en huéspedes herbáceos del primer año.

## 2.5 DISCUSIÓN

No se han encontrado trabajos en la bibliografía sobre la aparición de mutantes espontáneos de cepas de *A. tumefaciens* en tumores excepto los trabajos *in planta* de Bélanger *et al.*, (1993; 1995). Dichos trabajos están limitados por el hecho de haber utilizado cepas del biovar 2 y obtenidas sólo en manzano, aunque se han incluido en estos estudios otras cepas y otros huéspedes, pero en muy escaso número. Sólo se han realizado observaciones acerca de la dificultad o imposibilidad de recuperar colonias patógenas en tumores de huéspedes concretos (Canfield y Moore, 1991; Bélanger *et al.*, 1993; Picard, 1993; Cubero *et al.*, 1999), pero no se ha estudiado a fondo este fenómeno.

En el experimento con la cepa marcada C58R, los resultados que se han obtenido con las colonias que no producen tumores en plantas de tomate, demuestran que se obtuvo un elevado número de mutantes no patógenos que proporcionaron el mismo patrón de RAPDs que la cepa inoculada. Por consiguiente, se ha conseguido aislar colonias que presentan pérdida del poder patógeno y que son mutantes de la cepa C58R. El porcentaje de aparición de este fenotipo es elevado (18%), más teniendo en cuenta que es una cepa del biovar 1, en el que hasta la fecha no se había observado este fenómeno. Si comparamos con los datos obtenidos en otros trabajos, donde se llega a porcentajes del 90% de mutantes (Bélanger *et al.*, 1995), los obtenidos en el presente trabajo son menores, pero es necesario señalar que aquéllos se produjeron con una cepa perteneciente al biovar 2 y obtenida en manzano, un huésped conocido por la dificultad de recuperar clones patógenos.

Los análisis por PCR de estos clones dieron positivo con todos los iniciadores específicos del plásmido Ti empleados, lo que indica que el mismo está presente en todos los mutantes, por lo que podría ser una o varias modificaciones en el plásmido y/o en los genes cromosómicos involucrados en el carácter patógeno los responsables de esta pérdida fenotípica. En este experimento, al emplear como medio de aislamiento un medio general suplementado con el antibiótico gentamicina, no se aislaron otras bacterias no patógenas susceptibles al antibiótico, que podrían haberse confundido con las mutantes. La inoculación de estos mutantes en el huésped cerezo parece confirmar el fenotipo de pérdida de patogenicidad.

En los experimentos de inoculación del primer año en plantas herbáceas, se obtuvieron a partir de los tumores de la cepa Ach5 inoculada en tomate un gran número de colonias tipo *Agrobacterium* que no fueron patógenas en tomate (170 de 200), pero los análisis por RAPDs demostraron que no eran clones de la cepa inoculada. En las otras inoculaciones se aislaron dos colonias procedentes de la cepa IVIA 1.102 que dieron perfiles de bandas idénticos en el análisis de RAPDs y que proporcionaron tumores de pequeño tamaño. Con la cepa C58 también se aislaron dos colonias que no produjeron tumores en plantas de tomate, y los análisis por RAPDs dieron patrones idénticos con los cuatro iniciadores. Al tratarse de colonias procedentes de la cepa C58, casi idénticas a la C58R, se observa una gran diferencia en el porcentaje de colonias no patógenas obtenidas en ambos casos. Podría deberse a una interacción con la planta huésped, que en el caso del híbrido GF677 habría producido una mayor inestabilidad genética en la cepa inoculada y/o a la mayor ventaja selectiva de los mutantes producidos en el experimento con la cepa C58R respecto a la cepa salvaje, comparado con los mutantes obtenidos con la cepa C58, o a una característica propia de la cepa resistente al antibiótico gentamicina frente a la no resistente.

Las colonias obtenidas con la cepa IVIA 1.102 procedieron de la misma planta y tumor, y en este caso se produjo una pérdida de virulencia significativa, ya que los tumores que estos mutantes produjeron en plantas de tomate fueron más pequeños comparados con la cepa salvaje. El análisis comparado del peso de los tumores obtenidos en tomate mostró que hay diferencias significativas entre los provocados por la cepa salvaje y los obtenidos mediante la inoculación de los mutantes. Los análisis mediante PCR indicaron la presencia del plásmido Ti en todas los clones obtenidos, lo que vuelve a indicar que la pérdida de virulencia no se debe a la falta del pTi. La aparición de colonias no patógenas en la inoculación de la cepa Ach5 en tomate, que no coinciden en los perfiles de RAPDs, plantea la cuestión sobre el origen de las mismas y si estas cepas no patógenas presentan ventajas selectivas frente a las cepas patógenas. En este caso los análisis negativos por PCR parecen indicar la carencia del plásmido Ti, lo que explicaría la ausencia de poder patógeno.

En los experimentos del segundo año sólo aparecieron tres clones no patógenos con la cepa IVIA 1.102, procedentes de un mismo tumor de tomate. Los análisis mediante

RAPDs mostraron que los patrones son idénticos con tres de los cuatro iniciadores. Con el iniciador OPE-7, los patrones presentaron diferencias en algunas bandas, mientras otras fueron idénticas, lo que podría ser debido a diferencias de tipo genético en el plásmido o los cromosomas. El análisis mediante otras técnicas moleculares (RFLPs, ERIC, BOX, REP-PCR) apoya la identidad entre la cepa inoculada y las recuperadas. Los análisis por PCR de las colonias mutantes no patógenas sugieren cambios en la región del gen *ipt* del ADN-T, pero no evidenciaron modificaciones de la región *vir*, lo que indicaría la presencia del plásmido Ti pero con posibles inserciones o deleciones que explicarían la pérdida del poder patógeno debido a cambios en dicho gen o en un área en la que también se vería afectado este gen. Un resultado similar se obtuvo en un trabajo cuyo objetivo era el diseño de dos parejas de iniciadores para la detección de cepas patógenas de *Agrobacterium* (Haas *et al.*, 1995). En particular, se diseñó una pareja de iniciadores de la región *vir* (VirDA-DE) con la idea de que permitiera detectar todos los patógenos del género *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis*, según nomenclatura antigua) mientras la otra pareja de iniciadores eran de la región del ADN-T (CYT1-2) y sólo detectarían los patógenos pertenecientes a *A. tumefaciens*. En este trabajo, una de las cepas clasificadas con la antigua nomenclatura como *A. radiobacter*, y por tanto, no patógena, dió positivo con los iniciadores de la región *vir*, mientras era negativa con los iniciadores del ADN-T, cuando debía haber sido negativa en ambos análisis. Posiblemente sería más lógico pensar que se trataba de una cepa de *A. tumefaciens* que por diversos motivos pudo haber sufrido cambios en la región del ADN-T y haber perdido su carácter patógeno, en vez de ser una cepa no patógena que presenta genes de la región *vir* en un plásmido diferente al Ti. Se trataría, pues, de una cepa mutante que habría aparecido de forma espontánea y que se habría aislado en un tumor de rosal. Esto es un ejemplo de la confusión que existía en la clasificación y taxonomía de este género que se basaba en caracteres fenotípicos o en presencia/ausencia del plásmido Ti.

Las inoculaciones de los mutantes procedentes de la cepa C58 en el huésped de donde se aisló originariamente (cerezo) dieron tumores del mismo tamaño con el clon T1, mientras que P72 fue negativo. La inoculación de los mutantes obtenidos con la cepa IVIA 1.102 en el huésped crisantemo fue negativa con los mutantes que no inducen tumores en tomate pero los que presentaron pérdida de virulencia dieron tumores semejantes a la cepa

parental. Esto confirma, por un lado, el fenotipo de pérdida de virulencia de los mutantes T32 y T76, y por otro, hace que se clasifique el mutante T1 con reducción de virulencia y no como con pérdida del poder patógeno.

Los clones obtenidos en el desarrollo de esta tesis, se comprobó que presentaban resistencia a los mismos antibióticos que las cepas de las que proceden (C58 a carbenicilina y cloranfenicol, IVIA 1.102 a kanamicina), lo que apoya su semejanza. Sin embargo, en estos experimentos también se comprobó la presencia de colonias resistentes a los mismos antibióticos que las cepas inoculadas, pero que no pertenecían al género *Agrobacterium*. Esto ocurrió con colonias aisladas de tumores obtenidos con la cepa A281, resistente a cloranfenicol, y con la cepa IVIA 1.102, resistente a kanamicina, ya que aparecieron colonias que siendo resistentes a dichos antibióticos, no dieron positivo en las pruebas bioquímicas típicas de *Agrobacterium*. Estos datos indican que existe el riesgo de tomar como colonias provenientes de una previa aquéllas que presentan la misma resistencia a un antibiótico que la original. Sin embargo, el empleo de RAPDs permite confirmar la identidad de los clones bajo estudio y su diferenciación de otras bacterias que puedan presentar el mismo fenotipo. Esto lleva a preguntarse hasta qué punto son fiables los resultados y conclusiones de trabajos llevados a cabo con cepas marcadas con resistencia a antibióticos en ambientes complejos (suelo, tumores, etc.) donde existe una gran diversidad de bacterias del mismo o diferente género o especie que pueden presentar esas mismas resistencias.

Los resultados obtenidos en la inoculación de las colonias aisladas tipo *Agrobacterium* procedentes de tumores de plantas leñosas podrían llevar a la conclusión de que el fenómeno de la pérdida espontánea del poder patógeno es un fenómeno muy frecuente y fácilmente observable, dado el gran número de colonias que se aislaron con este fenotipo. Esto contradice los resultados de trabajos previos en los que se han empleado cepas del biovar 1, y donde no se consiguió obtener mutantes *in planta*. El análisis de la identidad de estas colonias mediante la técnica de RAPDs, puesta a punto en el Capítulo 1, demostró que no apareció una sola colonia no patógena procedente de las cepas previamente inoculadas. Sólo se recuperaron colonias patógenas, clones de las previamente inoculadas, y agrobacterias no patógenas cuya procedencia no está clara. Podrían estar presentes en las plantas de forma endofita o provenir de fuentes externas, como el agua de riego, el aire o

algún otro medio (Favre-Amiot *et al.*, 1979). Los resultados de estos experimentos de inoculación en especies leñosas concuerdan con los experimentos del grupo del profesor Dion, es decir, no se obtuvieron mutantes de cepas del biovar 1 en huéspedes comunes.

Destaca el hecho de que a partir de algunos huéspedes se consiguiera aislar en mayor número colonias no patógenas que patógenas (caso de Adafuel, cerezo, almendro). Este fenómeno se ha observado anteriormente (Dion *et al.*, 1996) y se ha postulado que se debería a la ventaja selectiva que conllevaría la presencia de un plásmido Ti alterado o a su ausencia, frente al plásmido intacto. Hay también grandes diferencias en cuanto al número de colonias tipo *Agrobacterium* aisladas con las dos cepas inoculadas (1.000 colonias frente a 619), ya que con la cepa IVIA 678-2, y con todos los huéspedes, se encontraron siempre dificultades para aislar colonias tipo *Agrobacterium*. Con el huésped manzano no fue posible aislar colonias tipo *Agrobacterium*, lo que confirma sus especiales características.

La presencia de una población heterogénea de agrobacterias, detectada por los distintos patrones de RAPDs obtenidos a partir de los aislados de un huésped (hasta tres diferentes en algunos casos) en el interior de los tumores producidos por cepas patógenas refleja la coexistencia de todas ellas, ya sea en competencia o en armonía. Los análisis por PCR de las colonias no patógenas parecen indicar la ausencia del plásmido Ti, aunque no se puede descartar la presencia del mismo pero con zonas afectadas de forma que no amplifiquen con los iniciadores empleados.

No se llevaron a cabo análisis del metabolismo de las opinas en ninguno de los mutantes obtenidos, pero la presencia del plásmido Ti en todas las colonias, verificado mediante amplificaciones con iniciadores específicos del plásmido indica que probablemente todos poseen la región para su catabolismo, y por tanto, presentarían una ventaja selectiva. Tampoco se comprobó la capacidad de utilizar estos compuestos por parte de las colonias no patógenas obtenidas en los distintos experimentos en gran número, por lo que este mismo postulado podría aplicarse para ellas. Esta hipótesis debe, sin embargo, comprobarse experimentalmente.

## 2.6 CONCLUSIONES

1. Los experimentos de inoculación con la cepa C58R, marcada con un plásmido de resistencia al antibiótico gentamicina, proporcionaron un elevado número de colonias que presentaron pérdida del poder patógeno (16 de 90, 18%). Las pruebas bioquímicas y moleculares y los perfiles de RAPDs mostraron que eran mutantes procedentes de la cepa inoculada y que todos los mutantes poseían el plásmido Ti.
2. En los experimentos de inoculación en plantas herbáceas se obtuvieron siete clones mutantes de 4.000 aisladas, procedentes de las cepas C58 e IVIA 1.102, lo que representa un porcentaje de aparición de mutantes muy bajo (0.18%). El análisis mediante RAPDs confirmó la identidad de cuatro de estos mutantes con los cuatro iniciadores empleados.
3. De los siete mutantes, tres presentaron pérdida parcial de virulencia. Los otros cuatro casos presentaron pérdida total de virulencia. En tres de estos cuatro clones, los análisis de RAPDs proporcionaron idéntico perfil comparado con la cepa inoculada respectiva, excepto con uno de los iniciadores, que dió perfiles con diferencias en algunas bandas. Con otras pruebas de identificación moleculares (PCR-RFLP, REP-PCR) sin embargo, los resultados fueron idénticos entre ellos.
4. Los análisis por PCR de distintas zonas del plásmido Ti demostraron que los siete clones mutantes poseen este plásmido. Tres de ellos no amplificaron con iniciadores del gen *ipt* del ADN-T, lo que indicaría como posible causa de la pérdida del poder patógeno una modificación en esa zona. Los otros cuatro clones fueron positivos con todos los iniciadores empleados.
5. No se ha conseguido aislar colonias mutantes con fenotipo no patógeno provenientes de dos cepas de *A. tumefaciens* inoculadas en 10 huéspedes leñosos habituales de la bacteria. Las colonias tipo *Agrobacterium* no patógenas aisladas mostraron distinto perfil de RAPDs que los de las cepas previamente inoculadas.
6. No parece observarse una interacción huésped-patógeno que provoque la aparición de mutantes no patógenos en gran número, excepto en el caso de la cepa C58R con el huésped GF677.



7. La pérdida de virulencia en dos clones procedentes de la cepa IVIA 1.102 inoculada en tomate se confirmó con la observación del peso de los tumores obtenidos al inocular plantas jóvenes de tomate.
8. El empleo de cepas marcadas con resistencia a antibióticos como único método de identificación no garantiza que en el medio de cultivo suplementado con ese antibiótico no se aislen otras colonias semejantes que puedan presentar esas mismas resistencias.

**CAPÍTULO 3: PÉRDIDA ESPONTÁNEA DEL PODER  
PATÓGENO EN *A. tumefaciens in vitro***

### 3.1 INTRODUCCIÓN

No hay apenas referencias sobre las causas que producen la pérdida espontánea de la patogenicidad en cepas de *A. tumefaciens*. Únicamente se han llevado a cabo experimentos en laboratorio con tratamientos con sustancias o técnicas mutagénicas (Fortín *et al.*, 1993), o en experimentos de inoculación *in planta* con mutantes espontáneos obtenidos de tumores (Bélanger *et al.*, 1993; 1995) y experimentos de solarización en suelo (Raio *et al.*, 1997). En estudios realizados sobre la aparición de mutantes espontáneos de *A. tumefaciens* que presentan pérdida del poder patógeno en medios de cultivo, sólo se observó la aparición de este tipo de mutantes al añadir al medio sustancias fenólicas inductoras de la expresión de los genes *vir*, como la acetosiringona, el ácido sinapínico y el siringaldehído (Fortín *et al.*, 1992). Los estudios se llevaron a cabo empleando las cepas de nopalina T37 y C58, así como una variante espontánea de la cepa C58, denominada C58F. Dichas sustancias fenólicas produjeron mutantes no patógenos en proporciones que sobrepasaban el 50% de las colonias recuperadas con las cepas T37 y C58F, mientras que para la cepa C58 el porcentaje no superó el 1%. Sin embargo, en las incubaciones control en las que no se empleó ningún inductor de la pérdida del poder patógeno en el medio de cultivo, no se obtuvieron mutantes. El análisis de los mutantes no patógenos demostró que todos los derivados de la cepa T37 poseían el plásmido Ti, así como muchos de los provenientes de la cepa C58F. En todos los casos estudiados excepto en uno, los mutantes que aún contenían el plásmido Ti presentaron mutaciones puntuales en el gen *virG*, localizado en este plásmido, en distintas posiciones. En el otro caso, el mutante estaba afectado en el gen cromosómico *chvE*. No se conocen más trabajos en los que se haya observado la aparición de mutantes no patógenos de *A. tumefaciens* de forma espontánea en condiciones de laboratorio. Sin embargo, sí existen numerosas publicaciones en los que se observa este fenómeno en otros modelos bacterianos. Así, en bacterias fitopatógenas, el ejemplo más característico es el de *Ralstonia solanacearum*, donde hay numerosos estudios sobre la maquinaria genética y de producción de proteínas involucradas en la virulencia (Gillings *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993; Huang y Allen, 1997) y en la que se ha observado la pérdida espontánea de virulencia (Brumbley y Denny, 1990; Brumbley *et al.*, 1993). Esta pérdida se observa tanto en cultivos líquidos como a

través de pasos de inoculación en plantas de tomate, y se ha denominado conversión fenotípica (PHENOTYPE CONVERSION, PC).

La diferencia importante que hay que resaltar es que se habla de virulencia, un término que expresa cuantificación del fenotipo patogenicidad. En los mutantes espontáneos estudiados, la pérdida de virulencia se manifestó de diversas maneras, como en la pérdida de producción de exopolisacáridos, la actividad reducida del enzima endoglucanasa, el aumento de actividad endopoligalacturonasa, o en un aumento de la motilidad. Aunque estos mutantes no producen los mismos síntomas en plantas de tomate que las cepas salvajes, los fenotipos PC aún son patógenos, y son capaces de producir enanismo y la formación de raíces adventicias. Además había variaciones entre los mutantes obtenidos en cuanto a los síntomas que presentaron. Las causas que produjeron esos fenotipos no virulentos se debían a diversos cambios genéticos, que incluían inserciones o mutaciones simples. Es poco probable que la reducción de la virulencia fuera debida a un menor crecimiento de estos mutantes en la planta, ya que se comprobó que crecen al menos tan rápido como las cepas salvajes (Brumbley y Denny, 1990). Asimismo, la aparición de estos mutantes no se circunscribió a una única cepa sino que se produjo en varias cepas de la bacteria. En una de ellas, la cepa AW1, era la mutación en un solo gen, *phcA*, la responsable de la alteración en el grupo de factores asociados con el PC, y por tanto, con la reducción de la virulencia. Sin embargo, en otra cepa, la K60, los mutantes obtenidos no fueron complementados con este gen, lo que indicaría que se producían otros cambios, además de, o en lugar de, los producidos en el gen *phcA* en esta cepa.

Otro modelo de bacteria fitopatógena en la que se ha observado la pérdida de virulencia es en la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, patógena del arroz. Rajeshwari *et al.*, (1997) señalaron la pérdida espontánea de virulencia en cultivos mantenidos en prolongadas fases estacionarias, pero dicho fenómeno no se produjo en la fase exponencial. También en este caso, los mutantes se caracterizaron por la disminución en la producción de polisacáridos extracelulares. Se obtuvieron distintos tipos de mutantes, que difirieron entre ellos en la estabilidad del fenotipo mutante, la extensión de la pérdida de virulencia, la capacidad para competir con las cepas salvajes en experimentos de co-cultivo y en la hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno.

Otros casos en los que se ha observado la pérdida espontánea de virulencia son los de *Pseudomonas tolaasii*, patógeno del champiñón, por duplicación de un elemento genético de 661 pb en un gen regulador (Han *et al.*, 1997), o en la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, donde la inserción de un elemento transponible en el gen *iaaM* (responsable de la producción del ácido indolacético, relacionado con la virulencia) es responsable también de pérdida de virulencia a nivel espontáneo en esta bacteria fitopatógena (Comai y Kosuge, 1983).

La observación de este fenómeno de la pérdida espontánea de virulencia o del poder patógeno no parece ser algo exclusivo de unos pocos modelos, aunque su estudio se haya limitado hasta ahora a unas pocas especies bacterianas. La existencia de estudios que abordan métodos para prevenir la pérdida de virulencia en bacterias fitopatógenas durante el almacenamiento a largo plazo, como ocurre en la conservación de las colecciones de bacterias, indica que la pérdida de la patogenicidad (o reducción de la virulencia) podría ser un problema más común de lo que pudiera parecer (Bashan y Okon, 1986). En este trabajo, las bacterias estudiadas fueron *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *X. campestris* pv. *campestris*, y los problemas encontrados se debieron a cambios en características relacionadas con la patogenicidad, como la producción de toxinas, sensibilidad a bacteriófagos y disminución del grado de virulencia.

Fuera del campo de la fitopatología también se ha observado este fenómeno. Con la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, patógena de animales, en condiciones *in vitro* se producen varios cambios fenotípicos, entre los cuales se encuentran la pérdida de factores de virulencia, como la actividad adenilato-ciclasa, pérdida de estructuras de superficie hidrofóbicas y cambios en el perfil polipeptídico en SDS-PAGE. En este caso también se obtuvieron mutantes que diferían entre ellos, no siendo una sola la causa que los producía (Kruger *et al.*, 1988). Otros patógenos de animales, como *Aeromonas salmonicida* (Ishiguro *et al.*, 1981) o *Vibrio vulnificus* (Wright *et al.*, 1990) también presentaron esta característica. En patógenos humanos también encontramos antecedentes de este fenómeno, como en las bacterias *Mycobacterium intracellulare* (Kajioka y Hui, 1978); *Shigella flexneri* (Kopecko *et al.*, 1979; Maurelli *et al.*, 1984; Mills *et al.*, 1992); *Haemophilus influenzae* (Hoiset *et al.*, 1985); *Helicobacter pylori* (Westblom *et al.*, 1992) o *Shigella*

*dysenteriae* (McDonough y Butterson, 1999), donde se han observado distintas causas que producen pérdida de virulencia de forma espontánea.

Con todos estos antecedentes, y a pesar de no haberse encontrado referencias acerca de la pérdida espontánea de virulencia o del poder patógeno en cepas de *Agrobacterium sp.*, los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de esta tesis, en los que se observaba la aparición de mutantes que presentaron pérdida del poder patógeno en unos de ellos y pérdida de virulencia en otros (en experimentos de inoculación con diversas cepas), nos planteó la pregunta lógica de si esta pérdida se debe a la interacción entre la cepa y la planta inoculada o es una pérdida espontánea. Por ello se quiso llevar a cabo un experimento para la observación de la aparición espontánea de este fenómeno sin añadir ningún tipo de sustancias como las que se han descrito que favorecen la pérdida de poder patógeno, como los compuestos fenólicos u otros tipos de agentes (altas temperaturas, cultivos en fase estacionaria, radiaciones, etc.). De todas las cepas empleadas, se escogieron aquéllas que proporcionaron mutantes con pérdida de patogenicidad en los distintos experimentos de inoculación llevados a cabo, aunque fuera en número reducido. Por tanto las cepas escogidas fueron la C58R, al ser la cepa que proporcionó un mayor número de clones no patógenos en los experimentos realizados con el huésped GF677 y las cepas C58 e IVIA 1.102, con las que se obtuvieron un número reducido de mutantes.

En el caso de la cepa C58R, la que presenta un mayor número de clones recuperados que han perdido el poder patógeno, al poseer un plásmido que le proporciona resistencia a un antibiótico (plásmido pJB11), se quiso comprobar también si la presencia de esta resistencia tenía alguna influencia apreciable en la aparición de este fenotipo. Por ello se empleó un medio de cultivo general (PYG) y además, en un experimento en paralelo, el mismo medio suplementado con el antibiótico gentamicina. Con otra de las cepas (IVIA 1.102), resistente al antibiótico kanamicina, se empleó este antibiótico en el medio de cultivo y el mismo medio sin el antibiótico. Sólo en el caso de la cepa C58 no se empleó ningún antibiótico como posible inductor para la aparición de mutantes.

Con este estudio se pretende conocer si la aparición de mutantes no patógenos en los experimentos de inoculación en diversos huéspedes y con distintas cepas se debe a una interacción planta-patógeno o más bien a una pérdida espontánea que se observa tanto en los tumores como en condiciones de cultivo prolongado en laboratorio.

### 3.2 OBJETIVOS

- Observar la aparición espontánea de mutantes que presenten pérdida del poder patógeno en tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (C58, C58R e IVIA 1.102) sin someterlas a tratamientos químicos o fenómenos físicos como inductores de mutaciones.
- Comprobar el efecto que la presencia de un antibiótico en el medio de cultivo puede ejercer sobre las cepas C58R e IVIA 1.102 en un experimento de siembras sucesivas.
- Comparar los resultados obtenidos con estas cepas *in vitro* con los de las inoculaciones *in vivo*.

### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1 Procedimiento de siembra e inoculación

Las cepas empleadas se encontraban en la colección del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), guardadas en criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La cepa C58R proviene del laboratorio del Dr. S. K. Farrand, de la Universidad de Chicago, en Urbana Champaign, Illinois (Estados Unidos). La cepa C58 proviene de EEUU, mientras que la cepa IVIA 1.102 es una cepa obtenida de un tumor de crisantemo afectado naturalmente, procedente de un vivero de Valencia.

El experimento de inoculación tras siembras sucesivas se llevó a cabo de la manera siguiente: las cepas IVIA 1.102, C58 y C58R se sembraron en placas de medio sólido PYGA directamente del medio de criopreservación, mediante triple estría para obtener colonias bien separadas. Lo mismo se realizó con la cepa C58R empleando placas con PYGA + gentamicina ( $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) y con la cepa IVIA 1.102 en placas de PYGA + kanamicina ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ). A las 48 horas de incubación a  $26^{\circ}\text{C}$  se observaron las placas y se escogieron 50 colonias bien separadas de cada cepa. Se consideró que estadísticamente el número de colonias necesario para observar la aparición de mutantes en este experimento era de 50 colonias por cepa y experimento (E. A. Carbonell, comunicación personal).

Cada colonia se resuspendió en  $500\ \mu\text{l}$  de agua estéril y de ellos,  $100\ \mu\text{l}$  se pasaron a otro tubo. Las colonias se identificaron por el número correspondiente (1 a 50) en los tubos, que se guardaron a  $8^{\circ}\text{C}$  para análisis posteriores. Los  $100\ \mu\text{l}$  de cada suspensión se utilizaron para comprobar la patogenicidad y para iniciar los cultivos seriados de cada cepa. Se procedió a inocular plantas de tomate, variedad Roma, mediante un corte en el tallo con bisturí estéril dejando una lengüeta y depositando en la misma  $10\ \mu\text{l}$  de cada suspensión. Esta primera inoculación, previa a las siembras sucesivas en medio líquido nos aseguraba que estábamos trabajando con cepas patógenas desde el comienzo del experimento. Las plantas de tomate se examinaron a los 15 y 30 días para observar la presencia o ausencia de tumores. En total se inocularon en esta tanda inicial 250 tomates (50 colonias con la cepa C58R, 50 con la cepa C58 y 50 con la cepa IVIA 1.102 en medio sin antibiótico y 50 con las cepas C58R e IVIA 1.102 obtenidas en los medios con antibióticos).

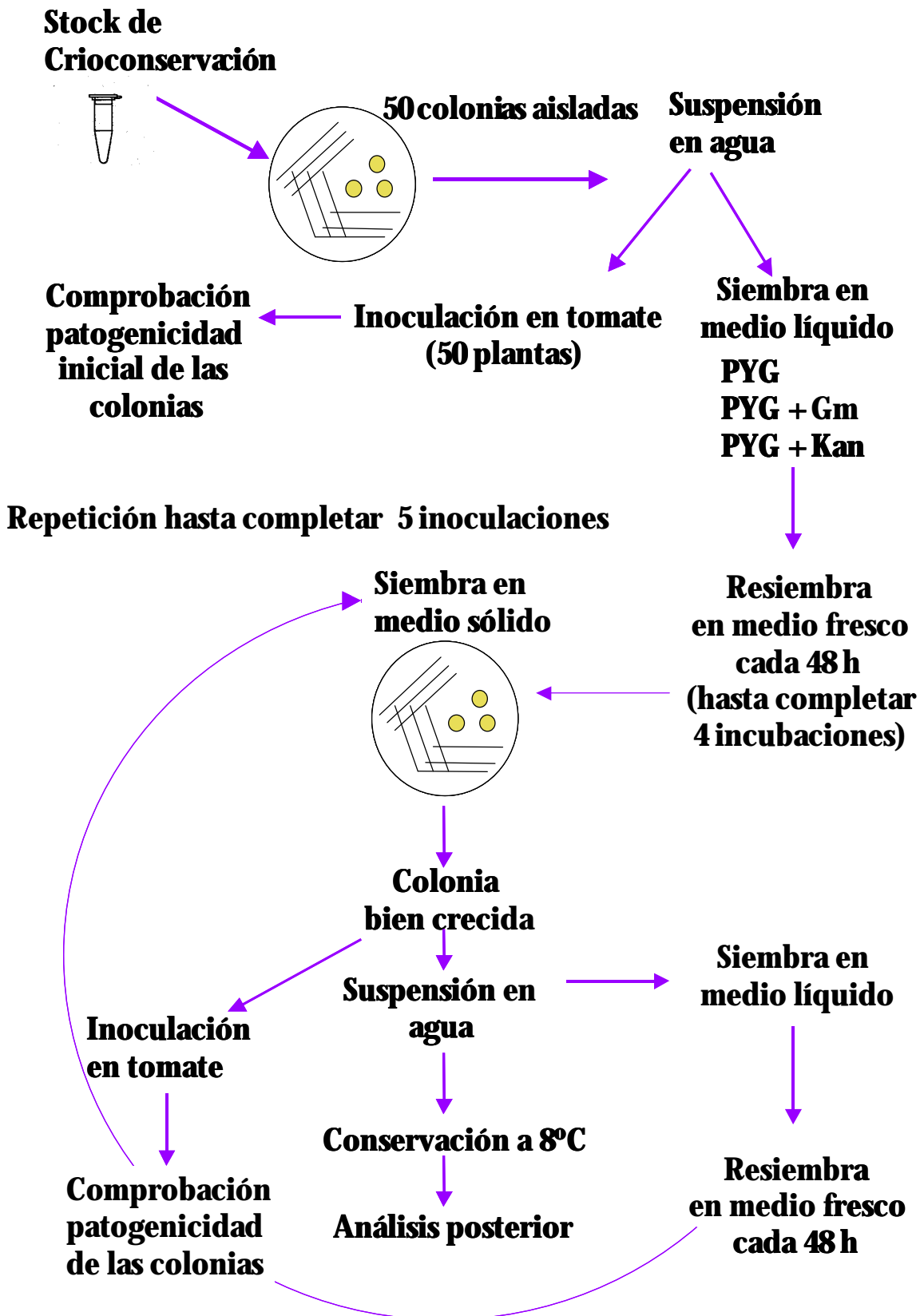


Se procedió a sembrar 20  $\mu$ l de cada una de las 50 suspensiones en tubos con 5 ml de medio PYG con las 3 cepas en tandas separadas, y con la cepa C58R e IVIA 1.102 además, con PYG + gentamicina a una concentración de 25  $\mu$ g/ml y PYG + kanamicina a una concentración de 50  $\mu$ g/ml respectivamente y se incubaron a 26°C en agitación.

