

## Tesis de Posgrado

# Estudio genético del factor colicinógeno Col B y de su relación con la fertilidad

Puig, Juan

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Puig, Juan. (1963). Estudio genético del factor colicinógeno Col B y de su relación con la fertilidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1141\\_Puig.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1141_Puig.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Puig, Juan. "Estudio genético del factor colicinógeno Col B y de su relación con la fertilidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1141\\_Puig.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1141_Puig.pdf)



FOYB

TRABAJO DE TESIS: Estudio Genético del Factor Colicínógeno Col<sup>+</sup>B y de su relación con la fertilidad.

AUTOR: Juan Puig

DIRECTOR: José Luis Reissig

B E S U M E N

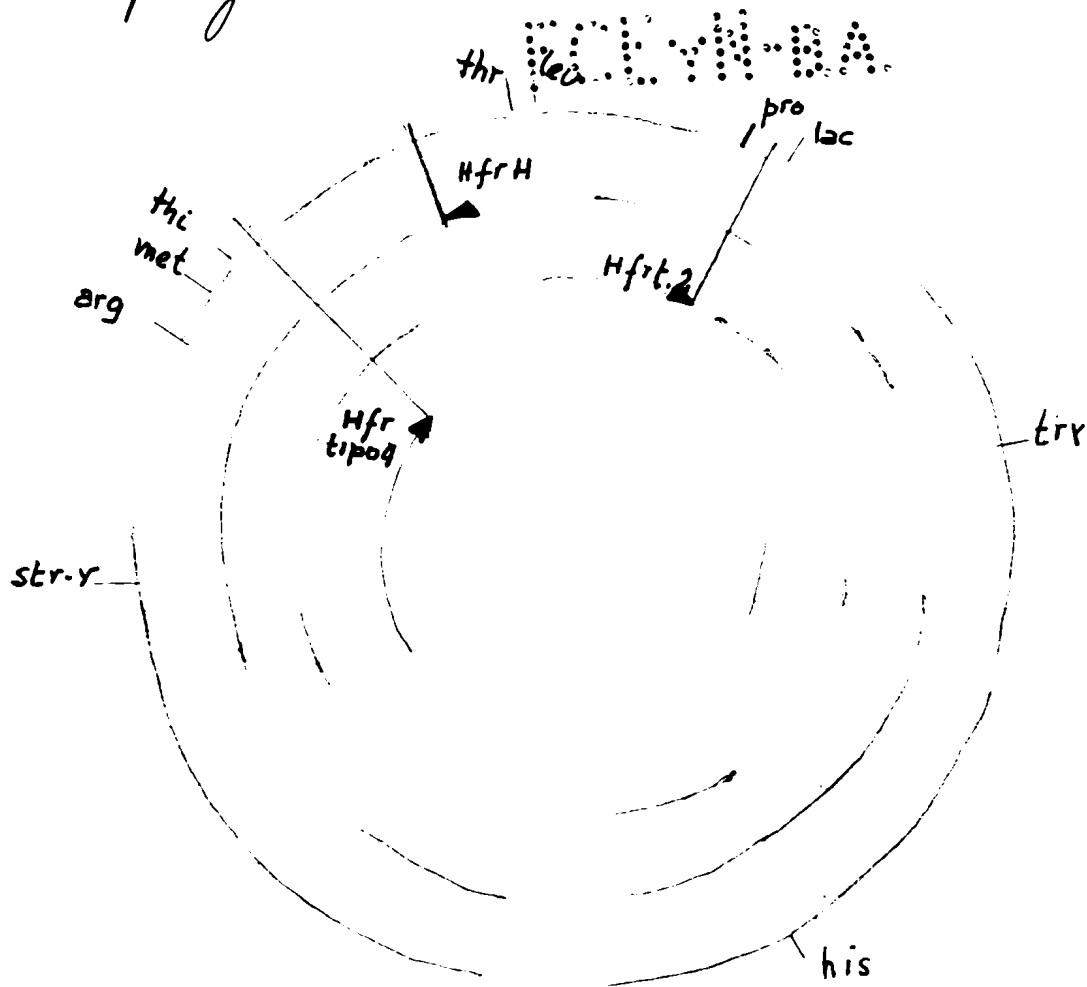
Se estudió el comportamiento del factor Col<sup>+</sup>B en E. Coli K<sub>12</sub> utilizando las HfrH, Hfr2 y Hfr4, la F<sup>+</sup> y la PA309. Se efectuaron cruzamientos Col<sup>+</sup> x Col<sup>-</sup>, Col<sup>-</sup> x Col<sup>+</sup> (en proporción 1:20 y 20:1), y se comprobó que Col<sup>+</sup>B se transfería a frecuencias similares tanto en las Hfr (donantes) de distinta polaridad como en las F<sup>+</sup>; que Col<sup>+</sup>B no se transfería a las F<sup>-</sup>Col<sup>+</sup>; que ColB no presentaba ligamiento con ningún marcador cromosómico en los recombinantes recuperados de los cruzamientos Col<sup>+</sup> x Col<sup>-</sup> y que no había muerte de cigotas atribuible al pasaje de Col<sup>-</sup> al citoplasma Col<sup>+</sup> de la F<sup>-</sup>. Por lo tanto se consideró también que Col<sup>+</sup>B era un plásmido.

