



Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMIA



**CARACTERIZACION Y
ELIMINACION DE PLASMIDOS EN
CEPAS NATIVAS DE *R. Loti***

J. MONZA, J. SAN JUAN, J. MERCADO

BOLETIN DE INVESTIGACION N° 15

MONTEVIDEO

1988

URUGUAY

El 'Boletín de Investigación' es una publicación seriada que recoge los resultados de las investigaciones realizadas por el personal académico de la Facultad de Agronomía, una vez que ellos fueron revisados y aprobada su publicación por la Comisión de Publicaciones Científicas. Las solicitudes de adquisición y de intercambio con este Boletín debe dirigirse al Departamento de Documentación, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevideo - URUGUAY.

Comisión de Publicaciones Científicas:

Martín Buxedas, Primavera Azaguirre, Carlos Bentancourt (profesores),

Pablo Fernández (estudiante),

Roberto Malfatti (profesional).

Alicia Torres (comunicadora rural),

Caracterización y eliminación de plásmidos en cepas nativas de *R. loti* / J. Monza, J. Sanjuan, J. Mercado. - - Montevideo: Facultad de Agronomía, 1988. - - 8 p. - - (Boletín de Investigación; 15).

RHIZOBIUM

Monza, J.

Sanjuan, J., coaut.

Mercado, J., coaut.

CDU 576.851.155

CARACTERIZACION Y ELIMINACION DE PLASMIDOS EN CEPAS NATIVAS DE *R. Loti*

J. MONZA*, J. SAN JUAN**, J. MERCADO**.

SUMARIO

En dos cepas nativas de *Rhizobium loti*, T1 y T2, procedentes de aislamientos de suelos del Departamento de Tacuarembó, Uruguay, se encontraron dos plásmidos de igual PM en ambas cepas. En *R. loti* U-226, cepa usada en los inoculantes comerciales, se encontró un único plásmido.

La cepa T1 fue curada por tratamiento con gradiente de temperatura de uno de sus plásmidos, pR1oT1a, obteniéndose en clon mutante, T1b.

No se encontraron diferencias importantes entre las cepas T1, T2 y U-226 en el perfil de proteínas totales, como tampoco entre ellas y la cepa curada.

Palabras clave: *R. Loti*, Plásmidos.

SUMMARY

R. loti U-226, on which are based commercial inoculants for *Louis*, exhibited only one plasmid in agarosa gel, while two native strains of *R. loti*, T1 and T2, isolated from a soil of Tacuarembó (Uruguay), contain two plasmids with the same molecular weight.

T1 was submitted to a gradient of temperature and lost one of its plasmids, pR1oT1a. The partially cured mutant obtained by this way, T1b, hasn't relevant differences in profil total proteins respect to T1, T2 and U-226.

Key words: *R. Loti*, Plasmids

Recibido el 28 de setiembre, 1988

Aceptado el 1 de noviembre, 1988

* Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.

** Departamento de Microbiología, Estación Experimental de Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, España.

INTRODUCCION

La fijación biológica de nitrógeno es responsable de la conversión anual de 10^8 toneladas de nitrógeno atmosférico en amonio. La simbiosis *Rhizobium* leguminosa es responsable del 20% del total (4) lo que avala la indiscutible importancia de estos microorganismos como fijadores de nitrógeno.

La capacidad de fijar nitrógeno depende de un complejo enzimático denominado nitrogenasa.

En la mayoría de las especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido, los genes estructurales de la nitrogenasa (nif), genes de infección y especificidad (nod y hsp) y genes de la fijación de nitrógeno (fix) se encuentran localizados en plásmidos denominados simbióticos (pSym), de peso molecular variable, comprendido entre 50 y 300 Mdal (14).

Los plásmidos, ampliamente distribuidos en procariotas, son moléculas de ADN covalentemente cerrado (ccc) que se replican independientemente del ADN cromosómico y se heredan en forma estable, lo que implica que presenten homogeneidad genética y tamaño constante (8).

Si bien todas las cepas de *Rhizobium* contienen plásmidos en número variable, vinculados a numerosos fenotipos, se desconocen la mayoría de las funciones codificadas por ellos.