A las 48 h de incubación en los tubos de medio líquido se recogió una alícuota (20  $\mu$ l) de cada tubo y se reinoculó en medio fresco. Estas resiembras se repitieron cada 48 horas hasta completar 4 incubaciones. Al final de la cuarta resiembra en tubo (a los 8 días de iniciar las incubaciones) se recogieron 10  $\mu$ l de cada muestra en un tubo con 9 ml de agua estéril, se agitaron y se sembraron 10  $\mu$ l en placas de medio PYGA con y sin antibióticos realizando triple estría para obtener colonias bien separadas. Estas colonias se dejaron incubar tiempo suficiente (entre 3 y 4 días a 26°C) para poder recoger la mitad de una colonia por cada placa sembrada y guardarlas en 500  $\mu$ l de agua. La otra mitad de la colonia se inoculó en tomate mediante punción en tallo con palillo estéril. Con las colonias resuspendidas en agua, se resembraron de nuevo 20  $\mu$ l en tubos con PYG, y se repitió el proceso de siembras sucesivas cada 48 h. En el caso de las cepas C58R e IVIA 1.102 se realizó el mismo proceso, además, con los mismos medios suplementados con los antibióticos correspondientes.

Estas siembras sucesivas en medio líquido se realizaron hasta completar cuatro tandas más de inoculación en tomate, con lo que en total se realizó una inoculación inicial de cada cepa ensayada y cinco inoculaciones más tras las siembras sucesivas en los medios líquidos con y sin antibiótico. Estos experimentos se llevaron a cabo en dos ocasiones, siguiendo el mismo procedimiento desde el principio, desde la siembra en placas a partir del medio de crioconservación de las cepas C58, IVIA 1.102 y C58R en dos años consecutivos por lo que el número total de inoculaciones fue de 2.500 (Figura 3.1).

Figura 3.1. Esquema del proceso de siembras sucesivas en medio líquido e inoculaciones en tomate para obtener colonias mutantes.



### 3.3.2 Inoculaciones en plantas de tomate y caracterización de las colonias mutantes

Los tomates inoculados se examinaron a los 15 y 30 días, y se observó la presencia/ausencia de formación tumoral. Tanto en los casos que se presentaron dudosos (tumores pequeños, necrosis en el sitio de la inoculación), como en los negativos, se realizó una nueva inoculación tras la siembra en placa de la colonia determinada.

Todas las colonias obtenidas que presentaron el fenómeno de pérdida de poder patógeno (ausencia de tumor) se volvieron a inocular en tomate para confirmar este fenotipo y se guardaron en medio de crioconservación. La identidad de las colonias se confirmó mediante pruebas bioquímicas características del género *Agrobacterium* (prueba de la ureasa y esculina). Se identificaron mediante análisis por RAPDs con el sistema puesto a punto en el Capítulo 1 con uno de los iniciadores (OPE-7). En el caso de obtenerse patrones idénticos entre las colonias mutantes y la cepa patógena, se emplearon los otros tres iniciadores para confirmar su identidad.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Inoculaciones en tomate

Las inoculaciones iniciales realizadas con las 50 colonias aisladas del medio de crioconservación produjeron tumores en el tallo de los tomates con las tres cepas de *A. tumefaciens* (C58, C58R e IVIA 1.102) en las dos repeticiones llevadas a cabo para su siembra posterior en los medios líquidos con y sin antibiótico, lo que confirmaba que todas las colonias del ensayo presentaban el carácter fenotípico (patógeno) del que se pretendía observar su posible pérdida.

Las 250 inoculaciones realizadas con la cepa C58 fueron positivas en cada uno de los dos experimentos realizados. No se observó la presencia de mutantes que hubieran perdido la capacidad de inducir tumores en el tallo de plantas de tomate. Con la cepa IVIA 1.102 los resultados, tanto en la siembra en presencia de un antibiótico como en ausencia del mismo, fueron los mismos, no se observaron colonias con pérdida del poder patógeno en ninguno de los cuatro experimentos realizados (1.000 inoculaciones en total). Los resultados con la cepa C58R fueron más prometedores, sin embargo. En las Tablas 3.1 y 3.2 se muestran los resultados obtenidos en las inoculaciones en plantas de tomate en los dos experimentos *in vitro* llevados a cabo. Se obtuvieron en total 22 clones no patógenos en las 1.000 inoculaciones llevadas a cabo. En la primera tanda de experimentos se obtuvieron 10 clones negativos en planta de tomate tras siembras sucesivas en medio con y sin antibiótico (5 y 5 clones). Los clones identificados como mutantes no patógenos fueron, en la siembra en medio sin antibiótico, los números 2 y 10 en la 1ª inoculación. En la segunda inoculación aparecieron como mutantes el número 3, 11 y 20. En las siguientes inoculaciones, hasta la 5ª, no aparecieron más clones no patógenos, y se conservó la pérdida del poder patógeno en los que ya habían aparecido en las inoculaciones anteriores.

En las siembras en el medio con antibiótico gentamicina los clones que aparecieron como mutantes fueron el 2, 10, 11, 19 y 20 en la 1ª inoculación. No aparecieron más mutantes en las siguientes inoculaciones. También se conservó el fenotipo no patógeno en estos clones a lo largo de las siguientes inoculaciones (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Mutantes obtenidos en el primer experimento *in vitro* en los medios con y sin antibiótico gentamicina con la cepa C58R

INOCULACIÓN*	Colonias no patógenas** en medio sin	Colonias no patógenas** en medio con
	gentamicina	gentamicina (25 µg/ml)
1 <sup>a</sup>	2-10	2-10-11-19-20
2 <sup>a</sup>	2-3-10-11-20	2-10-11-19-20
3 <sup>a</sup>	2-3-10-11-20	2-10-11-19-20
4 <sup>a</sup>	2-3-10-11-20	2-10-11-19-20
5 <sup>a</sup>	2-3-10-11-20	2-10-11-19-20

\*: Cada una de las cinco inoculaciones llevadas a cabo cada ocho días de resiembra. \*\*: Colonias numeradas de la 1 a la 50 en cada experimento. Los números de las columnas corresponden al número que identifica a cada colonia inoculada. Los números coincidentes no se refieren a la misma colonia, ya que en los experimentos en medio con y sin antibiótico las colonias se numeraron de la 1 a la 50 en ambos casos.

En la repetición de los experimentos *in vitro* se obtuvieron 12 clones no patógenos, 6 clones en medio con antibiótico y 6 clones más en medio sin antibiótico. Los clones identificados fueron, en el experimento con antibiótico, el n° 9 en la 1<sup>a</sup> inoculación. Los n° 26-34-44 aparecieron en la 2<sup>a</sup> inoculación. En la 3<sup>a</sup> inoculación fueron los clones 22 y 43 los que aparecieron como no patógenos. En las siguientes inoculaciones ya no aparecieron más clones que presentaran este fenómeno, pero los mutantes continuaron siendo no patógenos en plantas de tomate en las inoculaciones siguientes. En las siembras sucesivas en medio sin antibiótico, los clones 9-12-22-34-38 y 43 aparecieron como mutantes en la segunda inoculación, y ya no aparecieron más que presentaran este fenómeno. También se mantuvo el fenotipo no patógeno en las inoculaciones siguientes (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Resultado de las inoculaciones de la repetición del experimento *in vitro* con la cepa C58R en los medios con y sin antibiótico gentamicina

INOCULACIÓN*	Colonias no patógenas** aparecidas en medio	Colonias no patógenas** aparecidas en medio
	sin gentamicina	con gentamicina
1 <sup>a</sup>	-	9
2 <sup>a</sup>	9-12-22-34-38-43	9-26-34-44
3 <sup>a</sup>	9-12-22-34-38-43	9-22-26-34-43-44
4 <sup>a</sup>	9-12-22-34-38-43	9-22-26-34-43-44
5 <sup>a</sup>	9-12-22-34-38-43	9-22-26-34-43-44

\*: Cada una de las cinco inoculaciones llevadas a cabo cada ocho días de resiembra. \*\*: Colonias numeradas de la 1 a la 50 en cada experimento. Los números de las columnas corresponden al número que identifica a cada colonia inoculada en cada uno de los dos experimentos.

### 3.4.2 Caracterización de las colonias mutantes obtenidas

Todas las colonias mutantes obtenidas, procedentes de los experimentos llevados a cabo con la cepa C58R dieron igual resultado que la cepa patógena salvaje con todas las pruebas realizadas. Las pruebas bioquímicas fueron coincidentes en todos los casos. Todas las colonias mutantes, tanto las obtenidas en los experimentos en siembra en medio sin antibiótico como con el antibiótico gentamicina en el mismo medio, fueron resistentes al mismo, y los perfiles de bandas obtenidos en los análisis mediante RAPDs fueron coincidentes con los 4 iniciadores empleados (Fig. 3.1).

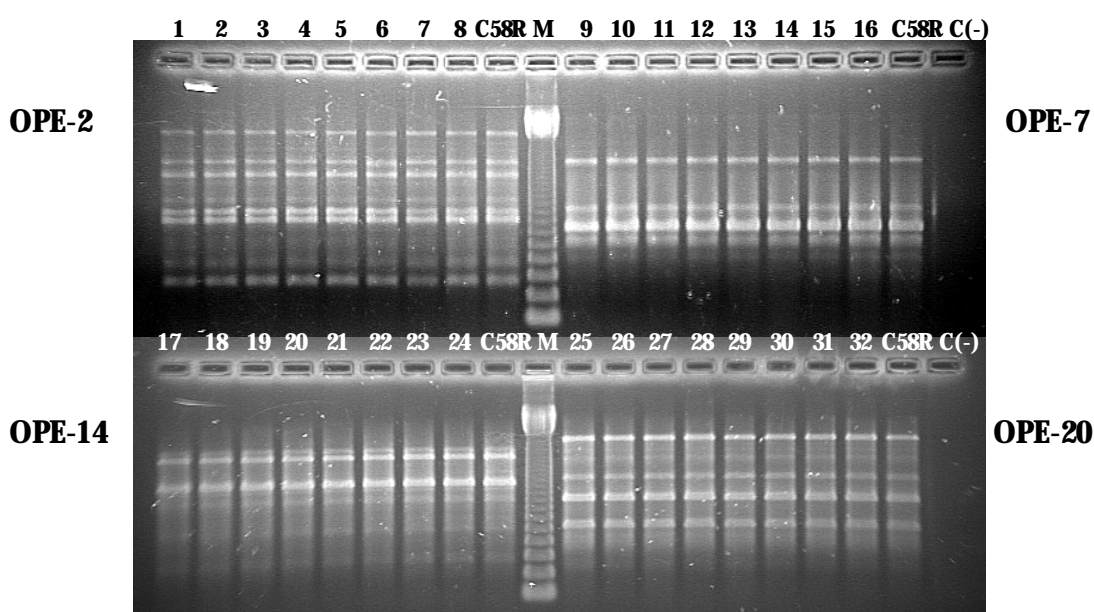


Figura 3.1. Análisis mediante RAPDs con los cuatro iniciadores de diversas colonias no patógenas en tomate obtenidas en los dos experimentos realizados. Calles 1-4, 9-12, 17-20 y 25-28, colonias aisladas en el primer experimento en medio sin gentamicina. Calles 5-8, 13-16, 21-24 y 29-32, colonias aisladas en el segundo experimento en medio con gentamicina. M: marcador 100 pb (Life Technologies); C(-): control negativo .

En total, se obtuvo un número similar de mutantes en cada uno de los dos experimentos realizados (10 y 12). Se obtuvo, además, el mismo número de clones con pérdida del poder patógeno en las siembras en medio sin antibiótico y con él (5 en el primer experimento y 6 en el segundo).

### 3.5 DISCUSIÓN

La aparición de bacterias mutantes con fenotipo no patógeno que aparecen de forma espontánea, es decir, sin la aparente intervención de ningún tipo de factor químico o físico, o interacción con otros factores (otras bacterias, otras cepas de la misma especie o género), es un fenómeno que se ha observado en algunos casos. Estos se han producido tanto en bacterias fitopatógenas como en otros tipos de bacterias patógenas. En el caso de *A. tumefaciens* este fenómeno no ha sido descrito anteriormente, y no hay trabajos en los que se hayan observado este tipo de mutantes, sólo en experimentos en los que se ha inducido la aparición de mutaciones mediante el empleo de sustancias que incrementan la actividad patógena de la bacteria (compuestos fenólicos principalmente). En nuestros experimentos este fenómeno se presenta de una manera evidente con la cepa C58R, sin necesidad de someter las colonias a condiciones especiales, como esperar a etapas tardías de crecimiento (caso de *X. oryzae*, Rajeshwari *et al.*, 1997) y al cabo de un pequeño número de pases en medio de crecimiento. Sin embargo, con una cepa de colección (C58) y una cepa salvaje de crisantemo (IVIA 1.102) los mismos experimentos han mostrado que no hay aparición de colonias no patógenas, lo que nos induce a creer que esta facilidad para producir mutantes espontáneos puede deberse a una predisposición existente en esa cepa.

En los experimentos de inoculación *in planta* con la cepa C58R, la aparición de mutantes afectados en este carácter es elevada (16%), y si los comparamos con los resultados de estos experimentos *in vitro*, dan valores muy semejantes (porcentajes del 10% y 12% en ambos experimentos), lo que apuntaría a que la aparición de mutantes se podría deber más a un carácter de inestabilidad de la cepa C58R que a una interacción entre la planta huésped y la cepa bacteriana. Al ser una cepa a la que se le ha introducido una inserción en el gen *acc* (responsable del catabolismo de la agrocinopina) mediante una mutación con un transposón (Tn3::HoHo1) en el plásmido Ti y a la que también se le ha introducido un plásmido de resistencia al antibiótico gentamicina (plásmido pJB1J), se podría sospechar que todas esas manipulaciones pueden haber provocado cambios significativos que conduzcan a una inestabilidad elevada que afecte al fenotipo patógeno.

Llaman la atención varias cosas: el número semejante de mutantes en ambos experimentos (10 en el primero y 12 en el segundo) y la igualdad absoluta en el número de clones no patógenos que se producen entre las siembras en medio con y sin antibiótico.

El hecho de que los mutantes aparezcan enseguida, ya que se observan después de únicamente 4 resiembras en el medio líquido (1ª inoculación en planta de tomate), parece indicar que es un fenómeno muy proclive a aparecer de forma espontánea, y la no aparición de más mutantes después de la 3ª inoculación es otro aspecto llamativo de los resultados obtenidos. ¿Deberían aparecer más mutantes? ¿Deberían obtenerse en momentos diferentes? ¿Podría deberse a un proceso (comienzo de resiembras sucesivas) que una vez se supera no produce más efectos? ¿Deberían convertirse todos los clones en no patógenos si continuáramos el experimento indefinidamente?. El hecho de que coincidan los números identificativos de algunos de ellos no indica que se traten de los mismos, ya que se han obtenido en momentos diferentes y experimentos distintos.

El estudio molecular de las causas que hayan provocado esta pérdida del poder patógeno puede ofrecer las claves para responder a algunas de estas cuestiones. Si las causas son las mismas en todos los clones podría deberse a un “punto caliente” (hot spot) que se pone de manifiesto o se activa durante el proceso de siembras sucesivas. Si las causas de la pérdida del poder patógeno son diferentes entre unos mutantes y otros, las explicaciones serían quizá más complicadas. Habría que buscar en cada uno de ellos el motivo que ha provocado estos cambios.

La presencia del antibiótico gentamicina no parece ejercer ningún efecto, estabilizador o desestabilizador, en la aparición de mutantes no patógenos. El número de clones afectados en ambos experimentos nos muestra que no hay un efecto apreciable en ambos sentidos.



### 3.6. CONCLUSIONES

- 1- Se ha puesto de manifiesto la pérdida del poder patógeno en una cepa de *A. tumefaciens* de forma espontánea, mediante la resiembra continua en un medio general, con y sin antibiótico como agente inductor de mutación.
- 2- La cepa que presenta estos mutantes ha sido modificada genéticamente, lo que podría influir en la inestabilidad que presenta.
- 3- Al ser resistente al antibiótico gentamicina, se realizó el mismo experimento empleando este antibiótico en el medio general de siembra, sin diferencias significativas en los resultados obtenidos.
- 4- Este fenómeno se produce de forma rápida en el tiempo. Al cabo de 8 días de siembras sucesivas ya se ponen de manifiesto mutantes afectados en este fenotipo.
- 5- El fenómeno no parece ser general en la especie *A. tumefaciens*, ya que en otras dos cepas patógenas sometidas al mismo sistema de siembras sucesivas no se observó la aparición de ningún mutante.

**CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
LOS MUTANTES NO PATÓGENOS OBTENIDOS**

## 4. CAPÍTULO 4

### 4.1 Introducción

Existe abundante información respecto a los genes, tanto plasmídicos como cromosómicos que, al ser modificados, causan pérdida de virulencia o del poder patógeno en *Agrobacterium*, así como estudios sobre mutaciones provocadas por elementos de inserción (IS) (Garfinkel y Nester, 1980; Hagiya *et al.*, 1985; Wabiko, 1992; Berger y Christie, 1993, 1994; Dale *et al.*, 1993; Ponsonnet *et al.*, 1995; Matthyse y McMahan, 1998). Entre los genes cromosómicos identificados como involucrados en la patogenicidad o virulencia de *Agrobacterium* se encuentran a) los genes *flaA-B-C* que codifican las proteínas que forman los flagelos (Chesnokova *et al.*, 1997) y por ello intervienen en la movilidad, y se cree que ayudan a orientar a las células bacterianas en los sitios de infección, llegando a reducirse la virulencia hasta un 38% en algunos de los mutantes obtenidos; b) los genes implicados en el paso del complejo ADN-T a través de la pared celular del huésped (gen *acvB*, Fujiwara *et al.*, 1998). También se ha descrito en un plásmido de tipo octopina un gen plasmídico en su lugar (*virJ*), situado entre *virA* y *virB*, que codifica una proteína con funciones similares (Kalogeraki y Winans, 1995); c) los genes involucrados en la unión de la bacteria a las células huésped (genes *cel*, *attB*, *attD* y *attR*, Mathysse *et al.*, 1996; Mathysse y McMahan, 1998) y que también producen reducción de virulencia al ser mutados; d) los genes de síntesis y excreción de  $\beta$ -glucanos que intervienen también en la unión a las células vegetales (gen *chvA*, Iannino y Ugalde, 1989); e) el gen de reconocimiento de azúcares *chvE*, que interviene en la inducción de los genes *vir* (Cangelosi *et al.*, 1990).

Entre los genes esenciales para el poder patógeno o la virulencia de la región *vir* del plásmido Ti se encuentran *virA* y *virG*, que codifican proteínas reguladoras de todos los demás genes *vir* (Stachel y Zambrisky, 1986), y que tienen homología con los sistemas bacterianos de regulación de dos componentes (Winans *et al.*, 1986; Melchers *et al.*, 1989); el operón *virB*, que contiene 11 genes (*virB1* a *virB11*) (Thompson *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1990; Kuldau *et al.*, 1990; Rogoswky *et al.*, 1990) y de ellos, sólo el gen *virB1* no es esencial para el poder patógeno (Berger y Christie, 1994); el operón *virC*, que contiene dos genes, y las mutaciones en ellos afectan al grado de virulencia y rango de huéspedes, pero no provocan la pérdida del poder patógeno (Yanofsky *et al.*, 1985); *virD*,

que codifica cinco proteínas, de las cuales VirD1, VirD2 y VirD4 son esenciales para la transferencia del ADN-T (Stachel y Nester, 1986; Vogel y Das, 1992; Koukolikova-Nicola *et al.*, 1993). El operón *virE*, que codifica dos proteínas, pero solo VirE1 es esencial para la transferencia (McBride y Knauf, 1988).

Son pocos los genes que se han identificado en la región del ADN-T como responsables del fenotipo patógeno, ya que serían como máximo tres los que se necesitan para inducir tumores en la mayoría de las plantas (Inzé *et al.*, 1984). Estos genes son llamados *tms1* y *2* (por tumor morphology shooty) y el gen *tmr* (por tumor morphology rooty) porque los tumores producidos por cepas con mutaciones en estos genes causan los fenotipos “shooty” y raicillas respectivamente. Los productos de los genes *tms1-2* codifican la síntesis de ácido indol-3 acético y por ello también se denominan genes *iaaM* e *iaaH* (Inzé *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984). El gen *tmr* dirige la producción de una citoquinina, por lo que se le conoce también por gen *ipt* o también *cyt* (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984).

Además de estos genes, se han encontrado otros cuya función no está aún clara, pero su mutación provoca cambios de fenotipo de los tumores, como en el caso del gen *5* que codifica la síntesis de una indol lactato sintetasa, (Leemans *et al.*, 1982; Körberg *et al.*, 1991) y el gen *6b* (Ream *et al.*, 1983) que, al ser mutado, provoca tumores de mayor tamaño. Por tanto, cambios o reorganizaciones moleculares en estos genes podrían causar la pérdida del fenotipo patógeno. Finalmente, el borde derecho del ADN-T, que consta de 25 pares de bases, es esencial para la transferencia del ADN a la planta, por lo que su mutación también produciría un fenotipo no patógeno (Wang *et al.*, 1987).

En los trabajos realizados por el grupo del profesor Dion (Fortin *et al.*, 1992; 1993; Bélanger *et al.*, 1993; 1995), en los que se obtuvieron mutantes inducidos y espontáneos, se observó que habían sido varios los genes afectados, dependiendo del tipo de experimento llevado a cabo. En los experimentos de inducción de los genes *vir* con compuestos fenólicos, los mutantes obtenidos presentaban alteraciones que estaban relacionadas con modificaciones en el plásmido Ti. Esto se demostró transfiriendo el plásmido de estas cepas a receptoras sin plásmido y observando el fenotipo resultante, y se comprobó que estos transconjugantes no producían tumores. Muchos de los clones mutantes recuperaban el poder patógeno al complementarse con plásmidos que contenían

genes *virA* o *virG* intactos. El análisis posterior reveló que algunos habían sufrido deleciones que comprendían parte de la región *vir*, mientras en otros se detectó un elemento de inserción (IS426) en *virA* o en *virG* (Bélanger *et al.*, 1995). En los experimentos de inoculaciones en plantas, los mutantes no patógenos obtenidos también estaban afectados en el plásmido Ti (Fortin *et al.*, 1993). Cuando se compararon clones obtenidos de distintos tumores se encontraron distintos tipos de mutaciones. En dos de estos clones, las mutaciones correspondieron a una deleción completa de la región *vir* y a una mutación puntual en la región promotora del gen *virG*, respectivamente. A pesar de todos estos datos experimentales, no está claro qué mecanismos intervienen en la aparición y mantenimiento de las cepas mutantes frente a las salvajes. Como resumen de todos estos resultados, se podría postular la existencia de diversos factores, asociados con los procesos naturales de la infección, que favorecen la expresión de la inestabilidad genética en *A. tumefaciens*. Estos factores contribuirían a reducir la proporción de cepas patógenas/no patógenas en la naturaleza, y favorecerían la acumulación de bacterias con plásmidos Ti modificados que presentarían alteraciones en ciertos genes esenciales para la patogenicidad. Los factores que intervendrían serían el intercambio genético entre plásmidos, aparición de mutaciones espontáneas y eventos de transposición mediante elementos de inserción (Kerr, 1971; Cooksey, 1986; Otten *et al.*, 1992).

Por todo ello, se pueden buscar las causas de la pérdida del poder patógeno de los mutantes obtenidos en esta Tesis en tres zonas diferentes del genoma de la bacteria: el cromosoma, con diversos genes candidatos, algunos de ellos caracterizados y secuenciados; las zonas de la región *vir* del plásmido Ti, un área de unas 28 kb, totalmente secuenciada en diversas cepas; y el ADN-T, un área grande también, de aproximadamente 23 kb, pero en la que los genes descritos como esenciales para la patogenicidad son tres y se encuentran agrupados en una zona de un tamaño de unas 5 kb, fácilmente caracterizable. Por tanto, en este capítulo se planteó identificar los cambios genéticos responsables de la pérdida de poder patógeno sufrido en varias de las cepas utilizadas en esta Tesis.

## **4.2 Objetivos**

- Caracterizar los mutantes no patógenos obtenidos en los experimentos con la cepa C58R y los mutantes obtenidos en los experimentos de inoculación en huéspedes herbáceos. Identificar las áreas afectadas y los cambios genéticos que han sufrido.
- Restaurar, en los casos que fuera posible, el poder patógeno y el grado de virulencia de los mutantes para confirmar los análisis moleculares.

### 4.3 Material y métodos

#### 4.3.1 Complementación del poder patógeno en los mutantes obtenidos.

La estrategia de estudio de las causas que han provocado la pérdida del poder patógeno o la disminución de la virulencia en los mutantes obtenidos en los distintos experimentos que componen esta Tesis, consistió primero en la identificación de las zonas que podían estar afectadas (cromosoma, región *vir* o ADN-T del plásmido Ti) para, una vez identificadas las mismas, aplicar las metodologías que permitieran caracterizar las mutaciones o cambios generados. Este proceso se muestra en la Figura 4.1, y se llevó a cabo contando con material cedido por el Dr. S. K. Farrand, de la Universidad de Urbana Champaign, (Chicago, EE.UU.), el Profesor P. Dion, de la Universidad Laval, Québec, (Canadá), y el Dr. P. Christie, de la Universidad de Texas, (EEUU). Estos investigadores proporcionaron plásmidos que contienen distintas zonas y genes del plásmido Ti de distintas cepas de *A. tumefaciens* que se emplearon para analizar si permitían recuperar el fenotipo patógeno en los clones mutantes, y con ellos identificar las zonas afectadas. Sus características y orígenes se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Plásmidos empleados en los experimentos de complementación y análisis de las regiones implicadas en la pérdida del poder patógeno.

Plásmido	Características relevantes	Fuente
PBBRM1CS5 <sup>a</sup>	Gm <sup>r</sup> , plásmido pBBR1MCS. Compatible con plásmidos IncP, IncQ e IncW	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pPC953 <sup>b</sup>	Kan <sup>r</sup> , plásmido pBCSK <sup>+</sup> . <i>NdeI</i> con el gen <i>virB5</i> mutado para llevar sitios de restricción <i>NdeI</i> en el sitio de inicio de traducción, conteniendo el gen <i>npII</i> de pUC4K en el sitio <i>ScaI</i> dentro del gen <i>cat</i>	Berger y Christie (1994)
pTHE17 <sup>c</sup>	Cósmido conteniendo el ADN-T completo de C58 en pCP13; Tet <sup>r</sup>	Hayman y Farrand (1988)
pSM226 <sup>d</sup>	Plásmido pVCK219 con inserción Tn3HoHo1 en fragmento 4 de <i>SalI</i> ; Km <sup>r</sup> ; Cb <sup>r</sup> ; replicón IncP	Stachel y Nester (1986)
pSM247 <sup>d</sup>	Plásmido pVCK219 con inserción Tn3HoHo1 en fragmento 13a de <i>SalI</i> ; Km <sup>r</sup> ; Cb <sup>r</sup> ; replicón IncP	Stachel y Nester (1986)
pVCK219 <sup>d</sup>	Fragmentos <i>SalI</i> 10 a 12 de pTiA6 clonados en pVK102; Km <sup>r</sup> ; Str <sup>r</sup> ; replicón IncP	Stachel y Zambrisky (1986)
pVCK225 <sup>d</sup>	Fragmentos <i>SalI</i> 13b a 26 de pTiA6 clonados en pVK102; Km <sup>r</sup> ; Str <sup>r</sup> ; replicón IncP	Stachel y Zambrisky (1986)

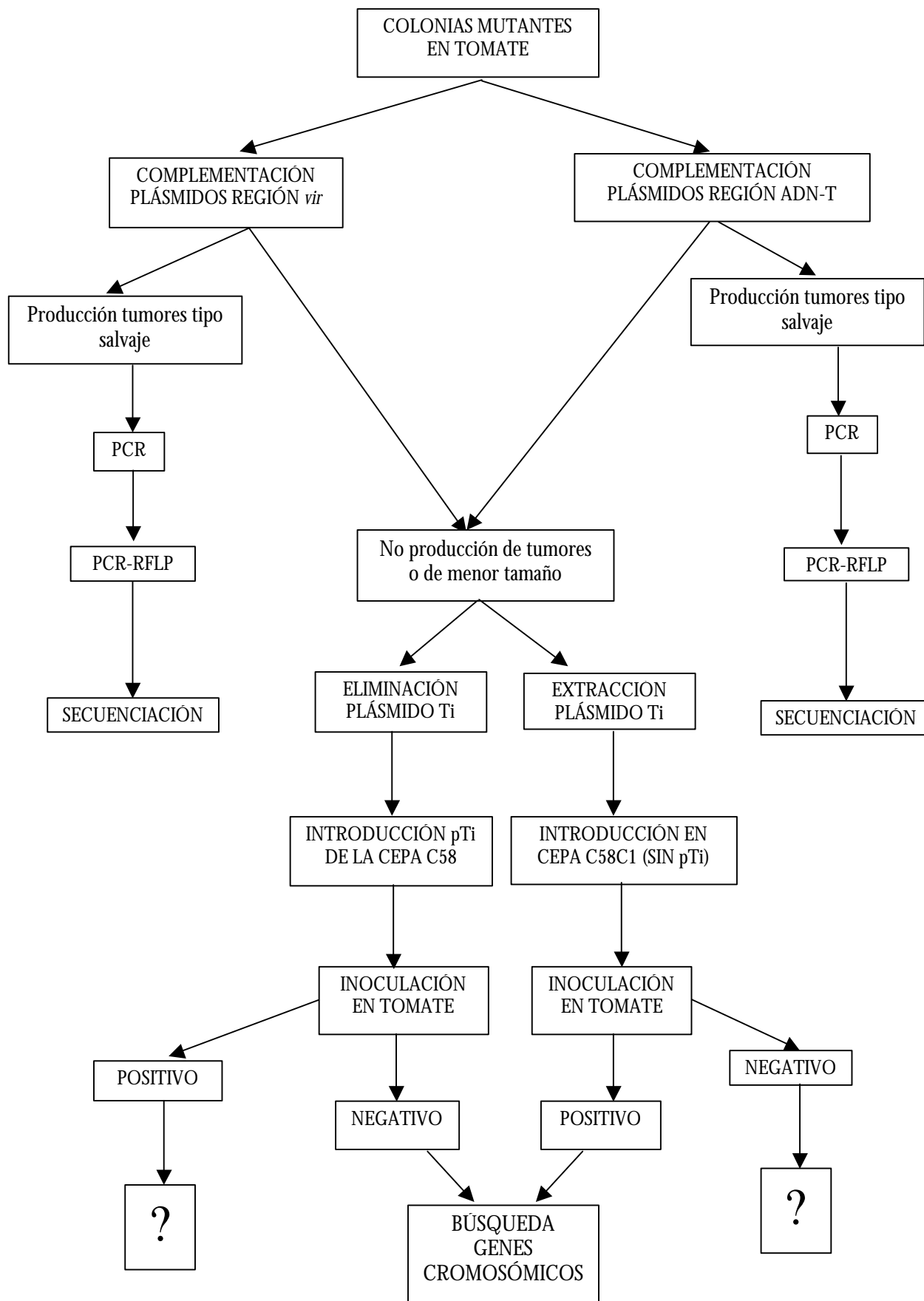
a: J. Murillo, Universidad Pública de Navarra, España

b: P. Christie, Universidad De Texas, EE.UU.

c: S. Farrand, Universidad Urbana Campaign, Chicago, EE.UU.

d: P. Dion, Universidad Laval, Québec, Canadá.