Los cruzamientos Col<sup>+</sup> x Col<sup>-</sup> y los cruzamientos Col<sup>+</sup> x Col<sup>+</sup> presentan una marcada esterilidad en lo relativo a la transferencia de marcadores cromosómicos, no así en relación con los plásmidos. Las F<sup>+</sup> pierden totalmente su capacidad de transferir cromosoma, no así la Hfr, que aunque su fertilidad está muy disminuida mantiene su polaridad original. Las Hfrs de muy baja frecuencia de transferencia de marcadores cromosómicos pueden ser enriquecidas en su condición de Hfr, pero rápidamente vuelven a su frecuencia de transferencia original. Los cruzamientos Col<sup>-</sup> x Col<sup>+</sup> transfieren cromosoma como los Col<sup>-</sup> x Col<sup>-</sup>. Se plantean dos hipótesis para explicar esta situación.

JUAN PUIG

R. de Tesis: 1191

Mapa genético de *Escherichia coli* n° 12



Tomado de Wollman y Jacob, 1959; Taylor y Adelberg 1960  
 el círculo mas exterior se indican las abreviaturas de los  
 los marcadores. En los círculos interiores las indicaciones de  
 orígenes y polaridad de cada Hfr. (23), (24)

## C A P I T U L O I

### 1 - INTRODUCCION

- A)-Generalidades y naturaleza de las colicinas
- B)-Problemas sobre el control Genético de las colicinas
- C)-Relaciones entre colicinas y bacteriófagos
- D)-Relaciones entre el factor F y los factores colicinógenos
- E)-Relación entre los factores colicinógenos y los factores de resistencia a las drogas.-
- F)-Motivos para realizar el presente trabajo

### 2 - CEPAS UTILIZADAS

- A)-Lista de las cepas.
- B)-Lista de las abreviaturas utilizadas en la tesis.
- C)-Mapa genético de *Escherichia coli* K<sub>12</sub>.

### 3 - MATERIALES Y METODOS

## I N T R O D U C C I O N

### A) Generalidades y Naturaleza de las Colicinas.-

Las colicinas son sustancias producidas por ciertas cepas de enterobacteriaceas que ejercen marcada acción letal sobre otras cepas de bacterias de la misma familia, sensibles a la acción de la colicina considerada. Gratia (1) en 1925 observó por primera vez que filtrados libres de células, provenientes de un cultivo de una cepa aislada del colon, *E. Coli*  $\phi$ , contenían un agente letal para otras bacterias del mismo origen. A ese agente le llamó: agente V.

Existen numerosas colicinas distintas, en cuanto a los espectros de actividad, movilidad electroforética difusión en agar etc.. Todas ellas dan la reacción positiva para la unión peptídica. Las enzimas proteolíticas las atacan provocando la pérdida de la actividad letal.

Goebel, W.F. et al, 1955 (2) estudiaron la colicina K por diversas técnicas de purificación, y obtuvieron una sustancia de elevado peso molecular, que no pudo ser separada del antígeno O, y tenía una marcada acción letal. Su constitución química era la de un complejo lípido-carbohidrato-proteína. Hutten y Goebel (3) consiguieron purificar también la colicina V, encontrando para ella, la misma relación con el antígeno somático que para la K, y la consideraron también un lípido-carbohidrato-proteína.