Las funciones esenciales para la vida bacteriana no se encuentran codificadas en los plásmidos, pero éstos le confieren a la bacteria caracteres de tipo adaptativo tales como resistencia a antibióticos, tolerancia a pH, a metales pesados, producción de bacteriocinas y la posibilidad de transferencia de material genético a otras bacterias (11).

En especies de *Rhizobium* de crecimiento lento los genes de la simbiosis no parecen estar localizados en plásmidos sino en el cromosoma bacteriano (14).

Para *R. loti*, que nodula *Lotus* sp y otras leguminosas como *Lupinus*, *Ornithopus* y *Anthyllis* (3), esos genes están localizados aparentemente en el cromosoma bacteriano.

Estudios recientes demuestran que *R. loti*, a diferencia de otros *Rhizobium*, al perder su plásmido, por tratamiento con naranja de acridina o por cultivo en gradiente de temperatura, aumenta los niveles de eficiencia en la fijación de nitrógeno (12).

Cuando las bacterias son cultivadas a determinadas temperaturas superiores a su óptimo de crecimiento, se desacopla la replicación del genoma bacteriano (cromosoma y plásmidos) de la división celular. De esta manera pueden obtenerse una variedad de clones en los cuales faltan distintos plásmidos de su genoma original, o bien, parte de su genoma en caso de delección.

En este trabajo se caracterizaron según su perfil de plásmidos y proteínas totales dos cepas nativas de *R. loti*, T1 y T2 y la cepa U-226, usada en los inoculantes comerciales. La cepa T1 fue curada de uno de sus plásmidos por gradiente de temperatura.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas. *R. loti* U-226, es la cepa utilizada en los inoculantes del Plan Agropecuario. Las cepas T1 y T2 proceden de dos aislamientos de suelos del Departamento de Tacuarembó, Uruguay, realizados por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía.

La cepa GR4 de *R. meliloti* usada como referencia para la determinación de PM de plásmidos de *R. loti* procede de la Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C., Granada, España. Esta cepa presenta tres plásmidos de PM 1000, 140 y 115 Mdal.

Medios. Para estudiar el perfil de plásmidos y el de proteínas, los microorganismos fueron crecidos en medio TY: Triptona 5g, Extracto de levadura 3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g, H_2O desionizada 1000 ml, pH 6,8.

Se realizó cura de plásmidos a la cepa T1 que fue crecida en medio YMT: Manitol 1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g, Extracto de levadura 0,25 g, H_2O desionizada 1000 ml, pH 7,0. El mismo medio se solidificó con agar 1,5%.

Perfil de Plásmidos y determinación de PM. Para establecer el perfil de plásmidos los microorganismos fueron crecidos en medio TY toda la noche a 28 °C.

Todos los cultivos en medio líquido se realizaron con agitación a 100 rpm.

La electroforesis vertical se realizó según la técnica de Ekhardt modificada por Hynes *et al.* (2). La electroforesis horizontal se realizó según Plazinski *et al.* (13) y la determinación de PM según Meyer *et al.* (9).

Eliminación de Plásmidos. La cura de plásmidos de la cepa T1 se hizo por gradiente de temperatura (10). Las células se crecieron durante la noche en medio TY a 28 °C a 100 rpm. Un ml (aprox. 10^7 células) se transfirió a un matraz con 100 ml de medio YMT. El cultivo se realizó a 35 °C con agitación a 100 rpm y cada dos días se tomaron alícuotas de 1 ml, una se transfirió a un matraz con 100 ml de medio y se continuó el tratamiento en iguales condiciones. La otra alícuota de 1 ml fue diluida para clonado en cajas de Petri con medio YMT-agar las que se incubaron 48 h a 28 °C. Se repitió la misma operación a las 72 horas.

Cada colonia se suspendió en 5 ml de medio TY y se guardó el duplicado de los clones en la otra caja de Petri. Las colonias suspendidas en medio TY se incubaron una noche a 28 °C para luego realizar la detección de plásmidos por electroforesis.