Figura. 4.1. Esquema del proceso empleado en el estudio de la caracterización molecular de los mutantes obtenidos.





Estos plásmidos permiten analizar cepas que han sufrido pérdida parcial o total de virulencia, al complementar en *trans* los genes defectuosos que puedan haber tenido cambios moleculares, y así, recuperar la capacidad de producir tumores. Los plásmidos se emplearon en el estudio de la búsqueda de las zonas que habrían sufrido cambios moleculares en los diversos mutantes obtenidos en los Capítulos 2 y 3. Para ello, se introdujeron en cada uno de los mutantes a estudiar varios de estos plásmidos y posteriormente se inocularon los clones transformados en plantas de tomate para evaluar si recuperaban el poder patógeno (Fig. 4.1).

El método empleado para la introducción de los distintos plásmidos en los clones a analizar fue el de transformación mediante electroporación, con el protocolo descrito en Mattanovich *et al.* (1989). A partir de un cultivo en placa fresco (24 h) se escogió una colonia y se incubó durante toda la noche a 26°C en 5 ml de medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con antibiótico en los casos en que la colonia presentara resistencia a alguno. Se sembró 1 ml de este inóculo en 40 ml de medio YM (Lin, Life Technologies, EEUU) y se incubó en agitación durante 6 h a 26°C. Tras una primera centrifugación a 8.000 rpm en frío (4°C) durante 8 min para concentrar las bacterias, la suspensión se sometió a tres lavados con 10 ml de 1 mM HEPES y después de resuspender el precipitado, se centrifugó a 8.000 rpm durante 8 min a 4°C. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 500 µl de 1 mM HEPES transfiriéndose a tubos de microcentrífuga. Se centrifugaron de nuevo a 8.000 rpm durante 8 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavaron los precipitados con glicerol estéril al 10%. Se centrifugó de nuevo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de glicerol al 10%. Esta suspensión se repartió en volúmenes de 40 µl en microtubos, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su empleo.

El procedimiento de transformación por electroporación hace uso de un pulso de corriente de gran voltaje que desestabiliza temporalmente la membrana de las células y permite la entrada de material genético. El tratamiento previo de las células, descrito anteriormente, facilita la formación de poros en la membrana que aumentan la eficiencia del proceso. Los plásmidos a introducir se purificaron utilizando un estuche comercial (Plasmid minikit, Qiagen) y se estimó su concentración mediante comparación en geles de agarosa al 0.8% con un marcador molecular de concentración conocida (Marcador XVII,

Life Technologies). Este proceso de transformación de las colonias preparadas con el protocolo descrito anteriormente consistió en la incubación en hielo de 40  $\mu$ l de cada suspensión de células electrocompetentes durante 2 min con 2-3  $\mu$ l del plásmido correspondiente (aprox. 0,1  $\mu$ g de ADN). Al cabo de este tiempo de incubación se transfirió la mezcla a cubetas de electroporación de 1 cm de ancho (Equibio, Kent, GB) y se sometieron a un pulso de corriente con un voltaje de 2.5 KV, 400  $\Omega$  de resistencia y 25  $\mu$ F de intensidad. Después del pulso eléctrico se recogió la mezcla de la cubeta en 1 ml del medio YM y se incubó en agitación a 26°C durante 2 h. Al cabo de ese tiempo se sembró una alícuota (200  $\mu$ l) en placas de medio LB suplementado con un antibiótico marcador y se incubó durante dos días a 26°C. Se observó la aparición de colonias y se escogieron 10 para su análisis posterior. La electroporación se llevó a cabo en el aparato Gene Pulser II System (Bio-Rad, CA, EE.UU.).

#### 4.3.1.1 Complementación con los mutantes obtenidos en la inoculación de la cepa resistente al antibiótico gentamicina (C58R) en el huésped GF677.

Se obtuvieron 16 clones mutantes a partir de los tumores producidos en la inoculación en este huésped. En un primer análisis, para su complementación se emplearon los plásmidos correspondientes a la región de virulencia del plásmido Ti (región *vir*) y a los oncogenes del ADN-T (Figura 4.2). Si no se conseguía recuperar el poder patógeno en ninguno de los 16 mutantes obtenidos, se adoptaría otra estrategia que implicaría la extracción de los plásmidos Ti de los mutantes, su introducción en la cepa C58C1, curada de este plásmido, y la posterior inoculación de los transformantes en tomate. Si recuperaban el poder patógeno, eso indicaría que el plásmido Ti es funcional, por lo que sería el cromosoma el que presentaría alguna deficiencia que impediría la formación de tumores en este huésped. A continuación se realizaría el análisis de los genes cromosómicos que podrían estar afectados (*chvE*, *chvA*...).

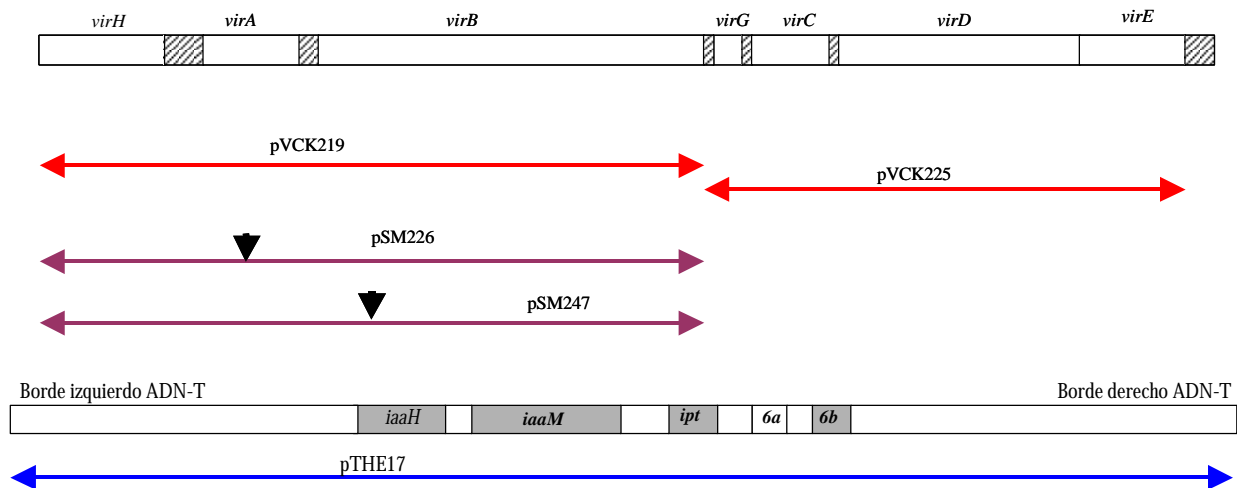


Figura 4.2. Análisis de complementación de mutantes. Áreas de la región *vir* de la cepa A6 y del ADN-T de la cepa C58 incluidas en cada uno de los plásmidos empleados en los ensayos de complementación. Las flechas indican los genes mutados en los plásmidos pSM226 y pSM247.

Como los clones mutantes obtenidos en este experimento, al igual que la cepa inoculada C58R, no son resistentes a los antibióticos kanamicina y tetraciclina, se emplearon los plásmidos resistentes a dichos antibióticos para el análisis (pVCK219, pVCK225 y pTHE17) (Tabla 4.1). Con estos tres plásmidos se consigue tener analizada toda la región *vir* del plásmido y el ADN-T. El plásmido pVCK219 incluye los genes *virH*, *virA* y *virB*, mientras el plásmido pVCK225 incluye *virG*, *virC*, *virD* y *virE* (Figura 4.2). El plásmido pTHE17 contiene toda la región del ADN-T. Se observó la presencia del plásmido introducido en 10 colonias seleccionadas tras la transformación con cada plásmido mediante un análisis de extracción empleando el protocolo “ten minute miniprep” (Zhou *et al.*, 1990). Para ello, se resuspendió un cultivo procedente de cada colonia en un tampón Tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 8 que contenía 0.1 N NaOH y 0.5% SDS, por lo que se lleva a cabo una hidrólisis alcalina en un primer paso. A continuación se procedió a neutralizar la reacción con AcNa 3M pH 5.2, se centrifugó y precipitó el ADN con etanol frío al 96%. Los plásmidos se visualizaron en geles de agarosa al 0.8%, y la presencia del plásmido Ti se comprobó mediante PCR. Para que los análisis no se vieran afectados por las secuencias presentes en los plásmidos introducidos, se emplearon iniciadores del ADN-T (FGPtmr530-701, Nesme *et al.*, 1989) en las colonias transformadas con los plásmidos que contienen las regiones *vir* y con iniciadores de la región *vir* (VirDA-DE, Haas *et al.*, 1995) en las colonias transformadas con plásmidos que

contienen la región del ADN-T, siguiendo los protocolos descritos en el Capítulo 2. Este procedimiento se empleó con todas las colonias mutantes del experimento y con los tres plásmidos elegidos. Posteriormente, las 10 colonias analizadas en cada transformación se inocularon en plantas de tomate para observar si había recuperación del poder patógeno. Después de comprobar los resultados de las inoculaciones en plantas de tomate, se continuó el estudio de complementación mediante otros plásmidos que acotaran de forma más precisa los genes que podían estar afectados, en caso que se consiguiera recuperar el poder patógeno. Esto se realizó empleando el plásmido pSM226, que incluye los genes de la región *vir* (*virA*, *virB*) con el gen *virA* inactivado mediante un transposón y el plásmido pSM247, con los mismos genes y con el operón *virB* inactivado (Tabla 4.1, Fig. 4.2). El procedimiento de introducción y comprobación de la transformación con estos plásmidos se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente, y finalmente se realizó la inoculación de las colonias transformadas y la evaluación de la recuperación del poder patógeno en plantas de tomate.

#### 4.3.1.2 Complementación con los mutantes obtenidos en el experimento de inoculación en plantas herbáceas con las cepas C58 e IVIA 1.102.

En estos experimentos, de las 5 cepas de *A. tumefaciens* inoculadas en los huéspedes tomate y pimiento, sólo se obtuvieron clones que presentaron pérdida del poder patógeno con la cepa C58 en pimiento (un mutante, P72) y con pérdida de virulencia en tomate (un mutante, T1) y con la cepa IVIA 1.102 en tomate (dos mutantes con pérdida de virulencia, T32 y T76, y tres con pérdida de patogenicidad, T22, T38 y T67).

Los dos clones mutantes obtenidos en los experimentos de la inoculación con la cepa C58 (T1 y P72) se sometieron al mismo procedimiento de transformación que con la cepa C58R, empleando los mismos plásmidos (pVCK219, pVCK225 y pTHE17), ya que estos clones no son resistentes a kanamicina y tetraciclina, que se emplean como marcadores de la transformación. Sin embargo, los mutantes procedentes de la cepa IVIA1.102 sí son resistentes a kanamicina, por lo que se empleó estreptomycinina para seleccionar las colonias transformadas con los plásmidos que presentan esta resistencia (Tabla 4.1). Las 10 colonias seleccionadas tras la transformación, una vez comprobada la introducción de los plásmidos de complementación mediante extracción y visualización en

geles de agarosa y el mantenimiento del plásmido Ti con el análisis por PCR, se inocularon en plantas de tomate. Con los mutantes T22, T38 y T67 no se pudo comprobar la presencia del plásmido Ti en los transformantes obtenidos con los plásmidos que contienen genes de la región *vir* con ninguno de los iniciadores de la zona del ADN-T utilizados (FGP tnr530-701; CYT1-2), al no obtenerse amplificación, por lo que se emplearon iniciadores de otras zonas de la región *vir* que no se encuentran en los plásmidos de complementación introducidos (FGPvirA2275-FGPvirB<sub>2</sub>164, Ponsonnet y Nesme, 1994; Vcf-Vcr, Sawada *et al.*, 1995).

#### 4.3.1.3 Complementación con los mutantes obtenidos en el experimento *in vitro* con la cepa C58R.

En este experimento de inoculación en tomate tras siembras sucesivas en medio general con y sin antibiótico como inductor de mutaciones se obtuvieron 5 mutantes en el medio sin antibiótico y 5 en el medio con él en el primer experimento, mientras que en la repetición se obtuvieron 6 mutantes en el medio sin antibiótico y 6 en el medio con antibiótico (Cap. 3).

Al tratarse de la misma cepa que en el experimento de inoculación *in planta*, se procedió a realizar las transformaciones con los mismos plásmidos que en el apartado 4.3.1.1, preparando las células electrocompetentes con el mismo procedimiento. Posteriormente se analizaron los transformantes para comprobar su contenido en plásmidos y se inocularon en tomate.

#### 4.3.2 Cambios moleculares ocurridos en las zonas identificadas de los mutantes analizados con pérdida del poder patógeno y de virulencia.

Según los resultados que se obtuvieron en los estudios de complementación, para conocer las causas que provocaron la pérdida del poder patógeno o la virulencia en los distintos mutantes se emplearon diversas estrategias: a) amplificación mediante PCR de las zonas presuntamente afectadas en busca de deleciones o inserciones; b) restricción con endonucleasas de los fragmentos amplificados que podrían evidenciar mutaciones puntuales o reordenaciones genéticas dentro de los mismos, no visibles mediante diferencias en el tamaño de los amplificados; c) secuenciación de los fragmentos que

presentaran diferencias en los análisis anteriores y comparación de la secuencia con la cepa salvaje, para identificar la causa exacta de los cambios ocurridos.

#### 4.3.2.1 Amplificación mediante iniciadores de las distintas zonas involucradas en la virulencia en los mutantes obtenidos.

En la Tabla 4.2 se muestran las secuencias y los tamaños que proporcionan los iniciadores empleados en el estudio mediante amplificaciones para buscar cambios de tamaño (por deleciones o inserciones) en las zonas presuntamente involucradas en la pérdida del poder patógeno. Estos iniciadores se diseñaron a partir de la región *vir* del plásmido pTi de la cepa C58 (Rogowsky *et al.*, 1990) y de los genes del ADN-T (Wood *et al.*, 2001), mediante el programa OLIGO (ver. 4.0, Rychlik, 1989) de forma que los amplificadores cubrieran completamente cada una de estas regiones en fragmentos de un tamaño que permitieran su amplificación de manera sencilla.

Las condiciones de amplificación y mezclas de reacción fueron, con todos los iniciadores, las siguientes: tampón de reacción, 1x; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 μM dNTPs; 3% (v/v) formamida; 10 pmoles de cada iniciador; 1 unidad de enzima *Taq* polimerasa, con un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C 3 min; 40 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 3 min, con una elongación final de 72°C 10 min. Se emplearon 5 μl de muestra en un volumen final de 50 μl. Con estas condiciones se consiguió amplificar fragmentos de hasta 3,7 kb (Figura 4.3).

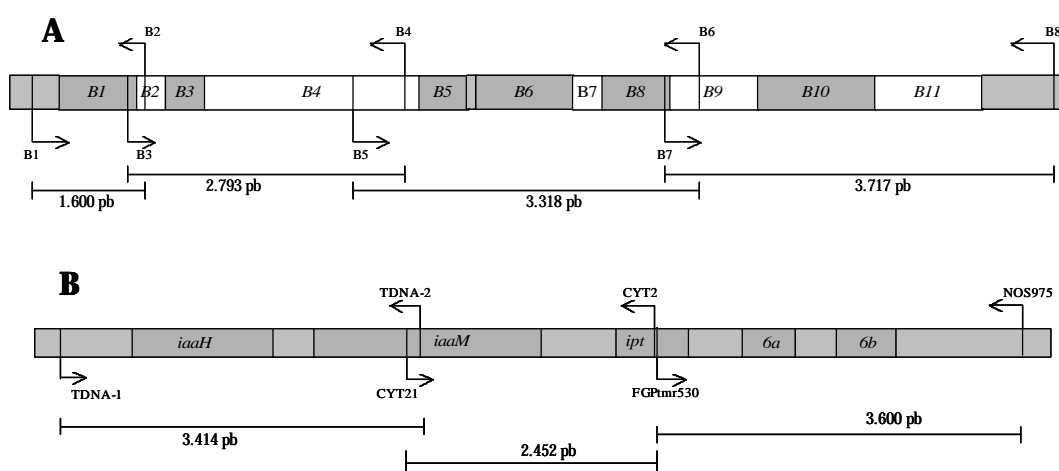


Figura 4.3. A) Análisis de la región *virB* mediante PCR de los mutantes procedentes de la inoculación de la cepa C58R en GF677 y del experimento *in vitro*. Posición de los iniciadores que mapean todo el operón. La posición de cada gen está marcada en blanco y gris, mientras la de los iniciadores están señalados con las flechas. Estos mismos amplificadores se emplearon para realizar el estudio mediante RFLP con diversos enzimas de restricción. B) Análisis por PCR de la región del ADN-T de los mutantes obtenidos con la inoculación de la cepa C58 en huéspedes herbáceos.

Tabla 4.2. Iniciadores empleados en el análisis por amplificación del operón *virB* y la región del ADN-T. Los amplificadores de la región *vir* se emplearon posteriormente en los estudios de perfiles con enzimas de restricción.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb) <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>	Fuente
B1	TCA AAA GGC AAG CAA GCA GAT CTG G		4.257	Ponsonnet y Nesme (1994)
B2	TCA GTG CCG CCA CCT GCA GAT TG	1.650	5.907	Ponsonnet y Nesme (1994)
B3	CAA GGA GGT CCG CAA TAA TG		5.749	Esta Tesis
B4	CGT GGG TGA AGG ATA GAA AA	2.793	8.522	Esta Tesis
B5	GTC TGG TGC GGG GTA TCC AT		8.045	Esta Tesis
B6	ACG GTA TCT TCC GAT GTC TG	3.318	11.343	Esta Tesis
B7	CGC CCA GTA TGC CTA TGA CC		11.024	Esta Tesis
B8	GAA CGT GTT TCA ACG GTT CA	3.717	14.721	Ponsonnet y Nesme (1994)
TDNA-1	AAT GGC TCC CAC CTT G		17.719	Esta Tesis
TDNA-2	TCC TGA TTT CAA GGC TTG AG	3.414	21.113	Esta Tesis
CYT21	TCC ATC GCG TTT ACA GC		21.026	Esta Tesis
CYT2	GAT ATC CAT CGA TCC CTT	2.452	23.469	Haas <i>et al.</i> (1995)
tmr530	CCA TGT TGT TTG CTA GCC AG		23.484	Nesme <i>et al.</i> (1989)
nos975	CAT AAC GTG CAT CAT GCA TG	3.600	25.095	Nesme <i>et al.</i> (1989)

a: tamaño de los fragmentos amplificados con cada una de las parejas de iniciadores (B1-B2; B3-B4;... B7-B8)

b: posición de cada uno de los iniciadores según la secuencia del operón *virB* de Rogowski *et al.*, (1990), nº de acceso GenBank J03320 y según la secuencia del plásmido pTi de la cepa C58 de Wood *et al.* (2001), nº de acceso GenBank AE008690.

#### 4.3.2.2 Restricción con endonucleasas de los fragmentos amplificados (PCR-RFLP) y comparación de los patrones de restricción de los mutantes obtenidos con la cepa C58R.

Los amplificadores obtenidos en el mapeo de la zona *virB* del plásmido Ti con los mutantes provenientes de la cepa C58R, tanto en los experimentos de inoculación en el huésped GF677 como en el experimento *in vitro*, se digirieron con enzimas de restricción que produjeran un número de bandas de suficiente complejidad, para poder observar cambios pequeños dentro del fragmento amplificado. Para ello se analizaron las secuencias amplificadas, a partir de los datos de la secuencia de la región *virB* del plásmido Ti de la cepa C58 tomada de Rogowsky *et al.* (1990), ya que posee el mismo plásmido que la cepa C58R, empleando el programa SeqAid II (Rhoads y Roufa, 1989), que proporciona el número de fragmentos y el tamaño esperado de cada uno tras la restricción con distintos enzimas. Los enzimas elegidos fueron *MspI*, *AluI*, *BanII* y *HpaII*, que proporcionan entre 7 y 20 fragmentos de restricción con los amplificadores obtenidos. Los análisis se llevaron a cabo

empleando 100 µl de amplificado para tener suficiente cantidad de ADN para la restricción con los enzimas y su visualización en geles de acrilamida. Las digestiones se realizaron empleando el tampón correspondiente a cada enzima a la concentración de uso (1x); 100 µl de amplificado; 5 U de enzima, con un volumen final de 130 µl. Se incubaron las digestiones a 37°C toda la noche. Las restricciones se precipitaron siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.*, (1989), con una concentración de cationes monovalentes 0.25M AcNa, la adición de MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración 0.01M para facilitar la precipitación de fragmentos de ADN menores de 200 pb, y precipitación con dos volúmenes de etanol 96% a -20°C. Se incubó a -80°C durante 24 h y se centrifugó posteriormente a 13.000 rpm 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se realizó un lavado con etanol al 70% y se dejó secar al aire después de centrifugar de nuevo y el precipitado se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O MQ estéril. La visualización de los fragmentos se realizó en geles de acrilamida (29:1 acrilamida:bisacrilamida) en porcentajes que variaron entre un 8% y un 16%, dependiendo de los tamaños de las restricciones realizadas. Se sometieron los geles a 300 volts a 8°C durante 2 h empleando todo el volumen de la restricción. Se tiñeron los geles en BrEt y se visualizaron con luz UV.

Las restricciones no se llevaron a cabo con los amplificados de los dos mutantes provenientes de la cepa C58, al considerar en este caso más útil la secuenciación de la zona afectada identificada en los estudios de amplificación. Con los clones no patógenos de la cepa IVIA 1.102 no se pudo llevar a cabo este análisis de restricción de amplificados al no dar positivo las reacciones con los distintos iniciadores empleados de la región afectada.

#### 4.3.2.3 Secuenciación y comparación de secuencias con los mutantes provenientes de la cepa C58R inoculada en el huésped GF677 y los mutantes del experimento *in vitro*.

En estos mutantes se consiguió la recuperación del fenotipo patógeno complementando con plásmidos que contienen los genes *virB* de la región de virulencia, que posee un tamaño de 9 kb.

A partir de la misma secuencia *virB* empleada anteriormente (Rogowsky *et al.* 1990) se procedió al diseño de nuevos iniciadores, que de forma solapante mapearan las zonas de virulencia afectadas en los mutantes. Los fragmentos a amplificar debían tener un tamaño adecuado (desde 800 pb hasta un máximo de 1.200 pb), para así obtener la



secuencia de cada fragmento en una sola reacción de secuenciación, al realizarse la misma con los dos iniciadores de cada amplificación (Figura 4.4, Tabla 4.3). Los fragmentos a secuenciar se extrajeron de geles de agarosa al 0.8% y se purificaron usando el kit Gel Extraction Kit (Life Technologies), y su concentración se determinó comparando con un marcador de concentración conocida (100 pb, Life Technologies). Se secuenciaron en el servicio de secuenciación del IBMCP en la Universidad Politécnica de Valencia. Las secuencias se analizaron mediante comparación con las secuencias procedentes del GenBank del plásmido de la cepa C58 (Kuldau *et al.*, 1990; Rogowsky *et al.* 1990; Hattori *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001; Goodner *et al.*, 2001) empleando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). La secuenciación de todo el operón *virB* se llevó a cabo con un mutante de la cepa C58R procedente del experimento de inoculación en GF677 (mutante 37) y, una vez identificado el gen que presentó diferencias respecto a la cepa salvaje, se realizó la secuenciación de este mismo gen con un mutante de la repetición del experimento *in vitro* (colonia nº 22).

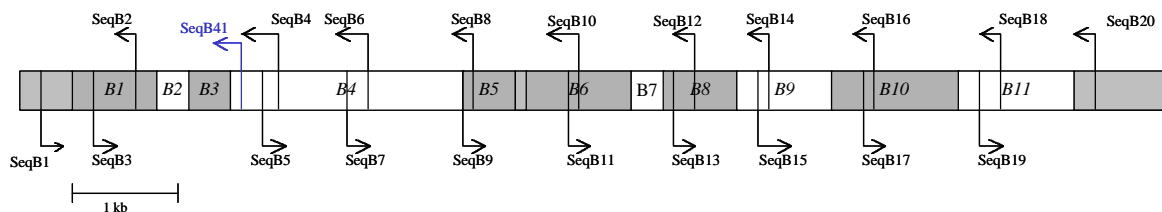


Figura 4.4. Secuenciación de la región *virB*. Posición de los iniciadores empleados en la secuenciación de los genes de este operón. La posición de cada gen está marcada en blanco y gris, mientras la de los iniciadores están señalados con las flechas. En la zona del gen *virB4*, debido a su tamaño, hizo falta diseñar otro iniciador para completar la secuencia, que aparece en color azul.

Tabla 4.3. Iniciadores empleados en la secuenciación del operón *virB*.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb) <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>
SeqB1	TGC GAA GTC CCA CAG TTT AT		4.753
SeqB2	TTG CGG ACC TCC TTG ATT TA	991	5.744
SeqB3	TTT TCC GTG CTC GGT CTG AC		5.338
SeqB4	CCC GCT TGC CGC AAA TAA	1.769	7.107
SeqB41*	ATT TCG GCA TCT TCG AGT TC		6.592
SeqB5	AAA CGC TAC AGA CAA AAA GAA		6.871
SeqB6	GGT CAT GAG CGT CGT TTT AC	898	7.769
SeqB7	GGA ACC CCT TTC GAC TAC AT		7.696
SeqB8	CGC TTC CGC TTT CTC GTT TA	944	8.640
SeqB9	GTA GCC GGA AGT TTC TGC TT		8.621
SeqB10	ATC GTC CCA AGC ATT GTG TC	1.050	9.675
SeqB11	TCA TTG TAT CCG ACA TTC TGC		9.553
SeqB12	GGG TTT CCC GCG CTA CT	1.150	10.703
SeqB13	CAC GTC GGT GGA GAA CTC TA		10.504
SeqB14	ACG GTA TCT TCC GAT GTC TG	844	11.343
SeqB15	CCG GCA GAT TGA GAC TGA		11.293
SeqB16	AGT GAT AGC GCG AGA ACT AC	1.091	12.384
SeqB17	GGT CTC CGA CAC ACA TCA CC		12.318
SeqB18	CAG GTC GAT TTA TCG CAA C	1.200	13.518
SeqB19	CGA TAC AAA TGG AGG TGG AT		13.431
SeqB20	GAG CAT TGC TAC AAA CGT AA	1.090	14.521

a: tamaño de los fragmentos amplificados con cada una de las parejas de iniciadores (SeqB1-SeqB2... )

b: situación de cada uno de los iniciadores según la secuencia del operón *virB* de Rogowski *et al.* (1990), nº de acceso GenBank J03320.

\*: iniciador empleado para completar la secuencia del fragmento entre SeqB3 y SeqB4, al dar el amplificado un tamaño demasiado grande para secuenciar completo desde los extremos.

4.3.2.4 Secuenciación y comparación de secuencias con el mutante T1 procedente de la cepa C58 en la inoculación de plantas herbáceas.

Con los iniciadores empleados en el mapeo de la región del ADN-T (Tabla 4.2), se escogió la pareja que proporcionó diferencias respecto a la cepa parental y se procedió a amplificar mayor cantidad de muestra. Se siguió el mismo procedimiento de purificación y concentración que en el Apdo 4.3.2.3. El fragmento se secuenció totalmente mediante el empleo de iniciadores que, situados internamente en la misma secuencia, proporcionaron todo el fragmento (Tabla 4.4), y mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) se comprobó con qué secuencias almacenadas en el GenBank presentaba homología, para poder identificar de dónde procedía ese fragmento. Con los demás mutantes obtenidos en los experimentos de inoculación en plantas herbáceas procedentes de las cepas C58 (colonia P72) e IVIA 1.102 (T32, T76, T22, T38 y T67) no se llevaron a cabo análisis de secuenciación.

Tabla 4.4. Iniciadores empleados en la secuenciación de la región del ADN-T de la colonia T1 procedente de la inoculación de la cepa C58 en tomate.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb)	Posición <sup>a</sup>
CYT21*	TCC ATC GCG TTT ACA GC		17.411
CYT2*	GAT ATC CAT CGA TCC CTT	2.449	19.860
INS-1**	CGA GCA TCT CTC TGA CAA T	---	---
INS-2**	ATG CTC GGT CGC AAG AC	---	---
INS-3	ACT GGC TTT ACC GTC TCC	---	19.234

a: situación de cada uno de los iniciadores según la secuencia del plásmido pTi de la cepa C58 de Wood *et al.* (2001), nº de acceso GenBank AE008690.

\*: Iniciadores empleados en la secuenciación de la inserción del mutante T1, al dar diferencias de tamaño en el amplificado respecto a la cepa C58.

\*\* : Iniciadores diseñados a partir de la secuencia de inserción del mutante T1. No hay correspondencia con la secuencia del ADN-T.

#### 4.3.3 Confirmación de la pérdida del poder patógeno con mutantes de la cepa C58R mediante complementación con un plásmido que contiene el gen *virB5*.

Los resultados obtenidos en la secuenciación del operón *virB* del mutante 37 indicaron que el gen afectado en el mismo se trataba de *virB5*, y para confirmar este resultado se procedió a intentar recuperar el fenotipo patógeno. Para ello, se solicitó el plásmido que contiene el gen *virB5* descrito en el trabajo de Berger y Christie (1994), quienes construyeron plásmidos que contenían cada uno de los genes de la región *virB* de *A. tumefaciens* con el fin de estudiar cuáles de ellos eran esenciales para la virulencia de la bacteria. El plásmido pPC953, resistente a kanamicina, contiene el gen *virB5* bajo el promotor de los genes *virB*, y con él se pueden realizar estudios de complementación con los mutantes procedentes de la cepa C58R para confirmar si es éste el gen afectado (Tabla 4.1). Previa a la utilización de este plásmido se realizaron modificaciones para poder emplearlo en las cepas de *Agrobacterium*, al estar la construcción en un plásmido (pBCSK<sup>+</sup>, Stratagene) que no se replica en esta bacteria. Para ello, se procedió a ligar este plásmido con otro que sí permitiera la replicación en *Agrobacterium*. El plásmido escogido fue el pBBR1MCS5 (Kovach *et al.*, 1995), que presenta resistencia a gentamicina. Ambos plásmidos se extrajeron con el kit Plasmid miniprep (Qiagen, EE.UU.).