Rüdi E. y Goebel (4) atribuyen la actividad biológica de la colicina K a su fracción proteica.

### B ) Problemas sobre el Control Genético de las Colicinas.

Las cepas productoras de colicinas, llamadas cepas colicinógenas, mantienen esa condición a través del tiempo con gran estabilidad. La cepa original de Gratia, E.Coli  $\phi$ , aun hoy produce colicina luego de haber sufrido innumerables subcultivos.

Una cepa no productora de colicina, Col<sup>-</sup>, puede hacerse colicinógena por cultivo mixto con otra cepa que la produzca (5). Ninguna cepa Col<sup>-</sup> adquiere por mutación la condición colicinógena, Col<sup>+</sup>. Fredericq & Betz-Bareau (6) realizaron cruzamientos del tipo  $F^+Col^+ \times F^-Col^-$  y  $F^+Col^- \times F^-Col^+$ . En los primeros encontraron pasaje de la condición Col<sup>+</sup> de las  $F^+$  a las  $F^-$ ; pero nunca encontraron pasaje de Col<sup>-</sup> de las  $F^+$  a las  $F^-$ . De ello dedujeron que la condición colicinógena estaba condicionada a la presencia de un factor genético, y que este estaba ubicado en el citoplasma bacteriano.

Posteriormente Alfoldi et al, (7) trabajando con el factor Col<sup>+</sup>  $E_1$  encontraron:

1°) Que en los cruzamientos  $F^+ \times F^-$  la situación era la descrita por Fredericq.

2°) En los cruzamientos Hfr. Col<sup>+</sup>  $\times F-Col^-/E_1$  se transfería con una frecuencia que era peculiar a cada Hfr.

3°) En los cruzamientos recíprocos  $\text{Col}^-$  no se transfería de la Hfr  $\text{Col}^-$  a la  $\text{F}^- \text{Col}^+$ , pero las cigetas morían con una frecuencia relativa similar, a la que cada Hfr transfería  $\text{Col}^+ \text{E}_1$  en los cruzamientos primitivos.

A este último fenómeno le denominaron cigosis letal. Dedujeron entonces, que el factor estaba integrado en las Hfr en una ubicación cromosómica entre treonina leucina por un lado y metionina por el otro; en cambio en las  $\text{F}^+$  y  $\text{F}^- \text{Col}^+ \text{E}_1$  era autónomo. Por todo eso lo consideraron un episoma. R.N. Zwaig et al (8) estudiando los factores  $\text{Col} \text{E}_2$ ,  $\text{Col} \text{I}$ , y  $\text{Col} \text{V}$  utilizando distintas Hfr y  $\text{F}^+$ , encontraron:

1°) Que cada factor se transfería con una frecuencia peculiar, no relacionada ni con la  $\text{F}^+$  ni con la polaridad de la Hfr considerada.

2°) Que ninguno de los factores estaba integrado al cromosoma, ni en las  $\text{F}^+$ ,  $\text{F}^-$  ó Hfr.

3°) Que  $\text{Col}^-$  no se transfería, y que no había cigosis letal. De ello dedujeron que esos factores eran extracromosómicos y que debía considerárseles como plásmidos. Posteriormente R.N. Zwaig encontró esta misma situación para  $\text{Col}^- \text{E}_1$  (9). Dato confirmado también por Clowes (10).

### C) Relaciones entre colicinas y bacteriófagos.

Las colicinas como los bacteriófagos matan a la cé-



lula previa fijación sobre receptores específicos. La pérdida de esos receptores provoca la aparición de la condición de resistencia en las bacterias, a los agentes específicos. Los receptores para el fago  $T_6$  y la colicina K son comunes. También tienen receptores comunes  $T_5$  y colicina B. Geobel et al (2) demostraron que la proteína del fago  $T_6$  y la colicina K no dan reacción serológica cruzada cuando se los utiliza como antígenos. En cambio las curvas de absorción de rayos X son similares para ambas. (11)

Las colicinas matan a las células de una manera comparable a la de los cuerpos proteicos de los fagos virulentos. En cambio las cepas que se hacen colicinógenas, presentan propiedades comunes con las lisógenas: se hacen inmunes como éstas, al adquirir la condición de colicinogenicidad. Pero el fenómeno de inmunidad no es exactamente igual en los dos casos. Las células inmunes, resisten a la acción de la colicina proveniente del medio, y a la vez impiden la producción de colicina en su interior, en cambio en las lisógenas el fenómeno de inmunidad impediría la división del DNA del fago, interno o sobre infectante.