Perfil de Proteínas en geles de Poli(acrilamida)-SDS. Las cepas U-226, T1, T2 y T1b, se crecieron en medio TY hasta fase exponencial tardía a 30 °C, se centrifugaron a 12.000 xg durante 20 min, se lavaron con búffer TRIS-HCl 10 mM pH 7.0 conteniendo Sarkosyl 0,01% (p/v). Las muestras se preparon según Wright *et al.* (15).

Las electroforesis en geles de Poli(acrilamida)-SDS se realizaron según Laemmli (6). Los geles concentrador y separador contenían 4,8 y 12,5% de acrilamida respectivamente. El teñido se realizó con azul de Coomasie y se usaron como referencia proteínas de PM conocido (SIGMA).

RESULTADOS Y DISCUSION

El perfil de plásmidos por electroforesis en agarosa mostró la presencia de dos plásmidos en las cepas nativas de *R. loti* T1 y T2 en tanto que en la cepa U-226 se encontró un único plásmidos como está referido en la bibliografía para esta especie (1, 11 y 12) Fig. 1.

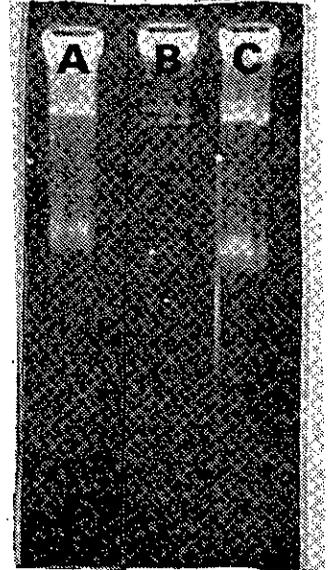


Fig. 1 - Electroforesis horizontal en gel de agarosa 0,7% de plásmidos de las cepas U-226 canal a, T1 canal b y T2 canal c. Las cepas T1 y T2 muestran igual perfil plasmídico. La cepa U-226 presenta un sólo plásmido.

La electroforesis horizontal fue usada para los análisis rápidos de plásmidos dada la sencillez de esta técnica y el mayor número de pocillos por gel. Para la determinación de PM se usó electroforesis vertical dado el mayor grado de resolución que presenta.

Las cepas T1 y T2 presentan plásmidos del mismo PM, 400 Mdal el plásmido mayor y 120 Mdal el plásmido menor. La cepa U-226 presenta un único plásmido de 140 Mdal. Los PM fueron calculados en base a los plásmidos de referencia de *R. meliloti* GR4 de PM conocido, Fig. 2.

Si bien los pesos moleculares de los plásmidos estudiados se encuentran dentro del rango de los pSym, en *R. loti*, los genes responsables de la simbiosis parecen ser cromosómicos (1 y 11).

El perfil de proteínas realizado en las cepas T1, T1b, T2 y U-226 es en términos generales similar entre todas ellas. Cabe observar que en la región comprendida entre 24 y 29 Kdal se encuentra la diferencia en el patrón proteico entre la cepa T1 y T1b y en la misma región aparece una banda diferente entre T1 y T2. Electroforesis con gel en gradiente podría aclarar el problema. En el caso de la cepa U-226 comparada con las anteriores se observan diferencias poco relevantes desde valores inferiores a 14 Kdal hasta 29 Kdal, Fig. 3.