La ligación se llevó a cabo previa digestión de los plásmidos con enzimas que proporcionan un solo corte en ambos plásmidos. En el caso del plásmido pPC953, el enzima *ScaI* realiza un solo corte en su secuencia y no afecta al gen *virB5* introducido para la complementación, pero proporciona extremos romos, por lo que se empleó otra enzima (*EcoRV*) que proporcionara el mismo tipo de corte con el plásmido pBBR1MCS5. Para ello, 5 µg del plásmido pPC953 y 10 µg del plásmido pBBR1MCS5 se digirieron con los enzimas *ScaI* y *EcoRV*, respectivamente, en 20 µl de volumen final, con 20 U de enzima *ScaI* y 30 U de *EcoRV*, incubando toda la noche a 37°C. Estas digestiones se precipitaron con 5M NaCl (concentración final 0.1 M) y dos volúmenes de etanol 96% a -20°C, incubando a -80°C durante 1 h. Después de lavar con 500 µl de 70% etanol y eliminar el sobrenadante de la centrifugación a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C, se resuspendieron en 5 µl de agua MQ estéril y se usó todo el volumen de ambos plásmidos en la ligación. Se empleó el enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) y la mezcla de reacción, consistente en 5 µl de cada plásmido, 1x tampón de reacción, 50% PEG8000

(5% v/v), 800 U de enzima, en un volumen final de 20 µl, se incubó durante 24 h a temperatura ambiente. La ligación se concentró mediante precipitación con 5M NaCl y 2 volúmenes de etanol 96% a -20°C, siguiendo la misma metodología que las restricciones de los plásmidos. El precipitado se resuspendió en 3 µl de agua MQ estéril.

Todo el volumen de la ligación se introdujo por transformación mediante electroporación en la cepa C58C1 (cepa sin el plásmido Ti), ya que el producto esperado de la ligación no se replica en *E.coli*. De las colonias transformadas, se escogieron 10 para su análisis mediante extracción de plásmidos y posterior digestión con el enzima de restricción *EcoRI*. Se extrajeron de las colonias plásmidos del tamaño adecuado y que proporcionaron las bandas de restricción esperadas, y se introdujeron por electroporación en los mutantes 37 y 22, y posteriormente los transformantes se inocularon en tomate.

#### 4.3.4 Análisis del cultivo crioconservado de la cepa C58R.

Los resultados obtenidos en los análisis de complementación y las secuenciaciones llevadas a cabo con los dos mutantes seleccionados de los experimentos de inoculación con C58R en el huésped GF677 y de los experimentos *in vitro*, indicaban que la pérdida del poder patógeno en todos los mutantes analizados parecía deberse a la misma causa. Sin embargo, resultaba sorprendente que en condiciones tan diferentes la causa fuera la misma en estos mutantes. Se planteó, por ello, este experimento con el fin de comprobar el poder patógeno del cultivo crioconservado de la cepa C58R del que procedía el inóculo utilizado en los experimentos de inoculación. Para ello, se inocularon plantas de tomate con 100 colonias aisladas directamente del stock en el medio PYGA + gentamicina (50 µg/ml) y la inoculación de otras 100 colonias aisladas a partir de una colonia del stock purificada mediante tres pases por agua, sembrando en triple estría en placa después de cada incubación para obtener colonias bien separadas.

#### 4.3.5 Análisis de los plásmidos Ti de los mutantes obtenidos.

En este caso, el estudio de los mutantes con pérdida del poder patógeno se concentró en la caracterización de sus plásmidos Ti, debido a la falta de amplificación de grandes fragmentos de la región del ADN-T en los análisis por PCR llevados a cabo con los mutantes no patógenos procedentes de la cepa IVIA 1.102. También se analizó el contenido en plásmidos de los mutantes con virulencia atenuada (T32 y T76), así como de los mutantes procedentes de la cepa C58, para observar si conservaban el mismo contenido en plásmidos. Para ello, se procedió a realizar los siguientes análisis:

##### 4.3.5.1 Perfil de plásmidos mediante geles Eckhardt.

Las muestras se analizaron mediante el procedimiento de lisis en pocillo (Eckhardt) modificado (Fortin *et al.* 1992) para observar posibles diferencias en el tamaño de los plásmidos Ti de las colonias mutantes comparados con el de la cepa salvaje IVIA 1.102. El protocolo consistió en resuspender 1 ml de cultivo fresco de cada muestra (0,2 DO<sub>600</sub>) en 500 µl de agua y 1 ml de N-lauril-sarcosina al 0,3%, centrifugar a 13.000 rpm 3 min y resuspender el precipitado en 40 µl de Ficoll 20% (PM 400.000) preparado en tampón TE (10 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8). En un gel de agarosa al 0,75% en tampón TBE 1x se introdujeron en los pocillos 25 µl de SDS 10% + xylene cianol y se aplicaron 40 volts durante 15 min con la polaridad invertida, para que el SDS se situara por encima de los pocillos. A cada precipitado resuspendido en Ficoll se le añadieron 10 µl de tampón de lisis (tampón TE; RNasa A (0,4 mg/ml); lisozima (0,04 mg/ml) y azul de bromofenol (1 mg/ml)), y se depositaron en los pocillos 25 µl de esta mezcla. Se volvió a someter el gel a 40 volts durante 30 min con la polaridad normal y a 70 volts durante 7 horas más. Se tiñó el gel en BrEt y se visualizó bajo luz UV. Los tamaños de los plásmidos se calcularon empleando el programa Kodak Digital Science 1D (v. 3.0.1) usando como plásmidos de referencia los de la cepa C58.

##### 4.3.5.2 Hibridaciones con sondas de diversas regiones del plásmido pTi.

La caracterización de los plásmidos de los mutantes se llevó a cabo mediante restricción del ADN total de las colonias mutantes y posterior hibridación con sondas de distintas regiones del plásmido Ti. Estos análisis se llevaron a cabo solo con los mutantes

no patógenos de la cepa IVIA 1.102 y uno de virulencia atenuada (T32), empleando como control positivo la cepa C58 y como control negativo la cepa C58C1, que no posee plásmido Ti. La extracción de ADN total se realizó siguiendo el protocolo descrito en Sambrook *et al.*, (1989). Se emplearon 5 µg de ADN en las restricciones con los enzimas *EcoRI* y *HindIII* en un volumen total de 20 µl. Se incubaron las digestiones a 37°C toda la noche y se observaron en geles de agarosa al 0.8%, para ajustar los volúmenes de cada muestra a utilizar en el gel de transferencia a membrana. Los análisis de hibridación con las sondas se llevaron a cabo mediante transferencia del ADN del gel de agarosa a membrana (Southern, 1975).

Las digestiones con enzimas de restricción realizadas con ADN total, así como los plásmidos aislados mediante geles Eckhardt, fueron transferidos a membranas de nylon con carga positiva (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo rápido de transferencia alcalina. Este protocolo emplea para la transferencia del ADN a la membrana una solución de 0.4M NaOH, posteriormente la membrana se lava con 5x SSCP y se fija el ADN con luz UV durante 8 min después de ser secadas al aire. Estas membranas se hibridaron con las diversas sondas utilizando el estuche de detección Dig Wash y Block Buffer Set (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las membranas se revelaron mediante exposición en oscuridad de películas (Kodak) y posterior revelado fotográfico.

#### 4.3.5.2.1 Obtención de las sondas empleadas en las hibridaciones con el ADN de las colonias mutantes.

Las sondas empleadas se muestran en la Tabla 4.5, y comprenden la zona de la región del ADN-T y un fragmento de un gen de la región *vir*, así como el plásmido Ti completo de la cepa IVIA 1.102.

Tabla 4.5. Sondas empleadas en la caracterización de los plásmidos de las colonias mutantes mediante hibridación.

Sonda	Zona del plásmido Ti
pTHE17	Incluye todo el ADN-T y zonas adyacentes dcha e izqda, cepa C58
VirDA-DE	Fragmento de 338 pb del gen <i>virD2</i>
pTi 1.102	pTi completo de la cepa IVIA 1.102

Las sondas se obtuvieron mediante dos procedimientos. En uno de ellos, se empleó el nucleótido dUTP marcado con digoxigenina (Dig-11-dUTP, Boehringer Mannheim, Alemania) para marcar productos de PCR durante su amplificación. Este protocolo es el mismo que se emplea para amplificar un fragmento de ADN con los iniciadores de interés pero se diferencia en que a la composición de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, 1 mM) añade dTTP a una concentración 0.8 mM y dUTP marcado a una concentración de 0.2 mM. Se emplearon 100  $\mu$ M de esta mezcla de nucleótidos en la reacción. Con este sistema se construyó una sonda de la región *vir* del plásmido Ti, empleando como ADN diana el de la cepa IVIA 1.102 y los iniciadores VirDA-DE (Haas *et al.*, 1995), por lo que esta sonda tiene un tamaño de 338 pb.

El otro sistema consistió en el marcaje del plásmido que contiene la región del ADN-T del plásmido Ti de la cepa C58 y el plásmido Ti completo de la cepa IVIA 1.102. Se empleó para ello el estuche DIG High Prime DNA Labeling Starter Kit I (Roche Molecular Biochemicals, GmbH, Mannheim, Alemania) para marcar ADN mediante “random priming” con digoxigenina-dUTP con el fragmento *klenow* del enzima ADN Polimerasa I. Los plásmidos se sometieron a restricción con el enzima *EcoRI* y después de concentrarlos con 5M NaCl y etanol 96% se resuspendieron en 16  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, se desnaturalizaron durante 10 min a 100°C, se enfriaron en hielo y, posteriormente, se incubaron a 37°C en presencia del enzima *klenow*, tampón de reacción y con dNTPs marcados con digoxigenina que van siendo incorporados al azar al ADN. El tiempo de incubación fue de al menos 24 h, para permitir el mayor marcaje posible de los plásmidos, y posteriormente se inactivó el enzima con la adición de 2  $\mu$ l de 0.2M EDTA.

Para el marcaje del plásmido Ti completo de la cepa IVIA 1.102 se realizó previamente una extracción mediante el protocolo descrito por Zhang y Kerr (1993), que hace uso de las características del BrEt para separar, con gran pureza y en cantidad, el ADN plasmídico, superenrollado, del ADN cromosómico, relajado. El protocolo consistió en una extracción previa con lisis alcalina (Currier y Nester, 1976). El ADN crudo se precipitó con tratamiento con altas concentraciones de BrEt (0,1% v/v). Finalmente, se extrajo este compuesto con lavados en fenol y cloroformo, quedando al final el plásmido Ti únicamente con trazas de ADN cromosómico.



#### 4.3.6 Análisis de la virulencia de los mutantes obtenidos a partir de la cepa IVIA 1.102 complementados con el plásmido pTHE17.

Se inocularon tomates con las colonias mutantes transformadas con el plásmido que posee toda la región del ADN-T, para evaluar la complementación del fenotipo de virulencia atenuada. Para ello, se siguió el protocolo descrito en el Capítulo 2 (Apdo 2.3.8). El número de tomates inoculados fue de 11 por cada una de las cepas (IVIA 1.102, T32+pTHE17 y T76+pTHE17) y se evaluó el peso de los tumores obtenidos.

Los pesos de los tumores obtenidos para la cepa parental y los mutantes complementados se compararon utilizando un análisis de varianza de un factor (Oneway ANOVA) mediante el programa estadístico *SPSS para windows* Version 10.1.3. Se realizó un contraste *a priori* para contrastar el peso de los tumores inducidos por la cepa parental frente a los producidos por los dos mutantes complementados.

#### 4.3.7 Análisis del poder patógeno de los mutantes complementados en los huéspedes de origen de las cepas parentales.

Los mutantes que recuperaron la plena virulencia o el poder patógeno con los plásmidos empleados en los ensayos de complementación en plantas de tomate se inocularon en el tallo de los huéspedes de donde se aislaron las cepas parentales para comprobar si también en dichos huéspedes presentaban la recuperación de los fenotipos afectados. La inoculación se llevó a cabo depositando un volumen de 10  $\mu$ l de una suspensión de 0,6 ( $DO_{600}$ ) en el tallo de cerezo para las colonias provenientes de la cepa C58 y C58R, y de crisantemo para las obtenidas con la cepa IVIA 1.102. Al cabo de seis meses y un mes respectivamente se observó la formación de tumores en ambos huéspedes.

## 4.4 RESULTADOS

4.4.1 Identificación de las zonas involucradas en la pérdida del poder patógeno en los mutantes obtenidos en los diversos experimentos. Estudios de complementación mediante plásmidos.

Los resultados de la transformación y posterior inoculación de los mutantes procedentes de los experimentos de inoculación con la cepa C58R en el huésped GF677 con los distintos plásmidos empleados se muestran en la Tabla 4.6. Se recuperó el poder patógeno en todos los mutantes al inocular en plantas de tomate los clones transformados con los plásmidos pVCK219 y pSM226. El análisis con los plásmidos que acotan la zona izquierda de la región *vir* del plásmido Ti indican que la región *virB* fue la afectada en todos los mutantes analizados (Fig. 4.2).

Tabla 4.6. Complementación de clones no patógenos de C58R obtenidos en el experimento de inoculación del huésped GF677 con diversos plásmidos que contienen la región *vir* o el ADN-T.

Mutante	Patogenicidad en tomate*				
	pVCK 219	pVCK 225	pSM 226	pSM 247	pTHE17
37	+	-	+	-	-
39	+	-	+	-	-
42	+	-	+	-	-
47	+	-	+	-	-
57	+	-	+	-	-
61	+	-	+	-	-
63	+	-	+	-	-
66	+	-	+	-	-
67	+	-	+	-	-
68	+	-	+	-	-
72	+	-	+	-	-
73	+	-	+	-	-
75	+	-	+	-	-
111	+	-	+	-	-
112	+	-	+	-	-
113	+	-	+	-	-

\*: resultado de la inoculación de los clones transformados en tomate. +: formación de tumor; -: no formación de tumores.

Los resultados de las inoculaciones con los transformantes obtenidos con los clones mutantes de los experimentos de inoculación de huéspedes herbáceos se muestran en la Tabla 4.7. De los mutantes procedentes de la inoculación de la cepa C58, el aislado de pimiento (P72) no consiguió recuperar el poder patógeno con ninguno de los plásmidos utilizados, mientras el obtenido en tomate (T1) complementó con el plásmido pTHE17, que contiene los genes de la región del ADN-T. Igualmente, los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102, tanto los que presentan pérdida del poder patógeno (T22, T38, T67), como los dos mutantes con virulencia atenuada (T32 y T76), recuperaron el poder patógeno y el nivel de virulencia con el plásmido pTHE17 (Fig. 4.2).

Tabla 4.7. Complementación de los mutantes no patógenos provenientes de los experimentos de inoculación en huéspedes herbáceos con diversos plásmidos de complementación.

Mutante	Origen <sup>a</sup>		Patogenicidad en tomate*		
	Planta/cepa	pVCK 219	pVCK 225	pTHE17	
T1	Tomate/C58	-	-	+	
P72	Pimiento/C58	-	-	-	
T22	Tomate/IVIA 1.102	-	-	+	
T38	Tomate/IVIA 1.102	-	-	+	
T67	Tomate/IVIA 1.102	-	-	+	
T32	Tomate/IVIA 1.102	+d	+d	+	
T76	Tomate/IVIA 1.102	+d	+d	+	

a: Huésped de origen de cada mutante y cepa de *A. tumefaciens* inoculada.

\*: resultado de la inoculación de las colonias transformadas en tomate. +: formación de tumor; -: no formación de tumores; +d: tumor de menor tamaño que la cepa salvaje.

Los resultados obtenidos en los experimentos de complementación con los clones no patógenos del experimento *in vitro* con la cepa C58R, mostraron que los plásmidos que consiguieron restaurar el poder patógeno en todos los mutantes obtenidos contenían genes de la región *virB* del plásmido, al igual que ocurría con los mutantes obtenidos en el experimento *in planta*. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Resultado de la transformación de los mutantes no patógenos de C58R en los experimentos *in vitro* con los plásmidos de complementación.

Primer experimento		Patogenicidad en tomate*			
Mutante	pVCK 219	pVCK 225	PSM 226	pSM 247	pTHE17
2	+	-	+	-	-
3	+	-	+	-	-
10	+	-	+	-	-
11	+	-	+	-	-
20	+	-	+	-	-
2G**	+	-	+	-	-
10G	+	-	+	-	-
11G	+	-	+	-	-
19G	+	-	+	-	-
20G	+	-	+	-	-
Segundo experimento		Patogenicidad en tomate*			
Mutante	pVCK 219	pVCK 225	PSM 226	pSM 247	pTHE17
9	+	-	+	-	-
12	+	-	+	-	-
22	+	-	+	-	-
34	+	-	+	-	-
38	+	-	+	-	-
43	+	-	+	-	-
9G**	+	-	+	-	-
22G	+	-	+	-	-
26G	+	-	+	-	-
34G	+	-	+	-	-
43G	+	-	+	-	-
44G	+	-	+	-	-

\*: resultado de la inoculación de las colonias transformadas en tomate. +: formación de tumor;

-: no formación de tumores.

\*\* : clones obtenidos en la incubación en el medio PYG+gentamicina.

#### 4.4.2 Análisis molecular de los mutantes obtenidos en los distintos experimentos.

Los mutantes identificados en los diversos experimentos realizados se sometieron a varios tipos de análisis para identificar los genes afectados. Los resultados obtenidos con cada uno de ellos se describen a continuación.

##### 4.4.2.1 Análisis mediante amplificación por PCR de las regiones implicadas (*virB* y ADN-T) en la pérdida del poder patógeno de los mutantes.

Los amplificadores obtenidos con los iniciadores descritos en la Tabla 4.2 a partir de los 16 clones procedentes de la cepa C58R en los experimentos *in planta* y de los 22 mutantes del experimento *in vitro* no mostraron diferencias de tamaño debido a inserciones o deleciones o, al menos, no los presentaron en tamaño suficientemente

grande como para poder observar diferencias comparando con los fragmentos obtenidos con la cepa salvaje correspondiente (Figura 4.5). Los fragmentos amplificados cubren toda la región *virB*, que comprende un operón de 9 kb de tamaño con 11 genes, la mayoría de los cuales son esenciales para el poder patógeno (Fig. 4.3). En el caso de los clones procedentes de la cepa C58, no se apreciaron diferencias en los amplificados de la zona del ADN-T ni de la región *vir* en uno de los mutantes (P72), mientras que en el otro (T1) se observó un amplificado 1,3 kb mayor que la cepa parental usando los iniciadores CYT21-2, que están situados entre la parte central del gen *iaaM* y el gen *tmr* (Figura 4.6). Con los mutantes obtenidos con la cepa IVIA 1.102, el análisis con los iniciadores del ADN-T mostraron que las dos colonias que presentaron pérdida de virulencia proporcionaron los mismos tamaños de amplificados en todos los análisis. Un caso especial fueron los clones que presentaron pérdida del poder patógeno (T22, T38 y T67), ya que no se consiguió obtener amplificados con ninguna de las parejas de iniciadores de la región del ADN-T empleados, lo que implicaría unos cambios a nivel genético que involucrarían grandes áreas de esta región.

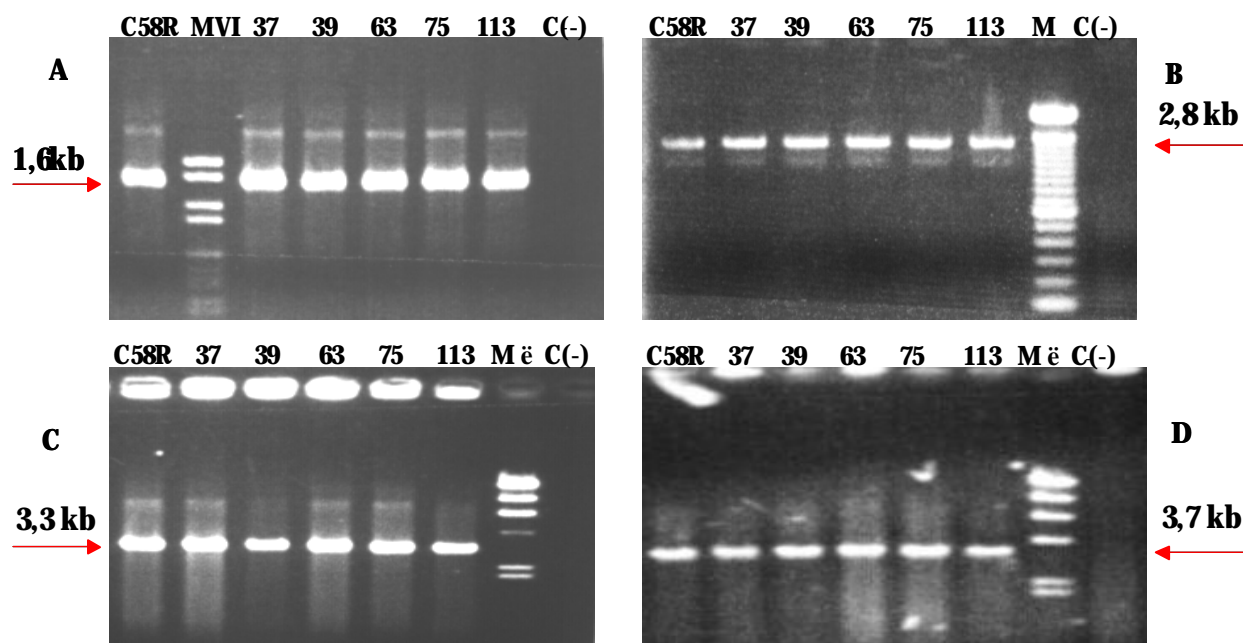


Figura 4.5. Análisis mediante PCR del operón *virB*. Se observa que ninguno de los clones analizados presenta diferencias en los tamaños de los amplificados respecto a la cepa salvaje C58R. Estos productos de PCR se emplearon posteriormente en los análisis de restricción con enzimas. A): amplificación con los iniciadores B1-B2; B): amplificación con los iniciadores B3-B4; C): amplificación con los iniciadores B5-B6; D): amplificación con los iniciadores B7-B8. MVI: marcador VI (Boehringer Mannheim); M: marcador 100 pb (Life Technologies); M $\ddot{e}$ : marcador Lambda (Sigma); C(-): control negativo.

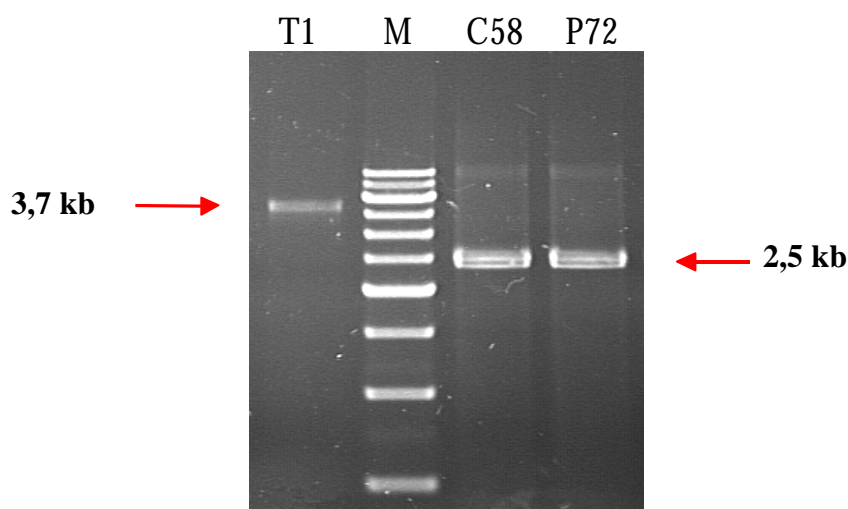


Figura 4.6. Análisis por PCR de los mutantes T1 y P72 procedentes de la inoculación con la cepa C58 en tomate y pimiento. Amplificación realizada con los iniciadores CYT21-2, que proporcionan un tamaño de 2.452 pb. Se observa que la muestra T1 da un tamaño unas 1.300 pb mayor que la cepa C58 y P72, debido a una inserción. M: marcador XVII (Life Technologies).

#### 4.4.2.2 Análisis de los mutantes procedentes de la cepa C58R en los experimentos *in vivo* e *in vitro* mediante RFLPs de los amplificados de la región *virB*.

Los análisis mediante endonucleasas de restricción de los amplificados obtenidos se llevaron a cabo únicamente con los 38 mutantes obtenidos con la cepa C58R (experimentos de inoculación en el huésped GF677 e *in vitro*). La región de virulencia *virB*, al tener un tamaño grande (9 kb) hace necesario intentar ubicar el área donde se encuentren las diferencias respecto a la cepa parental, ver si esos cambios afectan a la misma área en todos los clones y posteriormente realizar análisis de secuenciación para caracterizar a los mutantes. Los resultados obtenidos, de los que en la Figura 4.7 se muestran algunos de ellos, no proporcionaron información sobre qué zona o qué gen están afectados, dentro de la región *virB*. Todos los perfiles de restricción obtenidos con los distintos fragmentos de PCR analizados con todos los enzimas utilizados fueron idénticos entre las colonias mutantes y la cepa parental. Los cambios que hubieran sufrido los mutantes debían ser demasiado pequeños para poder ser observables mediante esta metodología. Por ello se decidió llevar a cabo la secuenciación de toda la región *virB* de

uno de los mutantes obtenidos en los experimentos de inoculación *in planta*, compararla con las secuencias de la cepa C58 disponibles en el GenBank (Kuldau, 1990; Hattori *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001) y según el resultado que proporcionara, comprobar si en otros mutantes se observaba la misma causa secuenciando el/los mismos genes afectados.

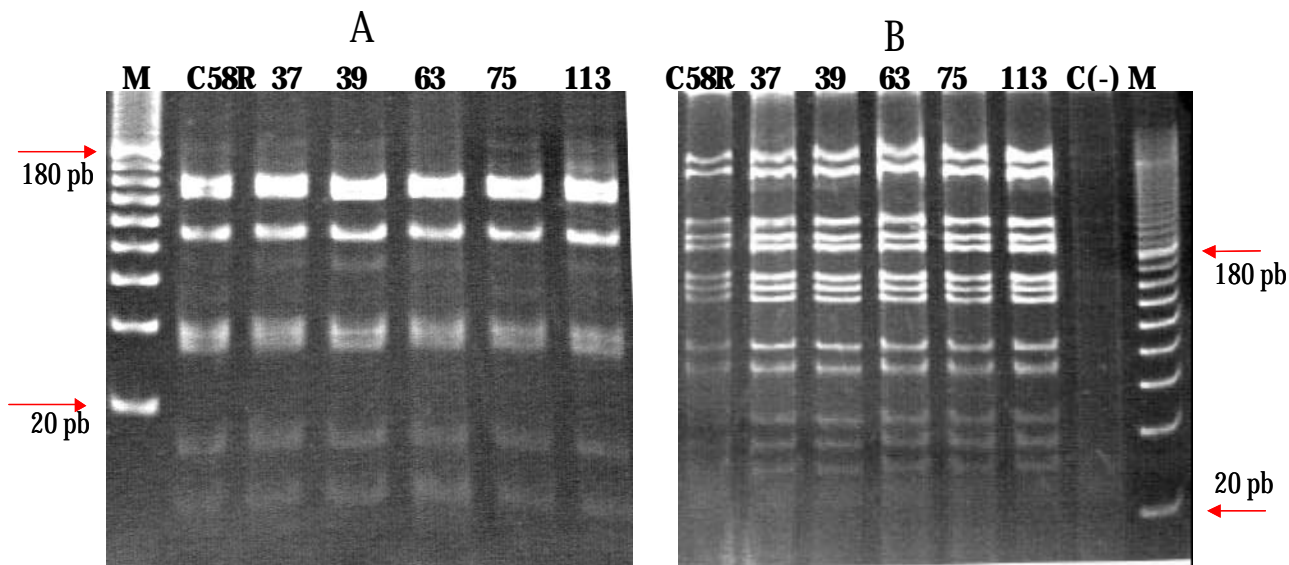


Figura. 4.7. Restricción de los amplificadores de la región *vir B* de algunos de los mutantes obtenidos en los experimentos de inoculación en el huésped GF677 inoculado con la cepa C58R. Los perfiles obtenidos fueron siempre idénticos comparando con la cepa parental. La separación se llevó a cabo en geles de acrilamida de porcentaje variable según el número y tamaño de las bandas a separar y posterior tinción con BrEt. A: restricción realizada con el enzima *MspI* con el amplificado B1-B2. B: restricción llevada a cabo empleando el enzima *MspI* sobre el amplificado B3-B4. M: marcador 20 pb (Life Technologies); C(-): control negativo.

#### 4.4.2.3 Secuenciación de las regiones implicadas en la pérdida del poder patógeno de los mutantes obtenidos en los experimentos *in planta* e *in vitro*.

Las secuenciaciones de la región *virB* llevadas a cabo con los mutantes obtenidos con la cepa C58R y del mutante procedente de la inoculación de la cepa C58 en tomate proporcionaron los siguientes resultados tras el análisis de las secuencias obtenidas.

##### 4.4.2.3.1 Análisis de la secuenciación de las colonias 37 y 22 procedentes de la cepa C58R.

Las secuencias obtenidas de toda la región *virB* con la cepa 37 se compararon mediante el programa ClustalW con las secuencias de la cepa C58 almacenadas en el GenBank descritas anteriormente. Estas comparaciones, en un primer análisis, proporcionaron diferencias en las secuencias de los genes *virB1*, *B2*, *B3*, *B4*, *B5*, *B7*, *B8* y

*B11*, mientras los genes *virB6*, *B9* y *B10* fueron idénticos a los de la cepa C58. Las diferencias que se observaron en estos genes eran en su mayoría la sustitución de un nucleótido por otro, inserciones de entre tres y seis nucleótidos y una deleción, en el gen *virB5*. Los cambios debidos a sustituciones de un nucleótido por otro, o inserciones o deleciones de tripletes de nucleótidos suelen producir mutaciones silenciosas, sin efectos en el fenotipo, mientras una deleción puntual que no es compensada por una inserción dentro del mismo gen, produce un cambio en el marco de lectura del gen (ORF), y modifica la composición de la proteína resultante. Por ello, se procedió a comprobar con el programa VectorNTI ver. 5 (Informax Inc. GB) los marcos de lectura que proporcionaban las secuencias de todos los genes *virB* obtenidas con la colonia 37 (Figura 4.8). En este análisis se observa que todos los genes, excepto *virB5*, presentan un marco de lectura que da lugar a una proteína completa, desde el codón de inicio hasta el codón de parada. En el caso de la secuencia del gen *virB5* se observa que el marco de lectura está interrumpido por la aparición de la deleción, lo que implica que no puede sintetizarse la proteína completa, por lo que su función está afectada.

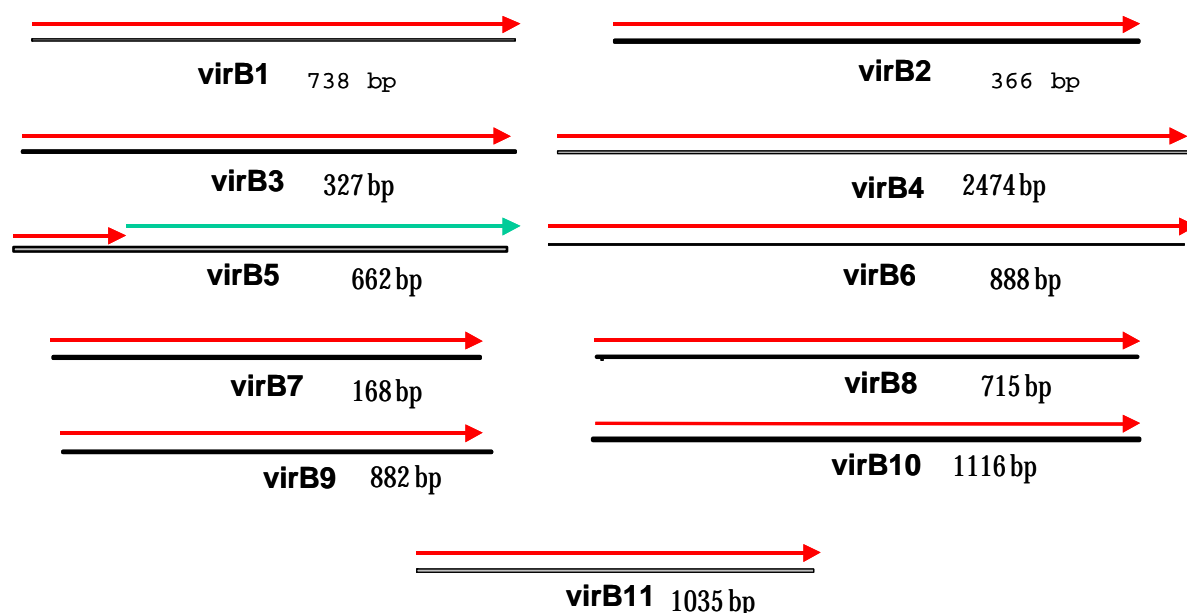


Figura. 4.8. ORFs de las secuencias de la región *virB* obtenidas con el mutante 37 procedente del experimento de inoculación con la cepa C58R en el huésped GF677. Análisis realizado con el programa Vector NTI suite, v. 5 (Informax, GB). Se observa que la secuencia del gen *virB5* se presenta interrumpida, debido a la aparición de un codón de parada en la parte inicial del gen.



Para confirmar este resultado, se procedió a repetir la secuenciación del gen *virB5* con el mutante 37 y también con la cepa C58R y con una de las colonias obtenidas en el experimento *in vitro*, la colonia 22. Los resultados de la secuenciación y posterior comparación de las secuencias de estos genes *virB5* con el programa ClustalW se muestran en la Figura 4.9, y en ella se observa que en los dos mutantes aparece la delección de un nucleótido en la posición 8.882 (secuencia del operón *virB*, Rogowsky *et al.*, 1990) mientras en la cepa C58R está presente una citosina. Este resultado, en el que la causa de la pérdida del poder patógeno en dos mutantes obtenidos en experimentos totalmente diferentes se debe a la delección de un mismo nucleótido en el mismo gen, llevó a analizar el cultivo crioconservado de la cepa C58R, por si dicha delección no fuera realmente debida a cambios sufridos en los experimentos de inoculación en plantas así como en los experimentos de siembras sucesivas. En caso contrario, podría ser un punto caliente (“hot spot”) que existiría en esta cepa y que causaría una inestabilidad genética que se manifestaría en situaciones diversas de la misma manera.

Figura 4.9. Análisis comparativo mediante CLUSTALW de las secuencias del gen *virB5* obtenidas de los clones mutantes 37, procedente del experimento de inoculación de la cepa C58R en GF677 y el clon 22 del segundo experimento *in vitro* con la misma cepa. La flecha señala el lugar donde se presenta la delección. a: secuencia directa; b: secuencia reversa.

```

C58R-a      GGATCAGCTTCGCAAAGTACAGGGGGACAACCCATCAGCCTGGCTCAGCGAATTTATGGC
C58R-b      GGATCAGCTTCGCAAAGTACAGGGGGACAACCCATCAGCCTGGCTCAGCGAATTTATGGC
37-a       GGATCAGCTTCGCAAAGTACAGGGGGACAACCCATCAGCCTGGCTCAGCGAATTTATGGC
37-b       GGATCAGCTTCGCAAAGTACAGGGGGACAACCCATCAGCCTGGCTCAGCGAATTTATGGC
22-a       GGATCAGCTTCGCAAAGTACAGGGGGACAACCCATCAGCCTGGCTCAGCGAATTTATGGC
22-b       GGATCAGCTTCGCAAAGTACAGGGGGACAACCCATCAGCCTGGCTCAGCGAATTTATGGC
*****

C58R-a      TCGTTACCACGAGGCAAAAGATTGATCAAAGGTGGGGAACATGAAGATCATGCAACTTG
C58R-b      TCGTTACCACGAGGCAAAAGATTGATCAAAGGTGGGGAACATGAAGATCATGCAACTTG
37-a       TCGTTACCACGAGGCAAAAGATTGATCAAAGGTGGGGAACATGAAGATCATGCAACTTG
37-b       TCGTTACCACGAGGCAAAAGATTGATCAAAGGTGGGGAACATGAAGATCATGCAACTTG
22-a       TCGTTACCACGAGGCAAAAGATTGATCAAAGGTGGGGAACATGAAGATCATGCAACTTG
22-b       TCGTTACCACGAGGCAAAAGATTGATCAAAGGTGGGGAACATGAAGATCATGCAACTTG
*****

C58R-a      TTGCTGCGGCCATGGCCGTCAGCCTTCTTTTCGGTTCGGGCCCGCGCGGGCGCAGTTCGTTG
C58R-b      TTGCTGCGGCCATGGCCGTCAGCCTTCTTTTCGGTTCGGGCCCGCGCGGGCGCAGTTCGTTG
37-a       TTGCTGCGGCCATGGCCGTCAGC-TTCTTTTCGGTTCGGGCCCGCGCGGGCGCAGTTCGTTG
37-b       TTGCTGCGGCCATGGCCGTCAGC-TTCTTTTCGGTTCGGGCCCGCGCGGGCGCAGTTCGTTG
22-a       TTGCTGCGGCCATGGCCGTCAGC-TTCTTTTCGGTTCGGGCCCGCGCGGGCGCAGTTCGTTG
22-b       TTGCTGCGGCCATGGCCGTCAGC-TTCTTTTCGGTTCGGGCCCGCGCGGGCGCAGTTCGTTG
*****
    
```



4.4.2.3.2 Análisis de la secuencia de la inserción de la colonia T1.

El mutante procedente de la cepa C58 inoculada en tomate (T1) proporcionó un fragmento de PCR con los iniciadores CYT21-CYT2 mayor de 3,5 kb, lo que indica la presencia de una inserción de aproximadamente 1,3 kb respecto a la cepa parental, ya que la secuencia amplificada debería ser de 2,5 kb (Fig. 4.6). La comparación de la secuencia del mutante T1 obtenido de la inoculación en tomate con la cepa parental C58 empleando el programa BLAST permitió localizar la secuencia del inserto, que se encuentra situada en la parte central del gen *iaaM*, en la posición 17.760 (secuencia del Ti completo, Wood *et al.*, 2001) (Figura 4.10).

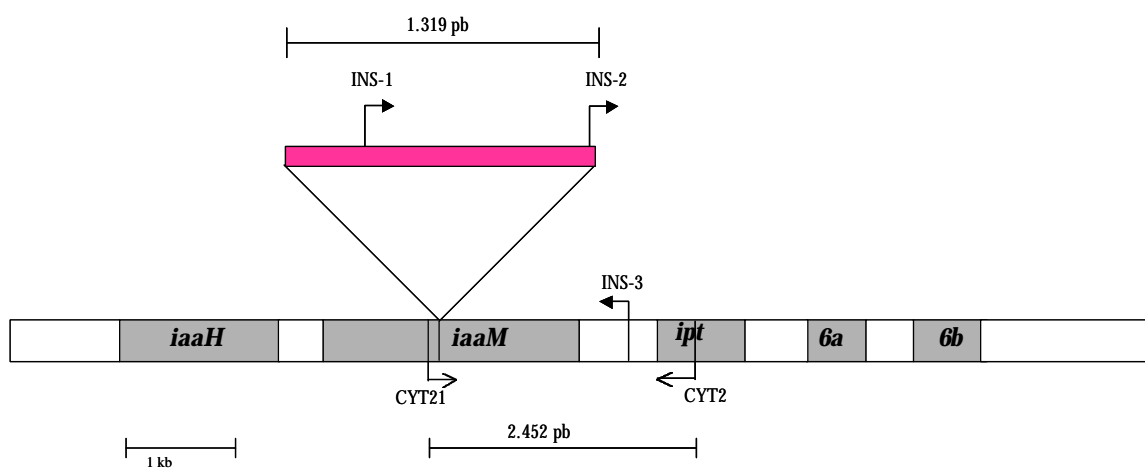


Figura 4.10. Secuenciación de la región del ADN-T afectada en el mutante. Los iniciadores que enmarcan la inserción presente en el mutante T1 (CYT21-CYT2) se muestran en la posición que ocupan en la región del ADN-T. Los mismos iniciadores se emplearon para iniciar la secuenciación de este fragmento, y diseñar otros internos al inserto, hasta completarlo.

El análisis mediante BLAST reveló que esta secuencia presenta homología con una zona del cromosoma lineal de *A. tumefaciens* y tiene el mismo tamaño (1.319 pb) que el elemento de inserción IS426 (Figura 4.11), siendo la secuencia la misma excepto en cuatro nucleótidos que son diferentes en ambos, lo que se confirmó mediante análisis con el programa CLUSTALW (Figura 4.12).

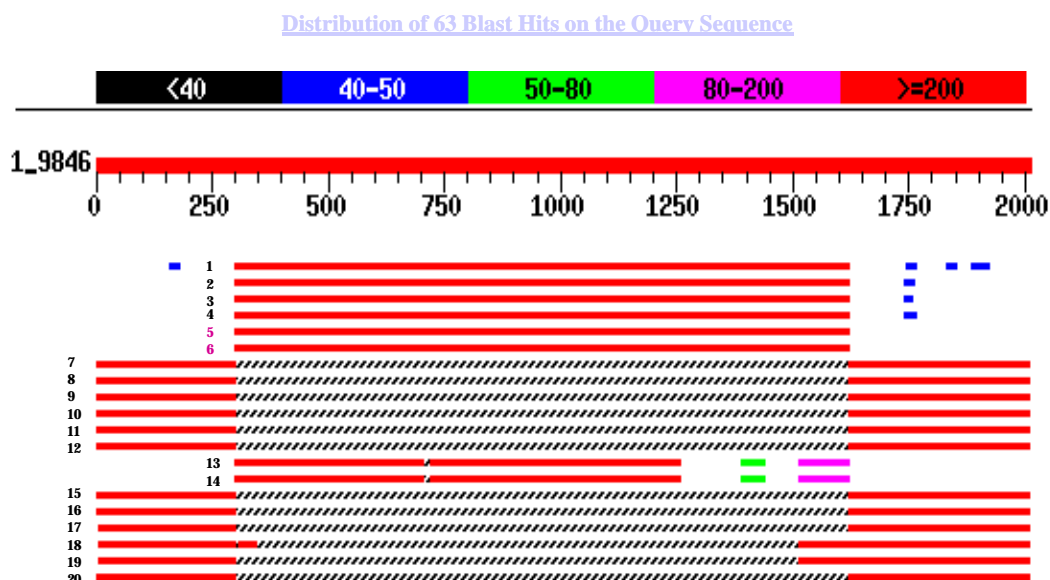


Figura 4.11. Análisis comparativo mediante BLAST de la inserción en el gen *iaaM* con secuencias almacenadas en el GenBank. La gama de colores refleja la homología que presenta la secuencia analizada con cada una de las secuencias. Se observa que la parte central de la secuencia presenta homología con secuencias diferentes a la de los extremos.

Figura 4.12. Análisis comparativo mediante CLUSTALW de la secuencia de la inserción del clon mutante T1, procedente del experimento de inoculación de la cepa C58 en tomate. Se observa que la secuencia es idéntica a la del elemento de inserción IS426 excepto en 4 nucleótidos, señalados en rojo.

```

IS426      GAACTGCCCCCATTTTCGACCGGACAGTCGGCATAAGCAGAAAGGCTCAAGCACAGGCTT
T1         GAACTGCCCCCATTTTCGACCGGACAGTCGGCATAAGCAGAAAGGCTCAAGCACAGGCTT
          *****

IS426      GAGGACAGGCTTATGTCTAACGACTATCGACACGTTGAATTGCTGACGGGTGATGTCTCG
T1         GAGGACAGGCTTATGTCTAACGACTATCGACACGTTGAATTGCTGACGGGTGATGTCTCG
          *****

IS426      CGCAGGCGGTGGACAACCGAGCAAAAGCTGACAATCATTGAGCAGAGTTTTGAACCCGGC
T1         CGCAGGCGGTGGACAACCGAGCAAAAGCTGACAATCATTGAGCAGAGTTTTGAACCCGGC
          *****

IS426      GAGACGGTATCTTCGACCGCTCGCCGTCATGGCGTGGCGCCCAATTTGCTTTATCGGTG
T1         GAGACGGTATCTTCGACCGCTCGCCGTCATGGCGTGGCGCCCAATTTGCTTTATCGGTG
          *****
    
```

Se comprobó que el elemento de inserción situado en el interior de la secuencia del gen *iaaM* afectaba al marco de lectura de la proteína que sintetiza este gen con el análisis mediante el programa Vector NTI 5 (Informax Inc, GB). Este análisis reveló que la pauta de lectura queda interrumpida, por lo que la proteína no puede ser sintetizada (Figura 4.13).

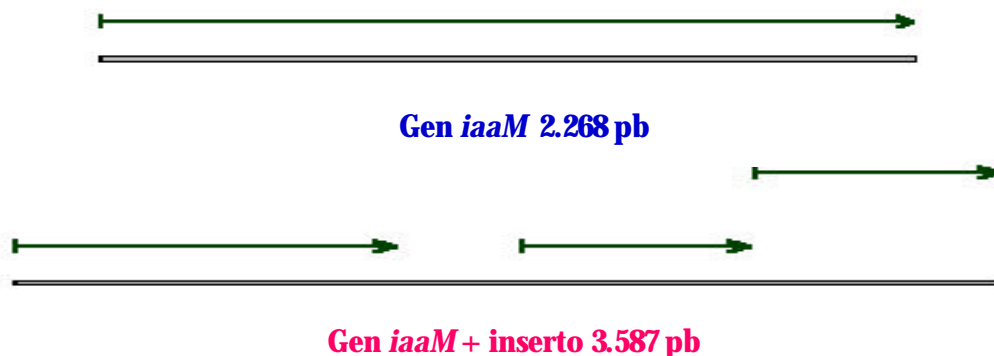


Figura 4.13. ORFs obtenidas con el programa Vector NTI de la secuencia del gen *iaaM* y de la misma secuencia con el inserto secuenciado. Se observa que el producto del gen original queda interrumpido por la presencia de la inserción.

#### 4.4.3 Confirmación de la pérdida del poder patógeno debido a una delección en el gen *virB5*. Experimentos de complementación con los mutantes de C58R *in planta* e *in vitro*.

Se comprobó que los plásmidos obtenidos con la ligación de pPC953 y pBBRM1S5 eran resultantes de la unión de ambos mediante extracción y digestión con el enzima *EcoRI* y comparación de los fragmentos obtenidos mediante visualización en gel de agarosa (Figura 4.14). Estos clones plasmídicos consiguieron complementar el gen mutado ya que las colonias transformadas produjeron tumores en tomate, por lo que se confirmaba la causa de la pérdida del poder patógeno en estos clones (Figura 4.15). Adicionalmente se escogieron otros dos mutantes, uno del experimento *in planta* y otro del experimento *in vitro* (113, aislado de otra planta diferente de la muestra 37, y el clon 22G, del 2º experimento *in vitro* en medio con gentamicina) y tras su transformación con este plásmido se inocularon en tomate. Con ambos clones transformados se obtuvieron tumores, lo que demostraba que en ellos también era el gen *virB5* el que estaba afectado.

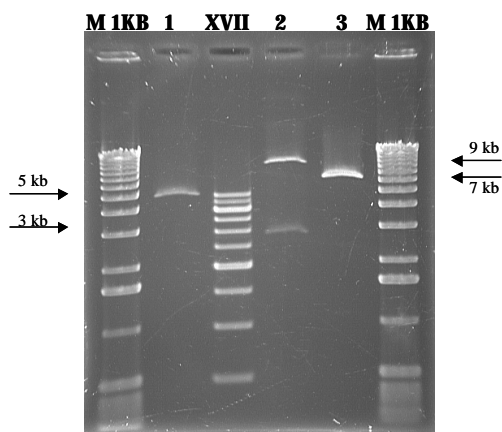


Figura 4.14. Digestión de la ligación de los plásmidos pBBR1MCS5 y pPC953 con el enzima *EcoRI*. Se observa que el producto de la ligación presenta dos cortes frente al único de cada plásmido antes de la ligación. El producto de la misma es la suma de los plásmidos individuales. 1: plásmido pBBR1MCS5; 2: ligación de ambos plásmidos; 3: plásmido pPC953. M 1KB: marcador 1 KB (Life Technologies); XVII: marcador XVII (Boehringer Mannheim).



Figura. 4.15 A). Inoculación en tomate de la cepa mutante 37 obtenida en los experimentos de inoculación con la cepa C58R. No se observa tumor después de un mes de la inoculación. B). Inoculación en tomate del mutante 37 transformado con el plásmido que contiene el gen *virB5*. Se induce la formación de tumores como con la cepa salvaje.

#### 4.4.4 Verificación del cultivo crioconservado de la cepa C58R.

Se llevaron a cabo dos series de inoculaciones en tomate de colonias obtenidas del cultivo crioconservado, una serie con colonias aisladas directamente de este stock y la otra con colonias obtenidas mediante purificaciones sucesivas de una colonia del stock. En las inoculaciones realizadas con 100 colonias provenientes de una previamente purificada, todas produjeron tumores en tomate. Sin embargo, con 100 colonias aisladas del stock sin purificar previamente, aparecieron 13 colonias que no produjeron tumores en plantas de tomate, incluso al ser inoculadas de nuevo. Cuando se volvió a realizar este experimento con otras 100 colonias más no purificadas previamente, el número de colonias no patógenas que se obtuvo fue de 17. Estos resultados demostraron que la cepa C58R o bien había sufrido una mutación antes de ser recibida en el IVIA o desde su utilización en el laboratorio se produjo un cambio a partir del cual se co-cultivaron la cepa C58R patógena y su mutante no patógeno. Por lo tanto estos resultados sugieren que además de la cepa C58R se habría inoculado en los experimentos de inoculación tanto *in planta* como *in vitro* también un mutante, idéntico en todas sus características, excepto por la existencia de una deleción en el gen *virB5* de la región de virulencia que lo convertía en no patógeno. En todo caso, se puede afirmar que se ha caracterizado un mutante procedente de la cepa patógena C58R, del que se conoce la causa de la pérdida del poder patógeno, pero no se puede asegurar que se haya originado en los experimentos de esta memoria.

#### 4.4.5 Análisis de los plásmidos Ti de los mutantes obtenidos.

Los análisis realizados de los plásmidos de los mutantes proporcionaron una información parcial sobre las posibles causas que pueden explicar el cambio de fenotipo que han sufrido, sin embargo se necesitan más pruebas para determinar los cambios moleculares que se han producido en los mismos. En estos análisis preliminares, los resultados obtenidos son los que se comentan a continuación.

##### 4.4.5.1 Perfil de plásmidos mediante geles Eckhardt.

El perfil de plásmidos mediante geles Eckhardt mostró unos resultados inesperados (Figura 4.17). Comparado con el perfil de la cepa IVIA 1.102, sólo uno de los clones que presenta pérdida del poder patógeno (T67), proporcionó un perfil semejante, al presentar un solo plásmido Ti, de igual tamaño que la cepa parental (aproximadamente 120 kb). Los mutantes T32 y T76, con virulencia atenuada, mostraron dos plásmidos. Sus plásmidos Ti coinciden en tamaño con el de la cepa IVIA 1.102, mientras uno mayor, críptico, es igual en ambos. El tamaño de este plásmido críptico es de unas 200 kb, según el cálculo obtenido con el programa Kodak Digital Science 1D y empleando como marcador la cepa C58. Sin embargo, con los clones T22 y T38 los resultados fueron sorprendentes, ya que sólo apareció un plásmido, pero de mayor tamaño que el de la cepa parental. El tamaño del mismo es de unas 300 kb, que resulta ser algo más del doble respecto al plásmido Ti de la cepa IVIA 1.102. Como estos plásmidos de 300 kb recuperaron el poder patógeno con un plásmido de complementación que contiene los genes del ADN-T, se consideró que eran inductores de tumores y, por tanto, plásmidos Ti y no crípticos. Los plásmidos de los mutantes P72 y T1 también presentaron diferencias respecto a la cepa C58, ambos tienen el pTi de igual tamaño que la cepa parental, pero el mayor, críptico, es de tamaño inferior y en el mutante P72 aparece otro plásmido, de pequeño tamaño.

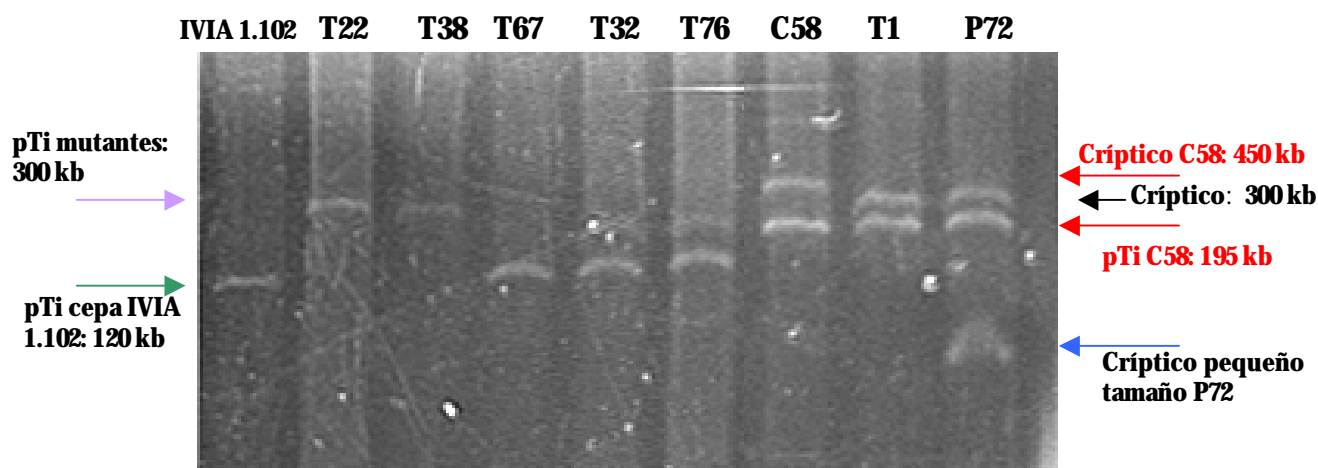


Figura 4.17. Perfil de plásmidos mediante gel Eckhardt modificado con los mutantes obtenidos de las cepas IVIA 1.102 y C58 en huéspedes herbáceos. Se observa que los mutantes T22 y T38 presentan un plásmido de mayor tamaño que la cepa salvaje y el mutante T67. El mutante T32, al igual que el T76, contiene un plásmido críptico además del plásmido Ti, que es de igual tamaño que el de la cepa IVIA 1.102. Los mutantes procedentes de la cepa C58 presentan un pTi de igual tamaño, pero un plásmido críptico menor que el de C58. Además, el mutante P72 presenta otro plásmido más de pequeño tamaño.

#### 4.4.5.2 Análisis mediante sondas de los plásmidos Ti de los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102.

Los resultados obtenidos con las sondas empleadas se muestran en la Figura 4.18. Con la digestión llevada a cabo con el ADN total de los mutantes con el enzima *EcoRI*, la hibridación con la sonda del gen *virD2*, proporciona el mismo patrón de bandas tanto en la cepa salvaje IVIA 1.102 como en los mutantes no patógenos (Fig. 4.18A). El mutante con pérdida de virulencia, T32, da un tamaño de hibridación diferente, lo que indica que existen cambios también en esa zona. Sin embargo, con la sonda del ADN-T no se obtuvo señal de hibridación en ninguno de los mutantes no patógenos (Fig. 4.18B). Estos mismos resultados se obtuvieron también al hibridar la digestión del ADN total con el enzima *HindIII* (Fig. 4.18D y E): no hay diferencias con la sonda del gen *virD2* con los mutantes no patógenos y solo una pequeña diferencia en tamaño con el mutante T32, pero con la del ADN-T no se observa señal de hibridación en los mutantes T22, T38 y T67.

Las hibridaciones del ADN total con la sonda del plásmido Ti de la cepa IVIA 1.102 mostraron un patrón idéntico entre los clones mutantes y la cepa salvaje (Figs. 4.18C y 4.18F), a pesar de haberse observado que la región del ADN-T no daba señal de hibridación. Esta sonda está probablemente contaminada con ADN cromosómico, como se

comprueba al emplearla en la hibridación en un gel de plásmidos Eckhardt (Figura 4.19). Se observa en este gel que hay señal con el ADN de los plásmidos pero también con el cromosoma de las muestras analizadas, posiblemente porque el método de extracción empleado no eliminó totalmente el cromosoma del plásmido. La cepa C58, utilizada como control, no mostró hibridación con el plásmido de la cepa IVIA 1.102.

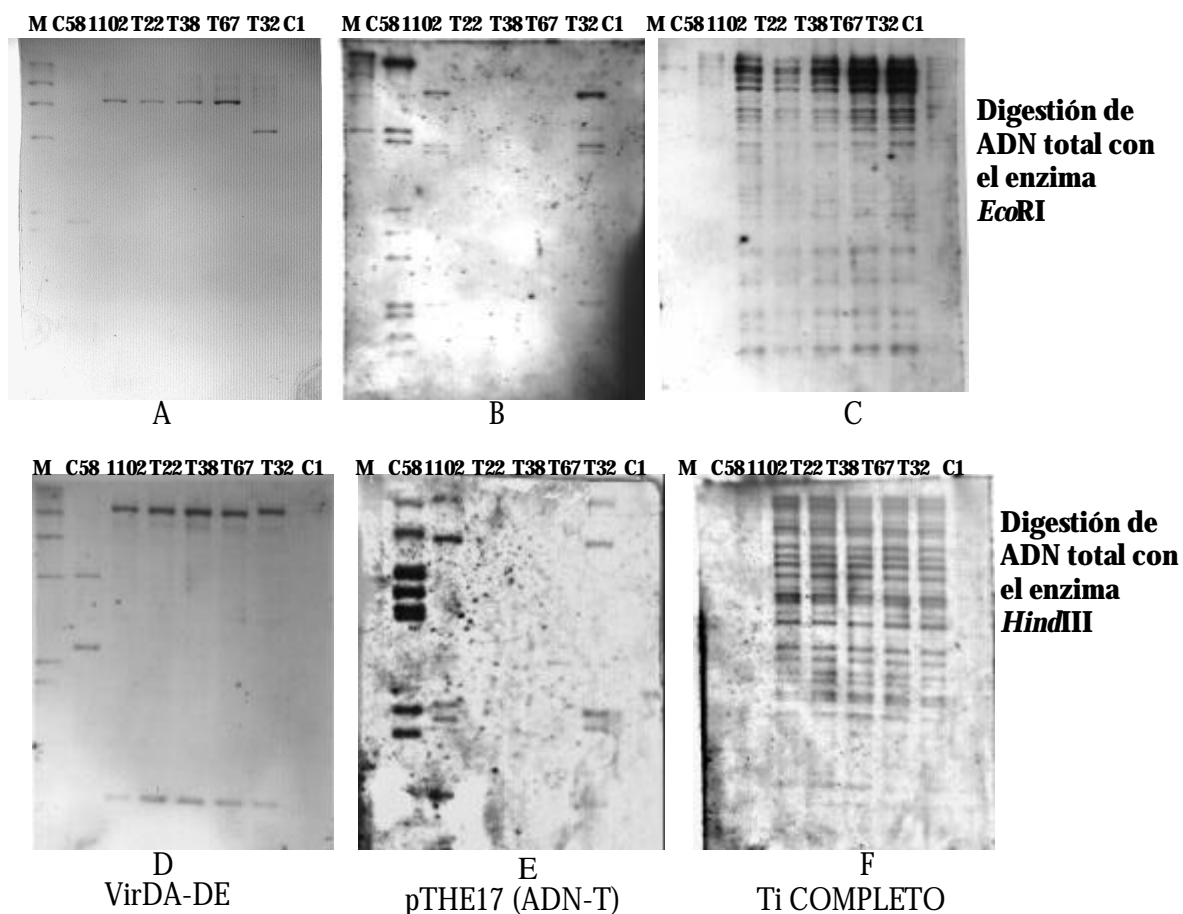


Fig. 4.18. Hibridaciones de distintas sondas con el ADN total de los mutantes obtenidos de la cepa IVIA1.102 digerido con *EcoRI* y *HindIII*. M: marcador  $\lambda$  *HindIII*; C1: control negativo (cepa C58 sin el plásmido Ti). Se observa la semejanza en la hibridación con la sonda VirDA-DE entre la cepa salvaje y los mutantes, excepto el mutante T32 en la digestión con *EcoRI*, y la falta de señal en la cepa C1. Con la sonda del ADN-T no hay hibridación en los mutantes no patógenos, mientras el de menor virulencia presenta el mismo perfil que la cepa parental. Con el Ti entero no hay diferencias entre los mutantes y la cepa salvaje. Sorprendentemente no hay hibridación con la cepa C58 ni con la C58C1.



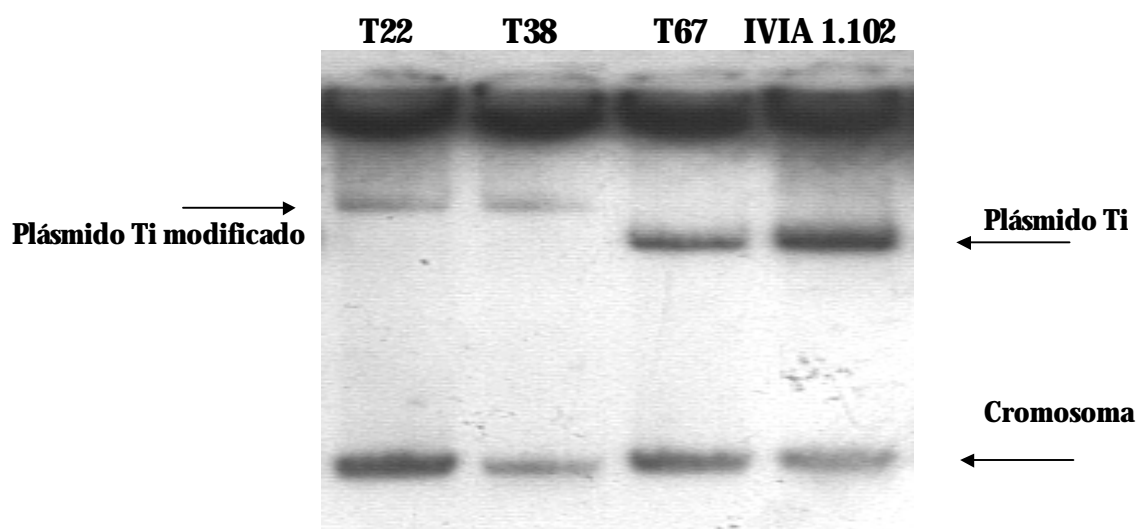


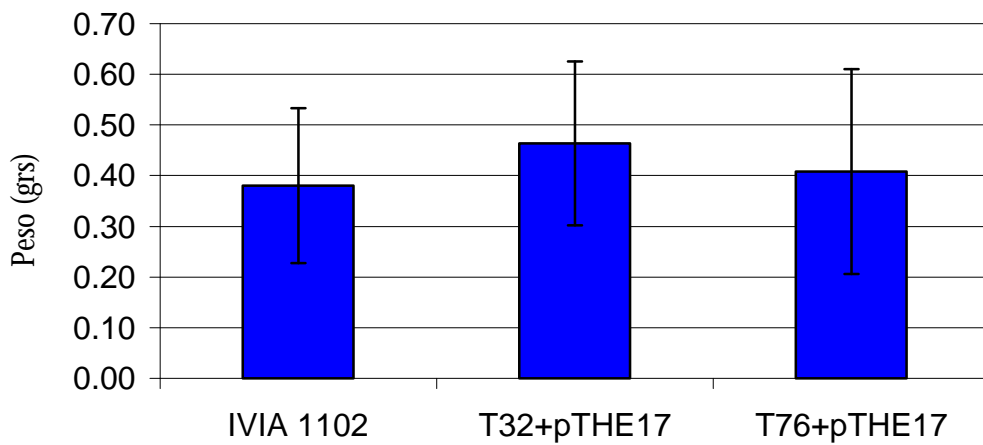
Figura 4.19. Hibridación con la sonda preparada con el plásmido Ti de la cepa IVIA 1.102 sobre los plásmidos de los mutantes obtenidos de esta cepa y separados mediante gel Eckhardt modificado. Se observa que hay hibridación en los plásmidos pero también en el cromosoma de las colonias.