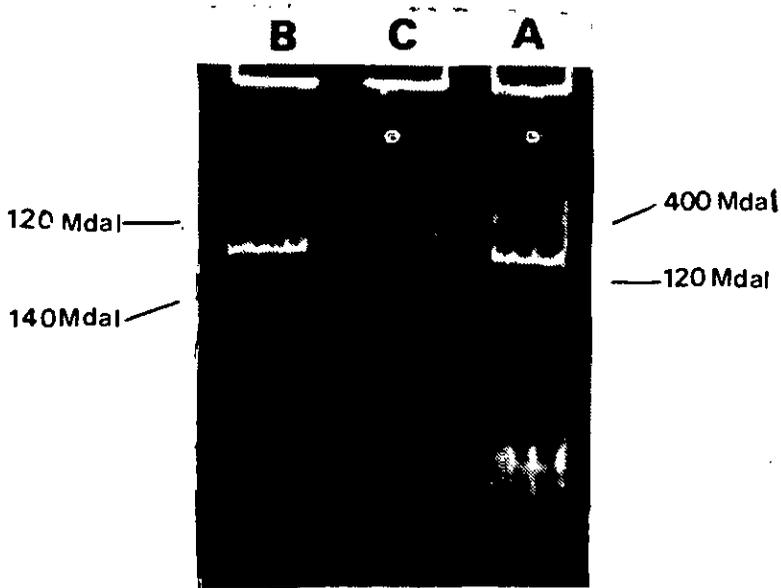


Fig. 2. - Electroforesis vertical en gel de agarosa 0,7%. Cepa T1 canal a, cepa T1b (curada) canal b, cepa U-226 canal c y cepa T2 canal d.

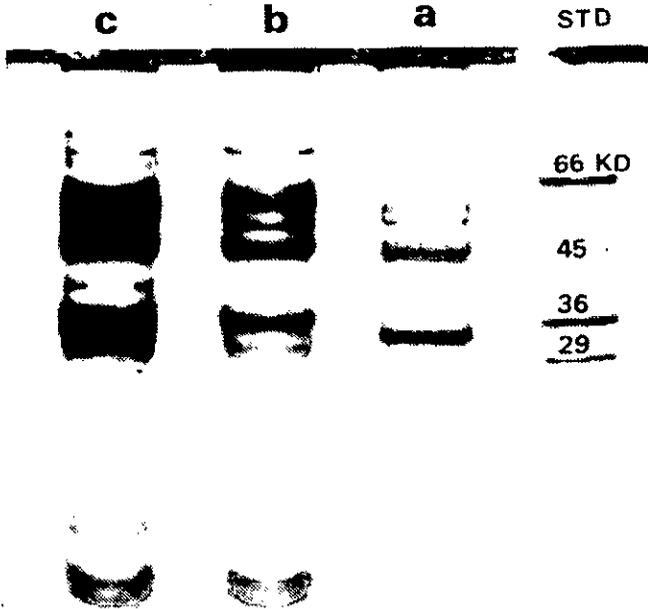


Fig. 3 - Electroforesis en Poliacrilamida-SDS de proteínas totales de *R. loti*, cepa T2 canal a, cepa T1 canal b, cepa curada T1b canal c, cepa U-226 canal d y estandar canal e.

Otras pruebas deben ser ensayadas para establecer si T1 y T2 son efectivamente dos cepas diferentes ya que el perfil de plásmidos y proteínas no son por sí solos concluyentes.

En general la pérdida de plásmidos trae como consecuencia deficiencias en la nodulación o en la fijación de nitrógeno. Trabajos realizados con la cepa USDA 206 de *R. fredii* que nodula *Glicine max* indica que la cura de plásmidos deriva en la reducción o pérdida de algún factor necesario para la nodulación (7).

Sin embargo, el derivado curado del plásmido de *R. loti* de la cepa NZP 2037 (cepa NZP 4010) muestra un significativo aumento en la eficiencia en la fijación de nitrógeno en simbiosis con *L. pedunculatus* respecto a la cepa no curada. Dos cepas salvajes (Nueva Zelandia) que no contienen plásmidos, NZP 2014 y NZP 2042 evidenciaron mayor capacidad en la fijación de nitrógeno respecto a NZP 2037 en *L. pedunculatus* (11).

Por gradiente de temperatura obtuvimos un mutante de *R. loti*, T1b, curado de su plásmido mayor, pR1oT1a, al cuarto día de cultivo a 35 °C en agitación, en 38 colonias revisadas por electroforesis, Fig. 2.

Se ensaya ahora la obtención de mutantes a partir de cepas nativas de *R. loti*, con distintas combinaciones plasmídicas, para evaluar eficiencia en la fijación de nitrógeno de las cepas curadas en la simbiosis con *Lotus* sp.

COMENTARIO

Es destacable la presencia de dos plásmidos y no uno como está referido para *R. loti* en general.

De todas maneras, la presencia de dos plásmidos del mismo PM y un perfil de proteínas similar entre los dos aislamientos estudiados, T1 y T2, no es suficiente para considerar que sean cepas distintas por lo que otros ensayos se realizan en estos momentos.