#### 4.4.6 Recuperación de la virulencia de los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102 con el plásmido pTHE17.

Los clones T32 y T76 transformados con el plásmido pTHE17 proporcionaron tumores del mismo tamaño que la cepa parental al ser inoculadas en tomate (Figura 4.16). Los resultados obtenidos en el análisis de varianza indican que no se encuentran diferencias al 1% de significación en el peso entre los tumores inducidos por la cepa parental (IVIA 1102) y los mutantes complementados con pérdida de virulencia, lo que confirma la recuperación del fenotipo de plena virulencia en estos mutantes (Gráfica 4.1)



Figura 4.16. Tumores producidos por los clones T32 y T76 transformados con el plásmido pTHE17. El tamaño de los tumores es semejante a los producidos por la cepa parental IVIA 1.102.



Gráfica 4.1. Gráfico comparativo de los pesos de los tumores producidos por la cepa IVIA 1.102 y los mutantes T32 y T76 transformados con el plásmido pTHE17.

#### 4.4.7 Inoculación de los mutantes transformados con los plásmidos de complementación en los huéspedes de donde proceden las cepas parentales inoculadas.

Con los clones complementados con plásmidos de las zonas presuntamente alteradas, los resultados de las inoculaciones en los huéspedes de donde se obtuvieron las cepas parentales fueron: con las inoculaciones en crisantemo de los mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102 (T22, T38 y T67) no se produjeron tumores, mientras que con los mutantes de virulencia reducida T32 y T76 se obtuvieron tumores de igual tamaño que con la cepa IVIA 1.102. En las inoculaciones en cerezo de los mutantes procedentes de las cepas C58 y C58R, el resultado fue negativo con el clon P72 transformado con los diversos plásmidos, positivo con T1 transformado con el plásmido pTHE17, y también positivo con los clones 37 y 22 procedentes de la cepa C58R transformadas con el plásmido pSM226.

## 4.5 DISCUSIÓN

Los plásmidos conteniendo distintas zonas de la región de virulencia y del ADN-T se han empleado con éxito en la identificación preliminar de las áreas afectadas en la mayoría de los mutantes analizados. Sólo uno de los mutantes (P72) no recuperó el poder patógeno con ninguno de los plásmidos que poseen distintas zonas del plásmido Ti, lo que parece indicar que posiblemente la causa de su fenotipo no patógeno se deba a cambios en genes del cromosoma. Respecto a los mutantes obtenidos en los experimentos de inoculación del huésped GF677 con la cepa resistente al antibiótico gentamicina (cepa C58R) y en los experimentos *in vitro* mediante siembras sucesivas, se ha comprobado que son similares entre sí, y coinciden con un mutante preexistente en la suspensión de crioconservación de la cepa inoculada. Por ello, no es sorprendente que todas las colonias no patógenas analizadas sean idénticas, ya que podrían tratarse de clones del mutante. Las características tanto bioquímicas como moleculares que presentan, comparadas con las de la cepa patógena C58R son idénticas en todos los análisis realizados.

Como resultado de este trabajo, se ha conseguido identificar la causa que ha provocado la pérdida de patogenicidad, aunque se desconoce su origen. El sistema utilizado para identificar el gen afectado o al menos delimitar el área afectada dentro del plásmido Ti mediante PCR-RFLP no fue efectiva, por lo que fue necesaria la secuenciación de todo el operón *virB*, identificado previamente en los análisis de complementación como el área afectada. La comparación con la secuencia de la región *vir* del plásmido Ti de la cepa parental permitió delimitar en un gen, *virB5*, la posible causa de la pérdida del poder patógeno, lo cual se confirmó mediante complementación con un plásmido que contenía este mismo gen. Las colonias transformadas con este gen consiguieron recuperar la capacidad de producir tumores. Este mutante presenta una mutación semejante a las observadas en los experimentos del grupo del profesor Dion (Bélanger *et al.*, 1995), al tratarse de una mutación puntual en uno de los genes de la región *vir*.

La cepa C58R se recibió en el año 1994 del laboratorio del Dr. Farrand, de la Universidad de Urbana en Chicago, (EE.UU.), y desde entonces se ha mantenido en crioconservación en nuestro laboratorio. Los datos de que se dispone es que en EEUU no se había observado la aparición de un mutante de esta cepa, pero tampoco se habían

llevado a cabo experimentos que pudieran mostrar que este hecho hubiera ocurrido, por lo que no se puede descartar que existiera esta mezcla de bacterias en el envío recibido.

El mantenimiento durante varios años en la colección de bacterias en condiciones de criopreservación podría ser una causa que provocaría la aparición de mutantes no patógenos, como se señala en el trabajo de Bashan y Okon, (1986) comentado en el Cap. 3 de esta memoria, por lo que podría ser también otro de los orígenes del mutante.

Los resultados obtenidos con los mutantes procedentes de los experimentos de inoculación en huéspedes herbáceos muestran que en casi todos ellos (6 de 7 mutantes obtenidos), los ensayos de complementación han conseguido identificar el área afectada, siendo en todos ellos el ADN-T. Respecto a los mutantes procedentes de la cepa C58, en uno de ellos (P72) parece que los posibles cambios genéticos afectarían al cromosoma, ya que la introducción de genes del plásmido Ti no modifica la falta de capacidad de producir tumores. El análisis del plásmido Ti y su cromosoma por separado permitirán identificar si efectivamente es a nivel cromosómico donde reside el problema. Sin embargo, su contenido en plásmidos presenta diferencias respecto a la cepa parental, ya que mientras el pTi es del mismo tamaño, el plásmido críptico es menor que el de C58, y además aparece otro plásmido de mucho menor tamaño. Este plásmido críptico, de aproximadamente 300 kb, también aparece en el mutante T1, procedente de un tumor inducido en otra planta huésped diferente, por lo que se observa que estos mutantes han sufrido cambios que afectan a otras partes de su genoma, aunque se desconoce la influencia que estas diferencias en el contenido en plásmidos pueden tener sobre el fenotipo de virulencia atenuada. Con este mutante T1, se observa pérdida de patogenicidad al inocularlo en el huésped tomate, pero se comprueba que sigue produciendo tumores tipo salvaje en el huésped cerezo, del cual se aisló la cepa C58, por lo que este mutante presenta una reducción del rango de huéspedes, lo que entra en la definición de pérdida de virulencia. La causa de este cambio de fenotipo se ha identificado en la región del ADN-T mediante amplificaciones de grandes fragmentos de ADN (2-3 kb) que de forma solapante mapean los genes responsables del poder patógeno. En este mutante se observa la presencia de una inserción en la zona central del gen *iaaM* de un tamaño de 1.319 pb.

La secuenciación y el análisis de la secuencia obtenida mediante comparaciones con secuencias almacenadas en el GenBank ha permitido la identificación de este inserto, que

presenta una alta homología de secuencia con el elemento de inserción IS426. Como se ha descrito anteriormente (Otten *et al.*, 1992) se han encontrado secuencias de inserción cercanas a los genes *iaa* en varias cepas de *Agrobacterium*, por lo que este resultado se encontraría entre las causas de pérdida del poder patógeno (y en forma más amplia, de variabilidad genética) por el mecanismo de transposición. Además, en estudios en los que se provocaron mutaciones en los genes *iaaM* e *iaaH* en distintas cepas de *A. tumefaciens* se observó que se producían tumores de tipo salvaje en diversas especies de *Nicotiana* (Ooms *et al.*, 1981; Binns *et al.*, 1982), por lo que a pesar de no producirse la proteína para la producción del á. indol-acético, la capacidad de producir tumores permanece, aunque sí se producía una reducción del rango de huéspedes.

En los mutantes procedentes de la inoculación de la cepa IVIA 1.102 podrían ser varias las causas que han llevado a la pérdida del poder patógeno. Por un lado, los dos mutantes con pérdida de virulencia (T32, T76), procedentes del mismo tumor, comparten las mismas características genotípicas y fenotípicas, con la excepción de la formación de raíces adventicias más abundantes por parte de uno de ellos. Su contenido en plásmidos es idéntico, y los análisis moleculares realizados son coincidentes, sin embargo difieren de la cepa salvaje IVIA 1.102 en la posesión de un plásmido críptico de mayor tamaño que el pTi. En estos mutantes, es la zona del ADN-T la que parece afectada, ya que la introducción de un plásmido conteniendo estos genes produce la recuperación de la virulencia al mismo nivel que la cepa salvaje. Sin embargo, también la región *vir* parece haber sufrido algún tipo de cambios, ya que se observan diferencias de tamaño en la banda que hibrida con la sonda de 338 pb del gen *virD2* en uno de los mutantes. Es necesario un estudio más amplio de los cambios producidos para conocer todas las causas que han producido este fenotipo poco virulento y comprobar si en el otro mutante (T76) también se han producido los mismos cambios.

Los mutantes obtenidos con pérdida del poder patógeno en el segundo experimento con la cepa IVIA 1.102 (T22, T38 y T67) recuperan el poder patógeno en tomate, la planta de donde se han originado, mediante un plásmido que contiene los genes del ADN-T. En cambio, cuando se inoculan en el huésped de donde procede la cepa salvaje, crisantemo, no son capaces de producir tumores. Esto no es sorprendente, ya que

en el ADN-T se encuentran genes que intervienen en el rango de huéspedes, y los genes introducidos proceden de un plásmido Ti diferente al de la cepa IVIA 1.102.

Sin embargo, es a nivel del contenido en plásmidos donde encontramos las mayores diferencias respecto a la cepa parental: mientras uno de los mutantes presenta un plásmido del mismo tamaño que la cepa parental (T67), los otros dos poseen un plásmido de aproximadamente el doble de tamaño. El hecho de poder complementar estas colonias con plásmidos que contienen la región del ADN-T indica que poseen toda la región de virulencia intacta, y por lo tanto se trata de un plásmido Ti modificado. Sin embargo, todos los análisis realizados mediante amplificaciones de zonas del ADN-T y las hibridaciones con sondas de esa misma zona nos indican que estos mutantes han perdido toda esta región, y que esa debe ser la causa de la pérdida de patogenicidad. En condiciones normales, el análisis de estas colonias mediante iniciadores del ADN-T y perfil de plásmidos harían pensar que se trata de cepas no patógenas con un plásmido críptico, de gran tamaño. La formación de tumores después de introducir genes del ADN-T nos indica que el plásmido posee toda la maquinaria de genes de virulencia y transferencia del ADN-T, como se comprueba, además, en los análisis mediante iniciadores de la región de virulencia.

Estos mutantes nos plantean nuevas cuestiones: sus plásmidos podrían mostrar que estamos frente a un fenómeno de formación de un megaplásmido, como se podrían producir en la naturaleza de forma natural. Se contaría con un plásmido intermediario, del mutante T67, con el plásmido de igual tamaño que la cepa salvaje y que presenta cambios similares a los mutantes T22 y T38, a partir del cual se formaría el plásmido de mayor tamaño. Si esta hipótesis es cierta, se podría haber formado mediante una duplicación y formación de un cointegrado, o mediante recombinaciones con zonas de los cromosomas, y/o con plásmidos de otras cepas. La recuperación del poder patógeno se produciría porque los genes de virulencia se encuentran en el plásmido o se encuentran duplicados en el cromosoma. Tanto esta hipótesis como la de la recombinación con posibles regiones homólogas del cromosoma podría apoyarse en el hecho descrito recientemente de la presencia en el cromosoma de *Agrobacterium* de genes similares en secuencia a los de la región *vir*, lo que permitiría esa recombinación y la formación de plásmidos de mayor tamaño (Leloup *et al.*, 2002), así como reordenaciones a gran escala entre plásmidos y

cromosoma observados en cepas del género *Rhizobium* (Sullivan y Ronson 1998; Mavingui *et al.*, 2002). El hecho de que se obtengan idénticos perfiles de hibridación con la sonda de la región *vir* entre la cepa salvaje y el mutante T67, que posee un plásmido de igual tamaño, pero también con los mutantes T22 y T38, que presentan un plásmido de tamaño mayor, no deja de resultar sorprendente, aunque al ser la sonda de pequeño tamaño es probable que no sea adecuada para poner de manifiesto cambios a nivel de grandes regiones del plásmido. También es inesperada la falta de hibridación del clon T67 con la sonda del ADN-T, al igual que los mutantes T22 y T38, ya que parece indicar que los plásmidos presentan una composición semejante, a pesar de la diferencia de tamaño, ya que se esperaría que dieran unos perfiles de hibridación distintos debido a esta diferencia.

La semejanza en los perfiles obtenidos con la sonda del plásmido Ti completo, aunque pueda tener algo de cromosoma en la misma, como parece demostrarse con la hibridación del gel Eckhardt, no parece lógica, ya que con la sonda del ADN-T no se produce hibridación con los mutantes, y esta falta de hibridación debería observarse también con el ADN total de las muestras con la sonda del plásmido Ti. El empleo de una sonda consistente en el plásmido Ti totalmente purificado de cromosoma proporcionaría más información sobre la composición de los plásmidos de las colonias mutantes. El análisis exhaustivo con sondas de distintas zonas del plásmido Ti permitiría averiguar qué zonas presentan diferencias entre el plásmido Ti de la cepa IVIA 1.102 y los plásmidos de los mutantes, además de comprobar si hay zonas repetidas y dónde se encuentran. Los perfiles obtenidos en los análisis realizados indican que existe una gran semejanza en la secuencia de los plásmidos entre los tres mutantes, mientras que sí se observan diferencias en la región del ADN-T respecto a la cepa salvaje IVIA 1.102.

La aparición de otros plásmidos de diferente tamaño en casi todos los mutantes que se han analizado en este trabajo muestra la facilidad de la variabilidad genética en *Agrobacterium*, lo que puede conducir a la formación de recombinantes que podrían dar lugar a nuevos fenotipos. Los resultados obtenidos en este trabajo parecen probar estas recombinaciones. El análisis de las modificaciones genéticas observadas en los mutantes obtenidos en este trabajo muestran gran variabilidad en las causas de pérdida de patogenicidad, teniendo en cuenta el pequeño número de mutantes evaluados. Esto sugiere que si se ampliara el estudio a otras características fenotípicas y genotípicas,

además del fenotipo patógeno/no patógeno, posiblemente la variación que presentarían entre ellas sería mayor.



## 4.6. CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado un mutante no patógeno de la cepa C58R. La pérdida del poder patógeno se debe a una mutación puntual que ha producido una delección de un nucleótido en la posición 8.882 del gen *virB5* en el plásmido Ti. Esta delección impide la formación de la proteína VirB5, esencial para la patogénesis de la bacteria.
2. Se ha caracterizado un mutante procedente de la cepa C58, denominado T1, obtenido en un tumor producido en tomate. Este mutante presenta pérdida de patogenicidad al inocularse en tomate, pero sí produce tumores de tipo salvaje en el huésped de donde se aisló la cepa parental, cerezo, lo que indica que se ha producido una reducción del rango de huéspedes. La causa ha sido la aparición de un elemento de inserción (IS426) en el gen *iaaM* del ADN-T, en la posición 17.760, que también impide la formación de la proteína correspondiente.
3. a) Se ha realizado una caracterización preliminar de las causas que han provocado la pérdida del poder patógeno en tres mutantes (T22, T38 y T67) procedentes de la cepa IVIA 1.102 aislados de un tumor de tomate. Todos recuperan el fenotipo patógeno en este huésped al complementar con genes de la región del ADN-T. En dos de ellos se observa la presencia un plásmido de mayor tamaño que el pTi de la cepa salvaje. En el tercer mutante, el plásmido no presenta diferencias de tamaño apreciables.  
b) Los mutantes no presentan homología con sondas del ADN-T, lo que indicaría la falta de esos genes, lo que se confirma mediante análisis de amplificación con diversos iniciadores de esa zona.  
c) El plásmido Ti del mutante T67, que presenta el mismo tamaño que el de la cepa salvaje IVIA 1.102, posee características semejantes a los mutantes con el plásmido de mayor tamaño en lo que respecta a la falta de amplificación de la zona del ADN-T, en los perfiles de hibridación con las distintas sondas empleadas y en los patrones de bandas en el análisis de RAPDs con el iniciador OPE-7.

- d) Todos los plásmidos de los clones no patógenos presentan el mismo perfil de hibridación con sondas de la región *vir*, así como el mismo comportamiento con los distintos iniciadores ensayados de esa zona.
  - e) Todos estos mutantes recuperan el poder patógeno mediante la introducción de genes de la zona del ADN-T, lo que demuestra que la maquinaria *vir* es funcional.
4. Se ha realizado un análisis preliminar de las causas que han provocado la pérdida de virulencia en dos mutantes (T32, T76) procedentes de un tumor de tomate inoculado con la cepa IVIA 1.102. Estos mutantes deben de estar afectados en la región del ADN-T, ya que plásmidos que contienen esos genes provocan la recuperación de la virulencia a sus niveles normales. Sin embargo, se observan diferencias también en la región *vir* en uno de ellos, por lo que no habría que excluir la actuación conjunta de varias causas sobre ese fenotipo poco virulento.
  5. El análisis del contenido en plásmidos que poseen todos los mutantes aparecidos en este trabajo muestran que han sufrido cambios, ya sea a nivel del tamaño de los mismos, como en el número que contienen, o ambos casos a la vez, respecto a las respectivas cepas parentales. Solo uno de los mutantes (T67), presenta el mismo plásmido y del mismo tamaño que la cepa de la que procede.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

La enfermedad de los tumores en cuello y raíces (CROWN GALL), producida por la bacteria *A. tumefaciens*, ha sido estudiada desde muy diversos enfoques, tanto fisiológicos, como moleculares, epidemiológicos, biotecnológicos, etc. y ha promovido la realización de distintos trabajos con vistas a reducir las pérdidas ocasionadas por la enfermedad y controlar su expansión (termoterapia, solarización, control biológico con otros microorganismos...) (New y Kerr, 1972; Schroth y Moller, 1976; Moore y Allen, 1986; Ophel *et al.*, 1990; Canfield *et al.*, 1992; Vicedo *et al.*, 1993; Raio *et al.*, 1994). En otra línea, se ha aprovechado la compleja maquinaria de transferencia genética para introducir mejoras en los vegetales de forma rápida eliminando, incluso, las barreras entre especies y reinos (Melcher y Hooykas, 1987; Kado, 1991; Winans, 1992; Hooykas y Beijersberger, 1994; Hooykaas y Schilperoort, 1992; Sheng y Citovsky, 1996; Christie, 1997; Kunik *et al.* 2001).

Sin embargo, la dinámica de las poblaciones de *Agrobacterium* en su hábitat natural (suelo) así como en los nichos ecológicos que coloniza e invade (raíces, cuello de las plantas) ha sido estudiada a un nivel más elemental, y solo se han constatado algunos hechos sorprendentes, entre ellos, el predominio de las poblaciones de cepas no patógenas frente a las patógenas en los nichos (tumores) donde, teóricamente, estaría favorecida la presencia de cepas productoras de tumores (Kerr, 1969; Schroth, 1971; Michel *et al.*, 1990; Canfield y Moore, 1991). También ha sido investigada la relación entre tipos de plásmidos inductores de tumores y el fondo cromosómico en el que se encuentran, o los intercambios genéticos entre plásmidos de distintas cepas, pero no la evolución posterior de los mismos (Otten *et al.*, 1992; Ponsonnet y Nesme, 1994; Pionnat *et al.*, 1999).

Un aspecto que ha sido estudiado en algunos trabajos, y que quizá está relacionado con el predominio de poblaciones no patógenas frente a las patógenas, es el de la pérdida de la capacidad de producir la enfermedad (patogenicidad) en aislados obtenidos de los tumores provocados por cepas patógenas. Este sería, en teoría, un ambiente donde parece que habría mayor ventaja selectiva para estas cepas (Canfield y Moore, 1991; Bélanger *et al.*, 1993, 1995; Moore y Canfield, 1996) dada por la formación de las opinas. Dado que las opinas están producidas en el tejido tumoral por las propias células vegetales, debido a la inserción de genes transferidos del plásmido Ti que codifican su síntesis, y que son

catabolizadas por las bacterias que las han producido, debería implicar una ventaja nutricional para las cepas de *Agrobacterium* patógenas frente a otros microorganismos. Esta ventaja se vería incrementada por dos efectos adicionales que producen estas sustancias: a) favorecen la transferencia conjugativa del plásmido Ti entre bacterias patógenas y receptoras, con lo cual se extendería el número de bacterias poseedoras del plásmido, y, por tanto, la población de cepas patógenas, y b) ser las opinas quimioatrayentes de cepas que poseen el plásmido, que se acercarían al tejido tumoral y favorecerían la recombinación genética entre cepas, dando lugar a nuevos tipos de plásmidos (Petit *et al.*, 1978; Ellis *et al.*, 1982; 1984).

Sin embargo, todas estas ventajas no parecen traducirse en el resultado esperado, un aumento del número de colonias patógenas frente a las no patógenas. Como se ha observado en esta memoria, incluso en tumores producidos en condiciones “controladas”, donde solo se esperaría encontrar clones procedentes de la cepa inoculada, se han encontrado en mayor número cepas no patógenas de *Agrobacterium* sp.

En este trabajo, por tanto, se ha pretendido ampliar los estudios anteriores sobre la aparición de cepas no patógenas a partir de colonias patógenas, tanto en el número de huéspedes utilizados como en el de cepas empleadas, y con ello, poder conocer y confirmar: a) si hay una interacción específica entre una cepa dada y los huéspedes a los que coloniza; b) si hay circunstancias que favorezcan en mayor medida esta pérdida del fenotipo; c) si esta pérdida se puede producir en ausencia de cualquier sustancia que la pudiera favorecer o producir, como ocurre en los tumores de las plantas. La caracterización de los mutantes que se aislaran podría proporcionar la comprobación de las hipótesis que se pudieran plantear. Así, en el futuro, se podrían intentar provocar esas condiciones y con ello conseguir otro sistema eficaz de control de la enfermedad.

Sin embargo, los resultados que se han obtenido en este trabajo muestran la presencia, en tumores provocados por diversas cepas en distintos huéspedes, de:

- Distintos tipos de colonias no patógenas en gran número frente a colonias patógenas, sin relación aparente entre ellas.

- clones mutantes que presentan atenuación de la virulencia y pérdida de poder patógeno, ambos en muy escaso número. La disminución de la virulencia se refleja en una producción de tumores de menor tamaño, pero también en la reducción del rango de huéspedes.

El aislamiento de agrobacterias no patógenas en gran número, en ambientes donde se esperaría encontrar mayoritariamente cepas patógenas (suelos con incidencia de aparición de la enfermedad), ha sido comprobado en trabajos recientes (Krimi *et al.*, 2002), y por ello los resultados obtenidos que se han comentado anteriormente no son del todo sorprendentes. Además, las causas de pérdida del poder patógeno/virulencia observados en los trabajos realizados para estudiar la pérdida de patogenicidad por parte de cepas patógenas se deben mayoritariamente a cambios en el plásmido Ti, y en la caracterización de los mutantes aislados en esta memoria, el tipo de cambios que se han encontrado coincide con las descritas: mutaciones puntuales, elementos de inserción (Fortin *et al.*, 1992; Bélanger *et al.*, 1995).

El empleo de un sistema de identificación basado en la amplificación inespecífica de fragmentos del genoma de las bacterias (RAPDs), ha permitido la distinción entre las colonias aisladas, de forma que los resultados iniciales en cuanto a número de mutantes no patógenos aparecidos en los diferentes experimentos de inoculación se ha comprobado que no siempre reflejaban la ocurrencia de mutaciones de las cepas inoculadas. Teniendo en cuenta que en dos experimentos de este trabajo se han aislado colonias que presentaban la misma resistencia a antibióticos que las cepas previamente inoculadas, pero que no eran colonias de *Agrobacterium*, es posible que haya ocurrido algo similar en otros trabajos en los que se ha observado la presencia de cepas no patógenas en tumores. El sistema desarrollado en esta memoria constituye, pues, una herramienta muy valiosa para confirmar la identidad de aislados de *A. tumefaciens* en experimentos que requieran el análisis de un número elevado de clones en poco tiempo y un alto grado de fiabilidad.

En las condiciones empleadas, con las cepas utilizadas y los huéspedes inoculados, se ha observado una frecuencia muy baja de aparición de mutantes no patogénicos o poco virulentos, en comparación con otros trabajos realizados sobre este tema (Canfield y Moore, 1991; Bélanger *et al.*, 1993; 1995). El huésped manzano, del que se aislaron en dichos trabajos un gran número de colonias no patógenas, podría explicar esas diferencias,

al ser una especie que presenta características especiales por la dificultad para aislar este tipo de colonias, aunque en algún otro huésped como el arándano también se ha observado esta dificultad (Moore y Canfield, 1996).

Es difícil explicar la procedencia de las cepas no patógenas aisladas de tumores que no derivan de las inoculadas. La explicación más probable es que estas bacterias ya estuvieran presentes en las plantas adquiridas en el vivero, o que provengan del agua de riego, o de otras fuentes (Faivre-Amiot, 1984) y que hubieran accedido al tumor a través de las heridas que sirvieron de entrada al patógeno. También se desconoce si presentan ventajas selectivas frente a las patógenas.

Los siete mutantes obtenidos en esta memoria provienen de aislamientos de tumores en huéspedes herbáceos, y no se ha conseguido aislar ninguno procedente de huéspedes leñosos habituales de este patógeno. Los únicos mutantes obtenidos a partir de tumores producidos en uno de los huéspedes habituales (un híbrido melocotonero x almendro, GF677) se ha demostrado que procedían de un clon que estaba presente en el inóculo inicial de una cepa patógena que se empleó para producir los tumores. Este mutante también se consiguió aislar a partir de un experimento de siembra sucesiva en un medio general. En la caracterización de este mutante, se ha confirmado que la causa de la pérdida de patogenicidad era una mutación puntual en un gen de la región *vir*, pero desconocemos las causas que han podido provocarla, ya que podría haberse originado por las manipulaciones genéticas en su plásmido Ti antes de ser enviada a nuestro laboratorio (Von Bodman *et al.*, 1992).

Estos siete mutantes provienen de dos cepas, C58 e IVIA 1.102, y presentan, en su mayoría, modificaciones en el plásmido Ti que, además, se concentran fundamentalmente en la región del ADN-T.

De la cepa C58 se han aislado dos mutantes. Uno de ellos (P72) no recupera el poder patógeno en experimentos de complementación con genes del plásmido Ti, lo que sugiere que los cambios sufridos afectan a genes cromosómicos. En el otro mutante estudiado (T1), ha sido la inserción en uno de los oncogenes del ADN-T de un elemento de inserción, la causa de la atenuación de la virulencia, en forma de disminución del rango de huéspedes. Pero ambos mutantes presentan un contenido en plásmidos diferente al de la cepa parental, ya que además del plásmido Ti, el mutante P72 presenta un plásmido

críptico de menor tamaño que el críptico de C58 y otro de tamaño inferior al pTi, mientras el mutante T1 contiene un plásmido críptico de igual tamaño que el del mutante P72 pero no presenta ninguno de pequeño tamaño.

De los cinco mutantes procedentes de la cepa IVIA 1.102 todos recuperan el poder patógeno o el nivel de virulencia con genes de la región del ADN-T. En cuatro de ellos se observan diferencias en el número o tamaño de los plásmidos que contienen respecto a la cepa parental, mientras uno de ellos contiene un pTi del mismo tamaño. Las posibles causas que han provocado la pérdida de poder patógeno podrían ser semejantes a las que se ha comprobado que proporcionan reordenamientos a gran escala en el genoma de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* y de otras familias: mediante fusión de replicones y escisiones promovidos principalmente por elementos de inserción (Flores *et al.*, 1988; Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998). Es posible, por tanto, que el fenómeno de pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium* pueda ser debido a reorganizaciones genómicas además de a mutaciones puntuales e inserciones de elementos transponibles.

En estos trabajos se han documentado cambios en el genoma de bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, que se habían postulado previamente, como la recombinación entre plásmidos y cromosoma. Aunque no se conocen bien los orígenes y la dinámica de la formación de estados genómicos alternativos de las bacterias y sus consecuencias biológicas, se ha demostrado la formación de cointegrados entre distintos plásmidos presentes en una cepa y el cromosoma que contiene, dando lugar a diferentes reorganizaciones y posiblemente a diferencias fenotípicas que podrían dar lugar a ventajas adaptativas (Mavingui *et al.*, 2002). Además, estas nuevas estructuras genómicas parecen ser inestables, ya que pueden revertir al estado original, apareciendo de nuevo cepas con plásmidos de tamaño similar a los plásmidos presentes en la cepa parental.

Así pues, no es extraño que la mayoría de los mutantes obtenidos en esta memoria presenten diferencias a nivel de contenido en plásmidos, ya sea en número como en tamaño. Asimismo, las pequeñas diferencias en los perfiles de bandas obtenidos con uno de los iniciadores de RAPDs (OPE-7) con los mutantes T22, T38 y T67 podrían ser provocados por reordenaciones que afectaran al cromosoma de estas cepas, debido a estos fenómenos.



Este estudio del contenido en plásmidos de los mutantes obtenidos con las cepas C58 e IVIA 1.102 se ha abordado como consecuencia de los resultados obtenidos en su caracterización, por lo que también sería interesante estudiar el contenido en plásmidos de todas las colonias patógenas y no patógenas aisladas, y observar las variaciones que presentan. Este es un fenómeno observado en seis de los siete mutantes obtenidos, lo cual parece indicar que es algo muy común.

¿Tenemos quizá la prueba de la formación de un nuevo plásmido a partir de uno intermediario? Conocer la composición de estos plásmidos nos permitiría saber qué mecanismos han podido dar lugar a su formación, y conocer mejor cómo se produce la evolución de plásmidos en *Agrobacterium*. Si estas reorganizaciones son reversibles, como se ha comprobado, ¿se producirá un intercambio entre ambos estados fenotípicos de forma continuada?. Las cepas no patógenas aparecidas en gran número y de las que se desconoce su origen, ¿fueron anteriormente patógenas? ¿Podrían ser en realidad las mismas que se han inoculado y que han sufrido reorganizaciones que les han dado ventajas frente a las patógenas, que esos cambios incluyeran la pérdida de patogenicidad y que afectaran de tal manera al genoma que producirían en el análisis mediante RAPDs un patrón de bandas diferente?. Quizá el emplear diferentes pruebas de análisis molecular y ver si con todas ellas los resultados son distintos o hay semejanzas, permitiría obtener una respuesta.

¿Cómo se produce la evolución en las poblaciones de *Agrobacterium* respecto al carácter patógeno/no patógeno?. Todas estas cuestiones que surgen a partir de los datos obtenidos en nuestro trabajo nos pueden indicar hacia dónde dirigir futuros estudios en el campo de la dinámica de poblaciones, evolución fenotípica del carácter patógeno/no patógeno y evolución del genoma en poblaciones de *Agrobacterium*.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

- 1- Se ha puesto a punto un sistema de identificación de cepas de *Agrobacterium* sp. mediante la amplificación al azar con iniciadores inespecíficos (RAPDs) que facilita la discriminación de cepas y permite, comparando los patrones obtenidos con los de una cepa determinada, confirmar la identidad de colonias tipo *Agrobacterium*.
- 2- El sistema se puede emplear tanto con ADN purificado como con suspensiones bacterianas, que pueden mantenerse tanto en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) como en frío ( $8^{\circ}\text{C}$ ), sin mostrar alteración en los resultados. Se ha confirmado su validez en diversos experimentos de inoculación con distintas cepas y huéspedes.
- 3- Los experimentos de inoculación con la cepa C58R, marcada con un plásmido con resistencia a un antibiótico, proporcionaron un elevado número de colonias que presentaron pérdida del poder patógeno (18%). Sin embargo, se ha demostrado que estos mutantes provenían de una mezcla preexistente en la suspensión crioconservada, lo que también se ha puesto de manifiesto en experimentos de siembras sucesivas en un medio general.
- 4- La caracterización molecular de uno de estos mutantes presentes en los cultivos de C58R, indica que la pérdida del poder patógeno es debida a una mutación puntual que ha producido una deleción de un nucleótido en la posición 8.882 del gen *virB5* en el plásmido Ti.
- 5- Utilizando dos cepas de *A. tumefaciens*, no se observó la aparición de mutantes no patógenos en siembras sucesivas, a diferencia de lo que ocurre en otros modelos bacterianos.
- 6- No se ha conseguido aislar colonias mutantes con fenotipo no patógeno en las 1.619 colonias procedentes de aislamientos de los tumores causados por dos cepas de *A. tumefaciens* inoculadas en 10 huéspedes leñosos habituales de la bacteria. Las colonias tipo *Agrobacterium* no patógenas aisladas mostraron distinto perfil de

- RAPDs que los de las cepas previamente inoculadas, lo que parece demostrar que no proceden de las cepas parentales.
- 7- Se han conseguido aislar 7 mutantes de 4.000 colonias analizadas en los experimentos de inoculación de cinco cepas patógenas en dos huéspedes herbáceos, lo que representa un porcentaje bajo de aparición de este fenómeno (0.18%). De los siete mutantes aislados, tres presentaron pérdida parcial de virulencia. Los otros cuatro casos presentaron pérdida total de virulencia.
  - 8- Se ha caracterizado un mutante procedente de la cepa C58, denominado T1, obtenido en un tumor producido en tomate. Este mutante presenta pérdida de virulencia por reducción del rango de huéspedes. La causa ha sido la aparición de un elemento de inserción (IS426) en el gen *iaaM* del ADN-T, en la posición 17.760, que impide la formación de la proteína correspondiente.
  - 9- Se ha realizado un análisis preliminar de las causas que han provocado la pérdida de virulencia en dos mutantes (T32, T76) procedentes de un tumor de tomate inoculado con la cepa IVIA 1.102. Estos mutantes deben de estar afectados en la región del ADN-T, ya que la complementación con plásmidos que contienen esos genes provocan la recuperación de la virulencia a sus niveles normales. Sin embargo, se observan diferencias también en la región *vir* en uno de ellos, por lo que no habría que excluir la actuación conjunta de varias causas sobre ese fenotipo poco virulento.
  - 10- Se ha realizado una caracterización preliminar de tres mutantes (T22, T38 y T67) procedentes de la cepa IVIA 1.102 aislados de un tumor de tomate. Todos recuperaron el fenotipo patógeno en este huésped al complementar con genes de la región del ADN-T. En dos de ellos se observó la presencia de un plásmido de mayor tamaño que el pTi de la cepa salvaje. En el tercer mutante, el plásmido Ti no presentó diferencias de tamaño apreciables.

11- Todos los mutantes aislados en este trabajo menos uno presentaron diferencias en el número o tamaño de los plásmidos que contienen respecto a las cepas patógenas parentales, lo que podría indicar que se han producido cambios debido a reorganizaciones con otros plásmidos o sus cromosomas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N.** 1988. Bacterial galls. En: Plant Pathology. San diego, Academic Press: 558-565
- Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., Gordon, M.P.** 1984. T-DNA of *Agrobacterium* encoded and enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci . USA, 81: 5994-5998.
- Alarcón, B., López M. M., Cambra, M., Ortiz, J.** 1987. Comparative study of *Agrobacterium* biotypes 1, 2 and 3 by electrophoresis and serological methods. J Appl Bacteriol 62: 295-306
- Albiach, M. R. y Lopez, M. M.** 1992. Plasmid heterogeneity in Spanish isolates of *Agrobacterium tumefaciens* from thirteen different hosts . Appl Environ Microbiol 58:2683-2687.
- Allardet, S. A., Michaux, C. S., Jumas, B. E., Karayan, L., Ramuz, M.** 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. J Bacteriol. 175:24-7874.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 5:215:403-10.
- Anderson, A.R., y Moore, L. W.** 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. Phytopathology 69: 320-323
- Ankenbauer, R. G. y Nester, E. W.** 1990. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. J Bacteriol 172:6442-6446.
- Aznar, R., Ludwig, W., Amann, R. I., Schleifer, K. H.** 1994. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Int J Syst Bacteriol 44: 2, 330-337.
- Bakken, L.R.** 1985. Separation and purification of bacteria from soil. Appl Environ Microbiol. 49: 1482-1487.
- Baldani, J. I., Weaver, R.W., Hynes, M.F., Eardly, B.D.** 1992. Utilization of Carbon Substrates, Electrophoretic Enzyme Patterns, and Symbiotic Performance of Plasmid-Cured Clover *Rhizobia*. Appl Environ Microbiol. 58:2308-2314.
- Ballas, N., y Citovsky, V.** 1997. Nuclear localization signal binding protein from Arabidopsis mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. Proc Natl Acad Sci USA. 94:10723-28.
- Bardin, S., Dan, S., Osteras, M., Finan, T.M.** 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol. 178:4540-7.
- Barry, G. F., Rogers, S.G., Fraley, R. T., Brand, L.** 1984. Identification of a cloned cytokinin biosynthesis gene. Proc Natl Acad Sci USA. 81: 477-680.
- Bashan, Y. y Okon, Y.** 1986. Diseased leaf lyophilization: a method for long-term prevention of loss of virulence in phytopathogenic bacteria. J Appl Bacteriol 61:163-168.

- Beauchamp, C. J., Chilton, W. S., Dion, P., Antoun, H.** 1990. Fungal catabolism of crown gall opines. *Appl Environ Microbiol.* 56: 150-155.
- Beaulieu, C., Coulombe, L. J., Granger, R. L., Miki, B., Beauchamp, C., Rossignol, G., Dion, P.** 1983. Characterization of opine-utilizing bacteria isolated from Québec. *Phytoprotection* 64:61-68.
- Bélanger, C., Canfield, M. L., Moore, L. W., Dion, P.** 1993. Detection of avirulent mutants of *Agrobacterium tumefaciens* in crown-gall tumors produced in vitro. Pgs. 97-101 en: *Advances in Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*, Vol. 2. Eds. E.W. Nester y D.P.S. Verma, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bélanger, C., Canfield, M. L., Moore, L. W., Dion, P.** 1995. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown gall tumors. *J Bacteriol* 177:3752-3757.
- Bell, C.R. y Ramey, W.D.** 1991. Hybrid biovars of *Agrobacterium* species isolated from conifer roots. *Can J Microbiol.* 37: 34-41.
- Benjama, A., Alami, N. y Saadaoui, E. M.** 1996. Serological study of Moroccan strains of *Agrobacterium tumefaciens*, the causal agent of crown-gall in stone-fruit trees. *Agronomie* 16: 517-522
- Berger, B. R. y Christie, P. J.** 1993. The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J Bacteriol* 175:1723-1734.
- Berger, B. R. y Christie, P. J.** 1994. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol* 176:3646-3660.
- Bergeron, J. C., Beaulieu, C., Levesque, R. C., Kondorosi, A., Dion, P.** 1993. Homology between the genes of octopine catabolism in *Rhizobium meliloti* A3 and corresponding genes on the Ti plasmid. *Can J Microbiol.* 39: 1041-1050.
- Bernaerts, M. J., y De Ley, J.** 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 197: 406-407.
- Binns, A. N., Sciaky, D., Wood, H. N.** 1982. Variation in hormone autonomy and regenerative potential of cells transformed by strain A66 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell.* 31:605-12.
- Bonnard, G., Vincent, F., Otten, L.** 1989. Sequence and distribution of IS866, a novel T region-associated insertion sequence from *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 22:70-81.
- Bouzar, H., Ouadah, D., Krimi, Z., Jones, J. B., Trovato, M., Petit, A., Dessaux, Y.** 1993. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Appl Environ Microbiol* 59:1310-1317.
- Bouzar, H.** 1994. Letter to the editor: Request for a judicial opinion concerning the type species of *Agrobacterium*. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 373-374.
- Bouzar, H., Chilton, W. S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J.B., Hodge N.C.** 1995. A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Appl Environ Microbiol* 61: 65-73.



- Bouzar, H. y Jones, J.B.** 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. Int J Syst Evol Microbiol. 51:1023-6.
- Bradbury, J.F.** 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C.A.B. International Mycological Institute. C.A.B. International. Slough, GB.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Davila, G., Romero, D., Palacios, R.** 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance J Bacteriol 174:5183-5189.
- Brumbley, S. M. y Denny, T. P.** 1990. Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. J Bacteriology. 172: 5677-5685.
- Brumbley, S. M., Carney, B. F., Denny, T. P.** 1993. Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *PhcA*, a putative LysR transcriptional regulator. J Bacteriol. 175: 5477-5487
- Buchholz, W. G. y Thomashow, M. F.** 1984. Comparison of T-DNA oncogene complements of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmids with limited and wide host ranges. J Bacteriol. 160:319-26.
- Canfield, M. L. y Moore, L. W.** 1991. Isolation and characterization of opine-utilizing strains of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent strains of *Pseudomonas* spp. from rootstocks of *Malus*. Phytopathology 81: 440-443.
- Canfield, M. L., Pereira, C., Moore, L. W.** 1992. Control of crown gall in apple (*Malus*) rootstocks using Copac E and Terramycin. Phytopathology 82:1153 (abstr.).
- Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J.A., Lee, C.C., Theines, C., Nester, E.W.** 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* *ChvA* protein in export of  $\beta$ -1,2-glucan. J Bacteriol. 171: 1609-1615.
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R.G. y Nester, E. W.** 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Proc Natl Acad Sci USA 87:6708-6712.
- Castle, L. A. y Morris, R. O.** 1990. A method for early detection of T-DNA transfer. Plant Mol Biol Rep. 8:28-39.
- Cassagne, H.** 1966. Milieux de culture et leurs applications. Editor M. R. Dujarric. Ed. De La Tourelle St-Maudé Seine
- Cheng, H.P. y Lessie, T.G.** 1994. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. J bacteriol. 176: 4034-4042.

- Chesnokova, O., Coutinho, J. B., Khan, I. H., Mikhail, M. S., Kado, C. I.** 1997. Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. *Mol Microbiol* 23:579-590.
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-267.
- Chilton, M. D., Saiki, R. K. et al.** 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumour cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4060-4064.
- Cho, K., C. Fuqua, Martin, B.S., Winans, S. C.** 1996. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* genes that direct the complete catabolism of octopine. *J Bacteriol.* 178: 1872-1880.
- Cho, K., Fuqua, C., Winans, S. C.** 1997. Transcriptional regulation and locations of *Agrobacterium tumefaciens* genes required for complete catabolism of octopine. *J Bacteriol.* 179: 1-8.
- Christie, P. J., Ward, J. E., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1989. A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9677-9681.
- Christie, P. J.** 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol.* 179:3085-94.
- Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D., Zambryski, P.** 1992. Nuclear localization of *Agrobacterium* vir E2 protein in plant cells. *Science* 256: 1802-1805.
- Citovsky, V., Guralnick, B., Simon, M.N., Wall, J.S.** 1997. The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *J Bacteriol.* 170:2659-2667.
- Clerc, A., Manceau, C., Nesme, X.** 1998. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genomospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol*, 64: 11180-11187.
- Comai, L. y Kosuge, T.** 1983. Transposable elements that causes mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. *J Bacteriol*, 154: 1162-7
- Conn, H.J.** 1942. Validity of the Genus *Alcaligenes*. *J Bacteriol*, 44: 353-360.
- Constantino, P., Hooykaas, P.J., den Dulk-Ras, H., Schilperoort, A.** 1980. Tumor formation and rhizogenicity of *Agrobacterium* rhizogenes carrying Ti plasmids. *Gene.* 11:79-87.
- Cooksey, D.A.** 1986. A spontaneous insertion in the agrocin sensitivity region of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Plasmid* 16: 222-224.
- Cooksey, D.A. y Moore, L.W.** 1982a. High frequency spontaneous mutations to Agrocin 84 resistance in *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. *Physiol Plant Pathol* 20:129-135.
- Cooksey, D.A. y Moore, L.W.** 1982b. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology* 72:919-921.

- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A.B., Van Montagu, M., y Desomer, J.** 1992. Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *EMBO J.* 11: 795-804.
- Cubero J.** 1998. Detección y movimiento de *Agrobacterium tumefaciens* en distintas especies vegetales. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Valencia, Spain
- Cubero, J., Martínez, M., Llop, P., López, M.M.** 1999. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *J Appl Microbiol* 86: 591-602.
- Cubero, J., van der Wolf, J., van Beckhoven, J., López, M.M.** 2002. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. *J Microbiol Methods* 51: 387-392,
- Currier, T.C. y Nester, E.W.** 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal Biochem.* 76:431-441.
- Dale, E. M., Binns, A. N., Ward, J. E.** 1993. Construction and characterization of Tn5virB, a transposon that generates nonpolar mutations, and its use to define *virB8* as an essential virulence gene in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 175:887-891.
- Darvill, A., y Albersheim, P.** 1984. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 35:243-275.
- Das, A.** 1988. *Agrobacterium tumefaciens vir E* operon encodes a single-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2909-2913.
- Das, A., y Xie, Y.H.** 1998. Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol Microbiol.* 27:405-414.
- Das, A., y Xie, Y.H.** 2000. The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol.* 182:758-763.
- De Bruijn, F.J.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 58: 7, 2180-2187.
- De Cleene M and Ley J.** 1976. The host range of crown gall. *Botanical Review* 42: 389-466.
- Deng, W., Chen, L., Wood, D.W., Metcalfe, T. Liang, Gordon, M.P., Comai, L., Nester, E.W.** 1998. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:7040-45.
- De Meirsmann, C., Van Soom, C., Verreth, C., Van Gool, A., Vanderleyden, J.** 1990. Nucleotide sequence analysis of IS427 and its target sites in *Agrobacterium tumefaciens* T37. *Plasmid* 24:227-234.
- Depicker A, Schell J, Van Montagu M.** 1977. Comparative study of Ti-plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* by use of restriction enzymes. *Biochem Soc Trans.* 5:931-2.
- Dessaux, Y.; Guyon, P., Farrand, S.K., Petit, A., Tempe, J.** 1986a. *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids specify enzymic lactonization of mannopine to agropine. *J Gen Microbiol.* 170: 2939-2946.

- Dessaux, Y., Petit, A., Tempe, J., Demarez, M., Legrain, C., Wiame, J. M.** 1986b. Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *J Bacteriol.* 166: 44-50.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K., Murphy, P.** 1998. Opines and opine-like molecules in plant-*Rhizobiaceae* interactions. En: *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Cap. 9. 173-198. Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. eds. Kluwer Academic Publishers.
- Dessaux, Y., y Petit, A.** 1994. Opines as screenable markers for plant transformation. Pp 1-12. In: *Plant Molecular Biology Manual*. S.B. Gelvin, R.A. Schilpercot eds. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Dion, P., Belanger, C., Marquis, C., Ream, W., Gelvin, S. B.** 1996. Ecological significance of avirulence in *Agrobacterium*. *Crown gall: advances in understanding interkingdom gene transfer* 21:44-58.
- Dong, L.C., Sun, C.W., Thies, K., Luthe, D., Graves, C.H.** 1992. Use of Polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology* 82:434-439.
- Douglas, C.; Halperin W., Nester, E.W.** 1982. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachments to plant cells. *J Bacteriol.* 152: 1265-1275.
- Douglas, C. J., Staneloni, R. J, Rubin, R. A., Nester, E. W.** 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence region. *J Bacteriol.* 161: 850-860.
- Duncan, A.V., Stokes, H.W., Daggard, G.** 1992. Genetic exchange in natural microbial communities. In: *Advances in Microbial Ecology*. 12:383-429. K.C. Marshall, ed. Plenum Press, New York, NY.
- Ellis, J. G., Kerr, A. Petit, A., Tempé, J.** 1982. Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti plasmids. The role of agrocinopines. *Mol Gen Genet.* 186: 269-274.
- Ellis, J. G., Ryder, M.H. Tate, M. E.** 1984. *Agrobacterium tumefaciens* TR-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol Gen Genet* 195: 466-473.
- Engler, G., Depicker, A., Maenhaut, R., Villarroel, R., Van Montagu, M., Schell, J.** 1981. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol.* 152: 183-208.
- Faivre-Amiot, A., Roux, J., Faivre, M. L.** 1979. Essai de lutte biologique contre la galle du collet (crown gall) à l'aide d'une souche d'*Agrobacterium* non pathogène: *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* (souche 84 de Kerr). *Phythiatrie-Phytopharmacie* 28:203-214.
- Faivre-Amiot, A.** 1984. Les tumeurs à *Agrobacterium*. *Phytoma* 8: 27-31.
- Farrand S.K; van Berkum, P.B., Oger, P.** 2002. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int J Syst Microbiol.* DOI 10.1099/ijs.0.02445-0.

- Finan, T. M., Kunkel, B., Vos, G. D., Signer E. R.** 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol* 167:66-72.
- Finan TM, Oresnik I, Bottacin A.** 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. *J Bacteriol.* 170:3396-403.
- Flores, M., González, V., Pardo, M.A., Leija, A., Martínez, E., Romero, D., Piñeiro, D., Dávila, G., Palacios, R.** 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J Bacteriol.* 170:1191-1196.
- Fortin, C., Nester, E. W., Dion, P.** 1992. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. *J Bacteriol.* 174:17-5685.
- Fortin, C., Marquis, C. Nester, E. W., Dion P.** 1993. Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *J Bacteriol* 175:4790-4799.
- Fournier, P., Paulus, F., Otten, L.** 1993. IS870 requires a 5'-CTAG-3' target sequence to generate the stop codon for its large ORF1. *J. Bact.* 175:3151-3160.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Gall, F. Le., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P.** 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol.* 65:5409-5420
- Fujiwara, A., Takamura, H., Majumder, P., Yoshida, H., Kojima, M.** 1998. Functional analysis of the protein encoded by the chromosomal virulence gene (*acvB*) of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 64:191-193.
- Fullner, K. J., Lara, J. C., Nester, E. W.** 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273:1107-1109.
- Fuqua, C., Winans, S. C., Greenberg, E. P.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:727-751.
- Garfinkel, D. J. y Nester, E. W.** 1980. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol.* 144: 732-743.
- Garret, C. M. E.** 1987. Problems of *Agrobacterium tumefaciens* in planting material and its control. *Bulletin OEPP/EPPPO* 17: 263-268.
- Gelvin, S. B.** 1998. *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol.* 180:4300-2.
- Gelvin, S. B.** 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:223-56.
- Genetello, C., Van Larebeke, N., Holsters, M., De Picker, A., Van Montagu M, Schell, J.** 1977. Ti plasmids of *Agrobacterium* as conjugative plasmids. *Nature* 265: 561-562.

- Ghai, J. y Das, A.** 1989. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 86:3109-3113.
- Gheysen, G.; Villaroel, R., Van Montagu, M.** 1991. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. Genes Dev. 5: 287-97.
- Gillings, M., Fahy, P., Davies, C.** 1993. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Lett Appl Microbiol. 17: 44-48
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J.L., Carlier, V., Ermel, G.** 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. International Journal of Food Microbiology. 53:127-140.
- Gonçalves, E.R. y Rosato, Y.B.** 2000. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 811-821.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N.,... Slater, S.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science. 294: 2323-2327.
- Guralnick, B., Thomsen, G., Citovsky, V.** 1996. Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus* oocytes by a modified VirE2 protein of *Agrobacterium*. Plant cell 8:363-373.
- Guyon, P., Petit, A., Tempe, J., Dessaux, Y.** 1993. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. Appl Environ Microbiol. 59:1310-1317.
- Haas, J.H., Moore, L.W., Ream, W., Manulis, S.** 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Appl Environ Microbiol 61: 2879-2884
- Hagiya, M., Close, T. J., Tait, R. C., Kado C. I.** 1985. Identification of pTiC58 plasmid-encoded proteins for virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci U S A. 82:2669-73.
- Han, B., Pain, A., Johnstone, K.** 1997. Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. Mol. microbiol . 25: 211-218.
- Hattori, Y., Iwata, K., Suzuki, K., Uraji, M., Ohta, N., Katoh, A., Yoshida, K.** 2001. Sequence characterization of the vir region of a nopaline type Ti plasmid, pTi-SAKURA. Genes and Genetic Systems 76:121-130.
- Hayman, G. T. y Farrand, S. K.** 1988. Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. J Bacteriol 170:1759-1767.
- Herman, L., Jacobs, A., Van Montagu, M., Depicker A.** 1990. Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. Mol Gen Genet. 224:248-56.
- Hirooka, T. y Kado, C. I.** 1986. Location of the right boundary of the virulence region on *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58 and a host-specifying gene next to the boundary. J Bacteriol. 168:237-243.

- Holmes, B.** 1988. Taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Horticulturae*, 225, 47-52.
- Holmes, B. y Roberts, P.** 1981. The classification, identification and nomenclature of *Agrobacteria*. *J. Appl. Bact.* 50: 443-467.
- Hoiseth, S. K., Connelly, C. J., Moxon, E. R.** 1985. Genetics of spontaneous, high-frequency loss of b capsule expression in *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 49: 389-95.
- Holsters, M., Silva, B. Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., Villarroel, R., Van Montagu, M., Schell, J.** 1980. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTi C58. *Plasmid* 3: 212-230.
- Hooykaas, P. J., Klapwijk, P. M., Nuti, M. P., Schilperoort, R. A., Rorsch, A.** 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium* ex planta. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.
- Hooykaas, P. J., den Dulk-Ras, H., Ooms, G., Schilperoort, R. A.** 1980. Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 143:1295-1306.
- Hooykaas, P. J. J., den dulkRas, H., Schilperoort, R. A.** 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* T DNA gene *6b* is an *onc* gene. *Plant Molecular Biology* 11: 791.
- Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A.** 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.
- Hooykaas, P. J. J. y Beijersbergen, A. G. M.** 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* 32.
- Howard, E., Zupan, J. R., Citovsky, V., Zambryski, P.C.** 1992. The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* 68: 109-18.
- Huang, W. M., Cangelosi, G. A. Halperin, W., Nester, E. W.** 1990. A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. *J Bacteriol.* 172: 1814-1822
- Huang, J., Denny, T. P., Schell, M. A.** 1993. *VsrB*, a regulator of virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*, is homologous to sensors of the two-component regulator family. *J Bacteriol* 175: 6169-6178.
- Huang, Q. y Allen, C.** 1997. An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum* *J Bacteriol.* 179: 7369-7378
- Hugh, R. y Leifson, E.** 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 66: 24-26.
- Hunt, R. S.** 1994. Comment on the letter by Andrivon-Re: Pathogenicity and virulence. *Phytopathology* 84:874-5

- Hynes, M. F., Simon, R., Müller, P., Niehaus, K., Labes, M., Pühler, A.** 1986. Mol. Gene. Genet. 202:356-362.
- Hynes, M. F., K. Brucksch, y U. Priefer.** 1988. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. Arch Microbiol 150:326-332.
- Hynes, M. F. y McGregor, N. F.** 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol Microbiol. 1990 4:567-74.
- Hynes, M. F. y Finan, T.M.** 1998. General genetic knowledge. En: The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. eds. Kluwer Academic Publishers.
- Iannino, N. D. y Ugalde, R. A.** 1989. Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens* *chvA* mutants: synthesis and excretion of beta-(1-2) glucan. J Bacteriol 171:2842-2849.
- Inzé, D., Follin, A., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M., Schell, J.** 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA gene of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Mol. Gen. Genet. 194:265-274.
- Irelan, N. A. y Meredith, C. P.** 1996. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* using randomly amplified polymorphic DNA. American Journal of Enology and Viticulture 47: 145-151
- Ishiguro, E. E., Kay, W. W., Ainsworth, T., Chamberlain, J. B., Austen, R. A., Buckley, J. T., Trust, T. J.** 1981. Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. J. Bacter. 148: 333-40
- Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societé Vaudoise des Sciences Naturelles 44: 223-270.
- Janssen, B.J. y Gardner, R.C.** 1990. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. Plant. Mol. Biol. 14:61-72.
- Jin, S., Komari, T. Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1987. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. J Bacteriol. 169: 4417-4425.
- Jin, S., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Nester, E. W.** 1990a. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. J Bacteriol 172:4945-4950.
- Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1990b. The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation. J Bacteriol. 172: 525-530.
- Jin S. G., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Nester, E.W.** 1990c. Phosphorylation of the Vir G protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated Vir A protein: essential role in biological activity of VirG. J Bacteriol. 172: 4945-50.
- Jones, J. B. y Rajú, B. C.** 1988. Systemic movement of *A. tumefaciens* in symptomless stem tissue of *Chrysanthemum morifolium*. Plant Disease 72: 51-54



- Jones, D. A., Ryder, M. H. Clare, B. G. Farrand, S. K. Kerr A.** 1988. Construction of a Tra- deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. *Mol Gene Genet* 212:207-214.
- Johansson, M. L., Quednau, M., Molin, G., Ahrne, S.** 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol.* 21:155-9.
- Joos, H., Inzé, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M., Schell, J.** 1983. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell* 32: 1057-1067.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M. y Allardet-Servent, A.** 1998. Unconventional genomic organization in the Alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *J Bacteriol.* 180: 2749-2755.
- Kao J. C., Perry, K. L., Kado, C. I.** 1982. Indoleacetic acid complementation and its relation to host range specifying genes on the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet.* 188:425-32.
- Kado, C.I., Heskett, M.G., Langley, R.A.** 1972. Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: characterization of strains ID135 and B6, and analysis of the bacterial chromosome, transfer RNA and ribosomes for tumor inducing ability. *Physiol. Plant Pathol.* 2: 47-57.
- Kado, C. I.** 1991. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 1-32.
- Kado, C. I.** 1994. Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the *virB* operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol Microbiol.* 12:17-22.
- Kajioka, R. y Hui, J.** 1978. The pleiotropic effect of spontaneous single-step variant production in *Mycobacterium intracellulare*. *Scand. J. Respir. Dis.* 59: 91-100.
- Kalogeraki, V. S. y Winans, S. C.** 1995. The octopine-type Ti plasmid pTiA6 of *Agrobacterium tumefaciens* contains a gene homologous to the chromosomal virulence gene *acvB*. *J Bacteriol* 177:892-897.
- Kalogeraki, V. S. y Winans S. C.** 1998. Wound-released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid. *J Bacteriol* 180:5660-5667.
- Kalogeraki, V. S., Zhu, J. Eberhard, A., Madsen, E. L., Winans, S. C., Zhu, J.** 1999. The phenolic vir gene inducer ferulic acid is O-demethylated by the VirH2 protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Mol Microbiol* 34:512-522.
- Kalogeraki, V. S., Zhu, J., Stryker, J. L., Winans, S. C.** 2000. The right end of the *vir* region of an octopine-type Ti plasmid contains four new members of the *vir* regulon that are not essential for pathogenesis. *J Bacteriol.* 182:1774-8.
- Kanemoto, R. H., Powell, A. T., Akiyoshi, D. E., Regier, D. A., Kerstetter, R. A., Nester, E. W., Hawes, M. C., Gordon, M. P.** 1989. Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 171:2506-2512.

- Kanvinde, L. y Sastry, G.R.** 1990. *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. Appl. and Environ. Microbiol. 56: 2087-2092.
- Kao, J. C., Perry, K. L., Kado, C. I.** 1982. Indoleacetic acid complementation and its relation to host range specifying genes on the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet. 188:425-32.
- Keane, P.J., Kerr, A., New, P.B.** 1970. Crown gall of stone fruits. II Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. Australian J. Biol. Sci. 23: 585-595.
- Kerr, A.** 1969. Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium*. Nature 223: 1175-1176.
- Kerr, A.** 1971. Acquisition of virulence by non-pathogenic isolates of *Agrobacterium radiobacter*. Physiol. Plant. Pathol. 1:241-246.
- Kerr, A. y Panagopoulos, C. G.** 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. Phytopathologische Zeitschrift 90: 172-179.
- Kerr, A., Manigault, P., Tempé, J.** 1977. Transfer of virulence in vivo and in vitro in *Agrobacterium*. Nature. 10;265(5594):560-1.
- Kerster, K. y De Ley, J.** 1984. Genus III *Agrobacterium* Conn. 1942. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol I. Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp 244-254.
- Kim, H. y Farrand, S. K.** 1998. Opine catabolic loci from *Agrobacterium* plasmids confer chemotaxis to their cognate substrates. Mol Plant Microbe Interactions 11:131-143.
- Klee, H., Horsch, R. et al.** 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann Rev Plant Physiol. 467-486.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Korber, H. Redei GP, Schell J.** 1989. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. Proc Natl Acad Sci USA 86:8467-71.
- Körberg, H., Strizhov, N., Staiger, D., Feldwisch, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palme, K., Schell, J., Koncz, C.** 1991. T DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxins response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. EMBO J 10: 3983-3991.
- Kopecko, D. J., Holcombe, J., Formal, S. B.** 1979. Molecular characterization of plasmids from virulent and spontaneously occurring avirulent colonial variants of *Sighella flexneri*. Infect Immun. 24: 580-2.
- Koukolikova-Nicola, Z., Raineri, D., Stephens, K., Ramos, C., Tinland, B., Nester, E. W., Hohn, B.** 1993. Genetic analysis of the virD operon of *Agrobacterium tumefaciens*: a search for functions involved in transport of T-DNA into the plant cell nucleus and in T-DNA integration. J Bacteriol. 175:723-31.