Si bien el aumento en la capacidad de fijar nitrógeno en la simbiosis *R. loti* - *Lotus* sp es reportado para cepas curadas de su plásmido, se debe considerar si la eliminación del o los plásmidos no trae aparejada la pérdida de alguna función adaptativa tal como tolerancia a pH y resistencia a antibióticos entre otras.

Son necesarias evaluaciones posteriores a nivel de campo para establecer si la variación genética lograda por la eliminación del gemoma plasmídico no produce cambios no deseados en el comportamiento ecológico de las cepas nativas que en condiciones de laboratorio pueden no evidenciarse.

Tratamiento por gradiente de temperatura permitirá obtener clones con distintas combinaciones de plásmidos a efectos de estudiar las características codificadas por ellos, como diferentes habilidades en la fijación de nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

Instituto de Cooperación Iberoamericana (I.C.I.) por el financiamiento de la beca en la Estación Experimental del Zaidín, Granada, España.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por permitir trabajar en los laboratorios de su dependencia.

A. Arias y E. Fabiano, División Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por sus sugerencias y asesoramiento en el perfil de proteínas.

Facultad de Agronomía, P. Irisarri y P. Díaz, Cátedra de Bioquímica por sus múltiples y constantes colaboraciones y a A. Baraibar de la Cátedra de Microbiología por el suministro de las cepas nativas.

S. Duarte, por el dactilografiado del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. CHUA, K. *et al.* Isolation and characterization of Transposon Tn5 induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. *Journal of Bacteriology* 162:335-343. 1985
2. HYNES, M.; SIMON, R.; and PULHER, A. The development of Plasmid-free strain of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* Plasmid to eliminate pAtc58. *Plasmid* 13:99-105. 1985.
3. JARVIS, B.; PANKHURST, C.; and PATEL, J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32:378-380. 1982.
4. JOHNSTON, A. *et al.* Plasmid and the *Rhizobium*. *Legume Symbiosis. Plasmid of medical Environmental and Commercial Importance*. Holland, Timmis and Puhler, 1979.
5. LABANDERA, C. and SICARDI, M. Quality control of commercial inoculants Legumes in Uruguay. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 20:153-160. 1978.
6. LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 1970.
7. MATHIS, J.; BARBOUR, W. and ELKAN, G. Effect of Sym Plasmid curing on symbiotic Effectiveness in *Rhizobium fredii*. *Applied and Environmental Microbiology* 49:1385-1388. 1985.
8. MERCADO, J. Demostración por métodos directos de algunas propiedades atri-

- buidas al plásmido pRmeGR4b1 de *Rhizobium meliloti*. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de ciencias, 1987.
9. MEYERS, J. *et al.* Simple Agarose Gel Electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid Deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 127:1529-1537. 1976.
 10. MORRISON, N. *et al.* Heat curing of a Sym plasmid in a fast growing *Rhizobium sp.* That is able to nodulate legumes and the nonlegume *Parasponia sp.* *Journal of Bacteriology* 153:527-531. 1983.
 11. OLIVARES, J. Estudios genéticos en *Rhizobium*. In Universidad de Sevilla. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Avances en la Fijación Simbiótica del nitrógeno atmosférico. España, 1987.
 12. PANHURST, C.; MAC DONALD, P. and REEVES, J. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by Plasmid-cured Derivative of *Rhizobium loti*. *Journal of General Microbiology* 132:2321-2328. 1986.
 13. PLAZINSKI, J.; CEN, Y. and ROLFE, B. General method for the identification of Plasmid Species in Fact-Growing Soil Microorganisms. *Applied and Environmental* 48:1001-1003. 1985.
 14. RUIZ ARGUESO, T. y TORO, N. Genética de la Fijación biológica de nitrógeno. *In* Introducción a la Ingeniería Genética. 189-209, C.S.I.C. Madrid. 1987.
 15. WRIGHT, S.; FOSTER, J. and BENNETT, O. Production and use of Monoclonal Antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Applied Environmental Microbiology* 52:119-123. 1986.