- Kovach, M.E., Elzer, P., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II<sup>a</sup>, R.M., Peterson, K.M.** 1995. Four new derivatives of the broad host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 166: 175-176
- Krawiec, S. y Riley, M.** 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol Rev*. 54:502-39.
- Krimi, Z., Petit, A., Mougel, C., Dessaux, Y., Nesme, X.** 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. *Appl Environ Microbiol*. 68:3358-65.
- Kruger, M., Lux, R., Schilow, W., Horsch, F.** 1988. Differentiation of *Bordetella bronchiseptica* strains. 7. Phenotypic changes in *B. bronchiseptica* during phase changes. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin*. 42:213-220.
- Kuldau, G. A., Vos, G. d., Owen, J., McCaffrey, G., Zambryski, P.** 1990. The *virB* operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames. *Mol Gene Genet* 221:256-266.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V.** 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1871-1876.
- Lai, E.M. y Kado, C.I.** 1998. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bact*. 180:2711-2717.
- Lai, E. M., Eisenbrandt, R. Kalkum, M. Lanka, E., Kado, C. I.** 2002. Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J Bacteriol* 184:327-330.
- Lam, E., Katagiri, F., Chua, N. H.** 1991. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. *Bio/Technol*.
- LaPointe, G., Nautiyal, C. S., Chilton, W. S., Farrand, S. K., Dion, P.** 1992. Spontaneous mutation conferring the ability to catabolize mannopine in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 174: 2631-2639.
- Lastra B.** 1998. *Agrobacterium* spp. en cultivares de viña de Galicia: distribución, caracterización de cepas bacterianas y sensibilidad de cultivares y portainjertos. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España.
- Latour, X.** 1996. Effet de la plante et du sol sur la diversité des populations telluriques de *Pseudomonas* spp. fluorescent. Tesis. Universidad de Bourgogne. Francia.
- Leemans, J., Deblaere, R. Willmitzer, L., DeGreve, H., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M., Schell, J.** 1982. Genetic identification of functions of T<sub>L</sub>-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J*. 1: 147-152.
- Lehoczky, J.** 1968. Spread of *A. tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *Phytopathology*. 63:239-246.
- Lelliot, R.A. y Stead, D.E.** 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In *Methods in Plant Pathology*. p 216. Ed. Preece TF

- Leloup, L., Lai, E. M., Kado, C. I.** 2002. Identification of a chromosomal tra-like region in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Genetics and Genomics* 267:115-123.
- Lessl, M., Balzer, D., Pansegrau, W., Lanka, E.** 1992. Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti *virB* region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J. Biol. Chem.* 267: 20471-20480.
- Lessl, M. y Lanka, E.** 1994. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77:321-24.
- Li, T., Bisailon, J.G., Villemur, R., Létourneau, L., Bernard, K., Lépine, F. Beudet, R.** 1996. Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *J Bacteriol* 178: 2551-2558.
- Lin, T. S. y Kado, C. I.** 1993. The *virD4* gene is required for virulence while *virD3* and *orf5* are not required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* 9:803-812.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., y Chen, C.W.** 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* 10: 923-933.
- Lippincott, J.A., Beiderbeck, R. y Lippincott, B.** 1973. Utilization of octopine and nopaline by *Agrobacterium*. *J Bacteriol.* 116: 378-383.
- Lippincott, J.A., Lippincott, B.B., Starr, M.P.** 1981. The genus *Agrobacterium*. En *Prokariotes*. De. M. P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G Schegel. Springer Verlag. Heidelberg Berlin. pp 842-845.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C., López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37: 23-31.
- Llop, P., Lastra, B., Marsal, H., Murillo, J., López, M.M.** 2003. Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumours. *European Journal of Plant Pathology.* 109:381-389.
- López, M. M., Miró, M., Gorris, M., Salcedo, C. I., Temprano, F. J., Orive, R. G.** 1983. Comparative efficiency of inoculation treatments with *Agrobacterium radiobacter* pv. *Radiobacter* K84 against sensitive and resistant agrocin 84 strains of *Agrobacterium radiobacter* pv. *Tumefaciens*. 43-58 En: International workshop on Crown gall. Swiss Federa Research Station for Fruit-growing, Viticulture and Horticulture. Wadenswill, Suiza.
- López, M. M., Gorris, M. T., Salcedo, C. I., Montojo, A. M., Miro M.** 1989. Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on stone fruit trees. *Appl Environ Microbiol* 55: 741-746.
- López, M. M. y Montesinos, E.** 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. En: *Patología Vegetal*. Volumen 1, Capítulo 15: 515-558. Ed. G. Llácer; M. M. López; A. Trapero; A. Bello. Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma- España.

- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., Bruijn, F.J. de., De Bruijn, F.J.** 1994. Specific genome fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2286-2295.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W., Bruijn, F.J. de., de Bruijn, F.J.** 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual-Review-of-Phytopathology.*, 37: 81-125.
- Manahan, H. S. y Steck, T. R.** 1997. The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 29-37.
- Martí, R., Cubero, J., Daza, A., Piquer, J, Salcedo, C.I., Morente, C., López, M.M.** 1999. Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants. *Eur J Plant Pathol.* 105: 39-50.
- Matsumoto, S., ITO, Y., Hosoi, T., Takahashi, Y., Machida, Y.** 1990. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. *Mol Gene Genet* 224: 309-316.
- Mattanovich, D., Rüker, F., Machado, A.C., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G., Katinger, H.** 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 17: 6747.
- Matthyse, A. G.** 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J Bacteriol.* 154: 906-915.
- Matthyse, A. G.; Holmes, K. V., Gurlitz, R.H.** 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol.* 145: 583-595.
- Matthyse, A.G. y McMahan, S.** 1998. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD*, and *attR* mutants. *Appl Environ Microbiol.* 64: 2341-45.
- Matthyse, A. G., Yarnall, H. A. Young, N.** 1996. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 178:5302-5308.
- Maurelli, A.T., Blackmon, B., Curtiss, R. 3<sup>rd</sup>.** 1984. Loss of pigmentation in *Shigella flexneri* 2a is correlated with loss of virulence-associated plasmid. *Infect Immun.* 43: 397-401.
- Mavingui, P., Flores, M., Guo, X., Dávila, G., Perret, X., Broughton, W., Palacios, R.** 2002. Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol.* 184:171-176.
- Mayerhofer, R.Z., Koncz-Kalman, C., Nawrath, G., Bakkeren, A., Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C.** 1991. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* 10:697-704.

- Mazurier, S., Giessen, A., Heuvelman, K., Wernars, K., Van de Giessen, A.** 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol* 14: 260-262.
- McBride, K. E. y Knauf, V. C.** 1988. Genetic analysis of the *virE* operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. *J Bacteriol* 170:1430-1437.
- McDonough, M. A. y Butterson, J. R.** 1999. Spontaneous tandem amplification and deletion of the sigma toxin operon in *Shigella dysenteriae*. *Mol Microbiol.* 34: 1058-69.
- Melchers, L. S. y Hooykaas, P. J. J.** 1987. Virulence of *Agrobacterium*. *Plant Mol Cell Biol.* 4: 167.
- Melchers, L. S., Regensburg-Tuink, A. J. G., Bourret R. B., Sedee, N. J., Schilperoort, R. A., Hooykaas, P. J.** 1989. Membrane topology and functional analysis of the sensory protein VirA of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 8: 1919-25.
- Mercado-Blanco, J., García, F., Fernández-López, M., Olivares, J.** 1993. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. *J Bacteriol.* 175:5403-5410.
- Messens, E., Lenaerts, A., Van Montagu, M., Hedges, R.W.** 1985. Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol Gene Genet.* 199-344.
- Michaux, S., Paillisson, J. Carles-Nurit, M. J. Bourg, G. Allardet-Servent, A. Ramuz M.** 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J Bacteriol.* 175: 701-705.
- Michel, M. F., Miranda, A. C., Depierreux, C., Otten, L., Delmotte, F., Jouanin, L.** 1990. Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Appl Env Microbiol.* 56: 3537-3545.
- Mills, J.A., Venkatesan, M.M., Baron, L.S., Buysse, J.M.** 1992. Spontaneous insertion of an IS1-like element into the *virF* gene is responsible for avirulence in opaque colonial variants of *Sighella flexneri* 2a. *Infect Immun.* 60: 175-82.
- Moënné-Loccoz, Y. y Weaver, R.W.** 1995. Plasmids influence growth of rhizobia in the rhizosphere of clover. *Soil biol biochem.* 27: 1001-1004.
- Moënné-Loccoz, Y. y Weaver, R.W.** 1996. Effect of drought stress on survival of clover rhizobia W14-2 and its plasmid-cured derivatives in soil. *Appl Soil Ecol.* 3:137-148.
- Momol, E.A., Burr, T.J., Reid, C.L., Momol, M.T., Hseu, S.H., Otten, L.** 1998. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5'-end of the 23S rRNA gene and random amplified polymorphic DNA. *J Appl Microbiol* 85: 685-692.
- Moore, L.W., y Cooksey, D.A.** 1981. Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions. In *Biology of Rhizobiaceae*, ed. Giles K.L. and Atherly A.C. 15-46. Acad. Press. New York.

- Moore, L. W. y Allen, J.** 1986. Controlled heating of root-pruned dormant *Prunus* spp. Seedlings before transplanting to prevent crown gall. *Plant dis.* 70:532-536.
- Moore, L.W. y Canfield, M.** 1996. Biology of *Agrobacterium* and management of crown gall disease. In: Principles and practice of managing soilborne plant pathogens. Cap. 8. 153-191. APS Press. Robert Hall, ed. U. Of Guelph, Ontario, EEUU.
- Moore, L. W., Chilton, W. S., Canfield, M. L.** 1997. Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. *Appl Environ Microbiol.* 63:201-207.
- Moore, L. W., Bouzar, H., Burr, T.** 2001. Gram-negative bacteria. *Agrobacterium*. En: Plant Pathogenic Bacteria. Laboratory guide for identification. 17-39. N.W. Schaad; J.B. Jones; W. Chun, eds. APS Press, USA.
- Mougel, C.** 2000. Structure génétique des populations d'*Agrobacterium* spp.: Effet sélectif de la plante et implication dans la diffusion conjugative du plasmide Ti. Tesis Doctoral. Universidad de Lyon. Francia.
- Mougel, C., Cournoyer, B., Nesme, X.** 2001. Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl environ microbiol.* 67: 65-74.
- Mougel, C., Thioulouse, J., Perriere, G., Nesme, X.** 2002. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 573-586.
- Mysore KS, Nam J, Gelvin SB.** 2000. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:948-53.
- Nam, J., Matthyse, A.G., Gelvin, S.B.** 1997. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell* 9:317-33.
- Nam, J., Mysore, K.S., Zheng, C., Knue, M.K., Matthyse, A.G. Gelvin, S. B.** 1999. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet.* 261:429-38.
- Narasimhulu, S. B.; Deng, X. Sarria R, Gelvin SB.** 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *The Plant Cell* 8: 873-886.
- Nautiyal C. S, y Dion, P.** 1990. Characterization of the opine-utilizing microflora associated with samples of soil and plants. *Appl Environ Microbiol.* 56: 2576-2579.
- Nautiyal, C. S. Dion, P., Chilton, W.S.** 1991. Mannopine and mannopinic acid as substrates for *Arthrobacter* sp. strain MBA209 and *Pseudomonas putida* NA513. *J Bacteriol.* 173: 2833-2841.
- Nesme, X., Michel, F., Digat, B.** 1987. Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus L.* from a single nursery. *Appl Environ Microbiol.* 53:655-659.
- Nesme, X., Leclerc, M. C., Bardin, R.** 1989. PCR detection of an original endosymbiont: the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Endocytobiology IV*:47-50.

- Nesme, X., Bennedra, T., Collin, E.** 1990. Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula* L. x *P. alba* L. en pépinière forestière. *Agronomie* 10:581-588.
- Nesme, X., Ponsonnet, C., Picard, C., Normand, P.** 1992. Chromosomal and pTi genotypes of *Agrobacterium* strains isolated from *Populus* tumors in two nurseries. *FEMS Microbiol Ecology* 101:189-196.
- Nesme, X., Picard, C., Simonet, P.** 1995. Specific DNA sequences for detection of soil bacteria. In: *Nucleic Acids in the environment*. 111-139. ed. J.T. Trevor, J.D. van Elsas, Springer-Verlag, Berlin.
- New, P. B. y Kerr, A.** 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J Appl Bacteriol.* 34:233-6.
- New, P. B. y Kerr, A.** 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *J Appl Bact.* 35:279-287.
- Oger, P., Dessaux, Y., Petit, A., Gardan, L., Manceau, C., Chomel, C., Nesme, X.** 1997. Validity, sensitivity and resolution limit of the PCR-RFLP analysis of the *rrs* (16S rRNA gene) as a tool to identify soil-borne and plant-associated bacterial populations. Colloque BRG-USTL. Méthodologies de gestion et de conservation des ressources génétiques, Lille, France 8-10 October. *Genetics, Selection, Evolution* 30: supplement S311-S332.
- Okamoto, S., Toyoda-Yamamoto, A., Ito, K., Takebe, I., Machida, Y.** 1991. Localization and orientation of the VirD4 protein of *Agrobacterium tumefaciens* in the cell membrane. *Mol Gen Genet.* 228:24-32.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J., Moolenaar, G., Schilperoort, R. A.** 1981. Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene*.14:33-50.
- Ophel, K. y Kerr, A.** 1990. *Agrobacterium vitis* new species for strain of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevine. *International J Syst Bacteriol.* 40: 236-241.
- Ophel, K., Nicholas, P.R., Magarey, P.A., Bass, A.W.** 1990. Hot water treatment of dormant grape cuttings reduces crown gall. Incidence in a field nursery. *Am J Enol Vitic.* 41: 325-329.
- Otten, L., Canaday, J., Gerard, J. C., Fournier, P., Crouzet, P., Paulus, F.** 1992. Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids - a review. *Mol Plant Microbe Interactions* 5:279-287.
- Patel, M. K.** 1928. A study of pathogenic and non-pathogenic strains of *Pseudomonas tumefaciens* Sm. & Town. *Phytopathology* 18:331-343.
- Parent, J.G., Lacroix, M., Page, D., Vezina, L., Veigard, S.** 1996. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Disease* 80: 494-499.
- Paulus, F., Ridé, M., Otten, L.** 1989. Distribution of two *Agrobacterium tumefaciens* insertion elements in natural isolates: Evidence for stable association between Ti plasmids and their bacterial hosts. *Mol Gene Genet.* 219:145-152.



- Paulus, F., Canaday, J., Otten, L.** 1991. Limited host range Ti plasmids: recent origin from wide host range Ti plasmids and involvement of a novel IS element, IS868. *Mol Plant-Microbe Interactions* . 4:190-197.
- Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.J., Fedak, G.** 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR methods and applications* 4: 341-345.
- Peralta, E. G. y Ream L. W.** 1985. T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5112-6.
- Peralta, E. G., Hellmiss, R., Ream, W.** 1986. Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumor inducing plasmid. *EMBO J.* 5: 1137-1142.
- Petit, A., Delhay, S., Tempé, J., Morel, G.** 1970. Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiologie Végétale* 8: 205-213.
- Petit A., Tempé, J. Kerr, A., Hosters, M., Van Montagu, M., Schell, J.** 1978. Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Nature* 271: 570-572.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., Simonet, P.** 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 58:2717-2722.
- Picard, C.** 1993. Caractérisation et détection dans le sol des *Agrobacterium* du pommier. Universidad de Lyon. Tesis Doctoral. Francia.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Recobert, G., Antonelli, F., Simonet, P., Nesme, X.** 1994. Detection of pathogenic *Agrobacterium* in soils by PCR. In: *Plant pathogenic bacteria*, M. Lematre, S. Freigoun, K. Rudolph, J.G. Swings eds *Les colloques*, n° 66. INRA, Paris.
- Pionnat, S.** 1997. Recrudescence du crown gall du rosier: caractérisation biochimique et moleculaire d'une population d'*Agrobacterium tumefaciens* et implications de la systemie de la bacterie dans l'epidemiologie de la maladie. Tesis Doctoral. Universidad de Lyon. Francia.
- Pionnat, S., Keller, H., Hericher, D., Bettachini, A., Dessaux, Y., Nesme, X., Poncet C.** 1999. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Appl Environ Microbiol* 65:4197-4206.
- Ponsonnet, C. y Nesme, X.** 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch Microbiol* 161: 300-309.
- Ponsonnet, C., Normand, P., Pilate, G., Nesme, X.** 1995. IS292: a novel insertion element from *Agrobacterium*. *Microbiology* 141:853-861.
- Pooler, M.R., Ritchie, D.F., Hartung, J.S.** 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl Environ Microbiol.* 62: 9, 3121-3127.

- Raio, A., Zoina, A., Moore, L.W.** 1997. The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant pathol.* 46: 320-328.
- Rajeshwari, R., Yashitola, J., Reddy, A. P. K., Sonti, R. V.** 1997. Characteristics of stationary-phase variation affecting virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Can J Microbiol.* 43:9-867.
- Ream, L.W., Gordon, M.P., Nester, E.W.** 1983. Multiple mutations in the T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:1660-1664.
- Relic, B., Andjelkovic, M. Rossi, L. Nagamine, Y. Hohn B.** 1998. Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis by subcellular localization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:9105-10.
- Rhoads, D.D., y Roufa, D.J.** 1989. Molecular Genetics Laboratory. Center for basic cancer research. Kansas State University. Manhattan, Ks, EEUU.
- Rogowsky, P. M., Powell, B. S., Shirasu, K., Lin, T. S., Morel, P., Zyprian, E. M., Steck, T. R., Kado C. I.** 1990. Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63-kbp regulon cloned as a single unit. *Plasmid* 23:85-106.
- Rossignol, G. y Dion, P.** 1985. Octopine, nopaline and octopinic acid utilization in *Pseudomonas*. *Can J Microbiol.* 31:68-74.
- Rychlik, W., y Rhoads, R. E.** 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids res.* 17: 8543-8551.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., Christie, P. J.** 2001. Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol.*183:5813-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sans, N., Schröder, G., Schröder, J.** 1987. The *noc* region of the Ti plasmid C58 codes for arginase and ornithine cycloamidase. *Eur J Biochem.* 167: 82-87.
- Savka, M. A. y Farrand, S. K.** 1997. Mannityl opine accumulation and exudation by transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 98:784-789.
- Sawada, H., Takikawa, Y., Ieki, H.** 1992. Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. *Ann Phytopath Soc Japan.* 58: 46-51.
- Sawada, H. e Ieki, H.** 1992. Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann Phytoph Soc Japan.* 58: 37-45.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, Matsumoto S.** 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International J Syst Bacteriol.* 43: 694-702.
- Sawada, H.** 1994. Studies on differentiation and taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station* No. 5.

- Sawada, H., Ieki, H., Matsuda I.** 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* 61:828-831.
- Schmidt, E. H., Domke, N. Angerer, C. Wanner, G. Zambryski, P. C. Baron C.** 1999. Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 181:7485-7492.
- Schroder, G., Waffenschmit, S. Weiler, E., Schröder, J.** 1984. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem.* 138: 387-391.
- Schroth, M.N., Thompson, J.P., Hildebrand, D.C.** 1965. Isolation of *A. tumefaciens*-*A. radiobacter* group from the soil. *Phytopathology* 55: 645-647.
- Schroth, M. N., Weinhold, A. R., McCain, A. H., Hildebrand, D. C., Ross, N.** 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40:539-552.
- Schroth, M. N. y Moller; W. J.** 1976. Crown gall controlled in the field with a nonpathogenic bacterium. *Plant Dis Rep.* 60:275-278.
- Sciaky, D., Montoya, A. L., Chilton, M. D.** 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid* 1: 238-253.
- Segovia, L., Piñeiro, D., Palacios, R., Martínez-Romero, E.** 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol.* 57:426-433.
- Shaner, G., Stromberg, E., Lacy, G., Barker, K., Pirone, T.** 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu Rev Phytopathol.* 30:47-66.
- Shaw, C.H., Watson, M.D., Carter, G.H., Shaw, C.H.** 1984. The right hand copy of the nopaline Ti plasmid 25 pb repeat is required for tumor formation. *Nucleic Acids Res* 12:6031-6041.
- Sheng, J. y Citovsky V.** 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant cell* 8:1699-1710.
- Shirasu, K., Koukolikova, N. Z., Hohn, B., Kado C. I.** 1994. An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol Microbiol* 11:581-588.
- Smith, E.F y Townsend, C.O.** 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.
- Sneath H. A. y Collins V. G.** 1974. A study in test reproducibility between laboratories: report of a *Pseudomonas* working party. *Antoine Leeuwenhoek* 40: 481-527.
- Sobral, B. W. S., Honeycutt, R. J., Atherly, A. G., McClelland M.** 1991. Electrophoretic separation of the three *Rhizobium meliloti* replicons. *J Bacteriol.* 173: 5173-5180.

- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-17.
- Spencer, P. A. y Towers, G. H. N.** 1988. Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry* 27: 2781-2785.
- Spielmann, A., Simpson, R. B.** 1986. T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. *Mol Gene Genet* 205:34-41.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P.** 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry* 27: 2781-2785.
- Stachel, S.E., y Nester, E.W.** 1986. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 5: 1445-54.
- Stachel, S.E., y Zambryski, P.C.** 1986. *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell.* 46: 325-333.
- Stachel, S. E., Timmerman, B., Zambryski, P.** 1986. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322: 706-712.
- Stachel, S.E., Timmerman, B., Zambryski, P.** 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* *vir* gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' *virD* gene products. *EMBO J.* 6:857-863.
- Starr, M.P. y Weiss, J.E.** 1943. *Pytopathology*, 33, 314-318.
- Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B., Ronson, C.W.** 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8985-8989.
- Sullivan, J.T. y Ronson, C. W.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe-tRNA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5145-5149.
- Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A., Ream W.** 1996. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol* 178:1207-1212.
- Suwanto, A. y Kaplan, S.** 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J Bacteriol.* 171: 5850-5859.
- Swart, S., Lugtenberg, B. J. J., Smit, G., Kijne, J. W.** 1994. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *A. tumefaciens chvB* mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. *J Bacteriol* 176:3816-3819.
- Tate, M. E., Ellis, J. G. Kerr, A., Tempé, J., Murray, K. E. Shaw, K. J.** 1982. Agropine: a revised structure. *Carbohydrate Res.* 104: 105-120.

- Tempé, J. y Goldman, A.** 1982. Occurrence and biosynthesis of opines. En: Molecular biology of plant tumours. Ed. G. Khal and J. S. Schell. Capítulo 15: 428-449. Academic Press Inc. London LTD.
- Teyssier, C. S., Mougél, C., Nesme X.** 1999. Direct conjugal transfers of Ti plasmid to soil microflora. *Mol Ecol* **8**: 1273-1284
- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.L., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1980. Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**: 729-739.
- Thomashow, L. S., Reeves, S., Thomashow, M. F.** 1984. Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. **81**:5071-5075.
- Thomashow, M. F., Karlinsey, J. E. Marks, J. R., Hurlbert R. E.** 1987. Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. *J Bacteriol* **169**:3209-3216.
- Thompson, D.V., Melchers, L.S., Idler, K.B., Schilperoort, R.A., Nester, E.W.** 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon. *Nucleic Acids Res.* **16**: 4621-4636.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tinland, B., Hohn, B., Puchta H.** 1994. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:8000-8004.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A. M., Hohn B.** 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.* **14**:3585-3595.
- Toro, N., Datta, A., Carmi, O.A., Young, C., Prusti, R.K., Nester, E. W.** 1989. The *Agrobacterium tumefaciens virC1* gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J Bacteriol.* **171**: 6845-6849.
- Toth, I.K., Bertheau, Y., Hyman, L.J., Laplaze, L., Lopez, M.M., McNicol, J., Niepold, F., Persson, P., Salmond, G.P.C., Sletten, A., van der Wolf, J.M., Perombelon, M.C.M.** 1999. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *J Appl Microbiol.* **87**: 5, 770-781.
- Tremblay, G., Gagliardo, R., Chilton, W.S., Dion, P.** 1987. Diversity among opine-utilizing bacteria: identification of coryneform isolates. *Appl Environ Microbiol.* **53**: 1519-1524.
- Unger, L., Ziegler, S. F. Huffman, G. A., Knauf, V. C., Peet, R., Moore, L. W., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1985. New class of limited-host-range *Agrobacterium* mega-tumor-inducing plasmids lacking homology to the transferred DNA of a wide-host-range, tumor-inducing plasmid. *J Bacteriol.* **164**: 723-730.

- US Environ. Prot. Agency.** 1986. Statement of policy; microbial products subject to the Federal insecticide, fungicide, and rodenticide act and the toxic substances control. Act Fed Regist. 51:23313-13.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., Schell J.** 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature 252: 169-170.
- Vanderleyden J., Desair, J., De Meirsmen, C., Michiels, K., Van Gool, A.P., Chilton, M.D., Jen, G.C.** 1986. Nucleotide sequence of an insertion sequence (IS) element identified in the T-DNA region of a spontaneous variant of the Ti-plasmid pTiT37. Nucleic Acids Res. 14: 6699-6709.
- Veluthambi, K., Krishnan, M., Gould, J.H., Smith, R.H., Gelvin, S. B.** 1989. Opines stimulate induction of the vir genes of the *A. tumefaciens* Ti plasmid. J Bacteriol. 171: 3696-3703.
- Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M.J., Lopez, M. M.** 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra- mutant strain K1026. Appl Environ Microbiol 59:309-315.
- Vicedo, B., Lopez, M. J., Asins, M. J., Lopez, M. M.** 1996. Spontaneous transfer of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the nopaline catabolism plasmid of *A. radiobacter* strain K84 in crown gall tissue. Phytopathology 86:528-534.
- Vogel, A. M. y Das A.** 1992. The *Agrobacterium tumefaciens virD3* gene is not essential for tumorigenicity on plants. J Bacteriol 174:5161-5164.
- Von Bodman, S.B., Hayman, G.T., Farrand, S.K.** 1992. Opine catabolism and conjugal transfer Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. Proc Natl Acad Sci USA 89: 643-647.
- Wabiko, H.** 1992. Sequence analysis of an insertion element, IS1131, isolated from the nopaline-type Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Gene 114:229-233.
- Wabiko, H. y Minemura, M.** 1996. Exogenous phytohormone-independent growth and regeneration of tobacco plants transgenic for the *6b* gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10. Plant Physiol. 112: 939-951.
- Wagner, V. T. y Matthyse, A. G.** 1992. Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. J Bacteriol. 174: 5999-6003.
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Zambryski, P.** 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. Cell 38: 455-462.
- Wang, K., Genetello, C., van Montagu, M., Zambryski, P. C.** 1987. Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. Mol Gene Genet 210:38-346.
- Ward, E. R. y Barnes, W. M.** 1988. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. Science 242: 927-930.

- Ward, J.E., Dale, E.M., Christie, P.J., Nester, E.W., Binns, A.N.** 1990. Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid *virB* genes by use of a *vir* promoter expression vector: *virB9*, *virB10*, and *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol.* 172:5187-5199.
- Watson, R.J., Chan, Y-K., Wheatcroft, r., Yang, A-F., Han, S.** 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C4-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J Bacteriol.* 170:927-34.
- Westblom, T.U., Phadnis, S., Langenberg, W., Yoneda, K., Madan, E., Midkiff, B.R.** 1992. Catalase negative mutants of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 11: 522-6.
- Willmitzer, L.; Dhaese, P., Schreier, P. H., Schmalenbach, W., Van Montagu, M., Schell, J.** 1983. Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell* 32: 1045-1056.
- Winans, S. C., Ebert, P. R., Stachel, S. E., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1986. A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8278-8282.
- Winans S.C.** 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiol Rev* 56: 12-31.
- Wood, D. W., Setubal, J. C. Kaul, R. Monks, D. E. Kitajima, J. P. Okura, V. K. Zhou, Y. Chen, L. Wood, G. E. ... Nester, E.W.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* :2001-2328.
- Wright, A.C., Simpson, L.M., Oliver, J.D., Morris, J.G. Jr.** 1990. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* 58: 1769-73
- Yamada, T., Lee, P. D., Kosuge T.** 1986. Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*: nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8263-8267.
- Yanagi, M. y Yamasato, K.** 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett* 107: 115-120.
- Yanofsky, M., Lowe, Montoya, A., Rubin, R., Krul, W., Gordon, M., Nester, E.** 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gene Genet* 201: 237-246.
- Yanofsky, M. F. y Nester E. W.** 1986. Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 168:244-250.
- Yanofsky, M. F., Porter, S. G., Young, C., Albright, L. M., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47: 471-477.

- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H.** 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 89-103.
- Yusibov, V. M., Steck, T. R., Gupta, V., Gelvin S. B.** 1994. Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. Proc Natl Acad Sci USA 91:2994-2998.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Van Montagu, M., Schell, J.** 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. J Mol Biol. 86: 109-127.
- Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K., Goodman, H. M.** 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. J Mol Appl Genet. 1: 361-370.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J.** 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150.
- Zhang, L. y Kerr, A.** 1993. Rapid purification of Ti plasmids from *Agrobacterium* by ethidium bromide treatment and phenol extraction. Lett Appl Microbiol 16:265-268.
- Zhang, L. H., Murphy, P. J. Kerr, A. Tate M. E.** 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. Nature 362:446-448.
- Zhou, C., Yang, Y., Jong, A. Y.** 1990. Miniprep in ten minutes. Biotechniques 8:172-173.
- Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., Winans, S. C.** 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. J Bacteriol 182:3885-3895.
- Zorreguieta, A., Geremia, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A., Nester, E. W., Ugalde, R. A.** 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. Mol Plant Microbe Inter 1:121-127.
- Zuerner, R.L., Herrmann, J.L., Saint Girons, I.** 1993. Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. J Bacteriol. 175: 5445-5451.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P.** 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. The Plant Journal 23: 11-28.



## **ANEXO**

## **ANEXO**

### **Abreviaturas empleadas**

ADN: Ácido Desorribonucleico

ADN-T: ADN Transferente

AFLP: Polimorfismos en los fragmentos amplificados selectivamente por PCR de fragmentos de restricción genómica

ANOVA: Análisis Normalizado de Varianza

ARN: Ácido Ribonucleico

A-T: Contenido en adenina+citosina

BrEt: Bromuro de etidio

Cb: Carbenicilina

Cn: Cloranfenicol

dNTPs: desoxi Nucleótidos Trifosfato

DO: Densidad Óptica

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetraacético

Gm: Gentamicina

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico

IBMCP: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

IS: Secuencia de inserción

IVIA: Instituto valenciano de Investigaciones Agrarias

Kan: Kanamicina

Kb: kilobase

Kv: kilovolts

LB: medio de Luria-Bertani

ml: mililitros

min: minutos

MQ: Agua ultrapura, sistema MilliQ

μl: microlitros

μF: microFaradays

OMG: Organismo Modificado Genéticamente  
ORF: Pauta de lectura abierta  
: ohmios  
pb: Pares de Bases  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
pTi: Plásmido Inductor de Tumores  
PYGA: Medio patata levadura dextrosa agar  
pv: Patovar  
PVP: Polivinil Pirrolidona  
RAPDs: Polimorfismos de ADN amplificados al azar  
REP-PCR: Polimorfismos de ADN mediante iniciadores de secuencias conservadas: ERIC, BOX, REP  
RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción  
rpm: revoluciones por minuto  
SDS: Dodecil Sulfato Sódico  
SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS  
sp: especie  
Str: Estreptomicina  
ta: temperatura ambiente  
TAE: Tampón Tris Acético EDTA  
Tet: Tetraciclina  
Tris: Hidroximetil aminometano  
vir: Región de virulencia  
ufc: unidades formadoras de colonias  
UV: Radiación ultravioleta  
VBNC: Viable pero no Cultivable