Sólo unas pocas células, en una cepa colicinógena, producen colicina: y mueren como resultado de esa síntesis. Este mismo ocurre con las células de las cepas lisógenas: las pocas células que maduran fago mueren.

Como las cepas lisógenas, también las colicinógenas pueden ser inducidas a producir colicina masivamente, por tratamiento con luz ultravioleta u otros agentes similares (12). Los factores colicinógenos que tienen esta propiedad se llaman inducibles.

Cuando la colicina se adsorbe sobre la pared de las bacterias sensibles, el metabolismo bacteriano se detiene rápidamente y luego las células mueren (11). Cuando el bacteriófago se adsorbe la bacteria detiene su síntesis, pero luego continúa fabricando los elementos que integran el cuerpo viral. Una vez que los fagos maduran, la bacteria se lisa.

Los factores colicinógenos en síntesis, presentan ciertas semejanzas con los profagos. Pero, en lugar de provocar la síntesis de elementos infectantes de estructura compleja (virus), sintetizan una sustancia letal que estaría relacionada fisiológicamente con la proteína letal de los fagos virulentos.

Todos estos datos llevaron a Fredericq a formular las siguientes hipótesis, respecto de la relación entre fagos y colicinas (11).

- a) Los factores colicinógenos serían la forma atemperada de los fagos virulentos. Ellos solo habrían conservado la propiedad de producir la proteína letal.
- b) Que los factores colicinógenos serían un puente entre los bacteriófagos virulentos y los atemperados.

Sin duda que los datos actuales impiden pronunciarse por alguna de las dos posibilidades.

D) Relación entre los factores colidnógenos y el factor F.

En una reciente publicación, Fredericq (13), ha demostrado que los factores Col<sup>+</sup> V, Col B y F se transfieren juntos. Contraseleccionando con estreptomocina estudió 1410 recombinantes Met<sup>1</sup>, e Try<sup>+</sup> de un cruzamiento F<sup>+</sup> Col<sup>+</sup> V Col<sup>+</sup> B y F<sup>+</sup> Col<sup>+</sup> V Col B<sub>1</sub> x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup>, con los siguientes resultados:

617 Col<sup>+</sup> V ó Col<sup>+</sup> B todos eran F<sup>+</sup>

783 Col<sup>-</sup> V ó Col<sup>-</sup> B todos eran F<sup>-</sup>

Además consiguió resaislar de entre los recombinantes una Hfr de polaridad Ky-M1-Met-Pro-Try-His-Str que tenía el factor Col<sup>+</sup> B adosado a la parte distal del cromosoma. De ello dedujo que había ligamiento entre F<sup>+</sup>, Col<sup>+</sup> B y Col<sup>+</sup> V.

Por otra parte, Stocker et al (14), trabajando con la cepa LT2 de Salmonella typhimurium encontraron que cuando se sembraban juntas células Col<sup>+</sup> I, en defecto, con células Col<sup>-</sup> I en exceso, se apreciaba una marcada velocidad de transferencia del factor Col<sup>+</sup> I. A estos sistemas de alta transferencia de Col<sup>+</sup> I, les llamaron HFC (high-frequency-colicinogeny-transferring). El fenómeno se explica admitiendo que cada célula que recibe el factor Col<sup>+</sup> I se transforma inmediatamente en un eficiente transmisor del mismo. Ello sería debido según los autores, a que en las células recién hechas Col<sup>+</sup> I, la célula adquiriría polaridad sexual, en cambio en las formas estabilizadas podría suceder que el factor se mantuviese integrado, perdiendo la célula su polaridad. Las células de alta eficiencia

de transmisión de Col<sup>+</sup>I mantienen esta condición durante unas pocas generaciones.

Anteriormente, Furnes y Rowley (15) observaron que Col<sup>+</sup>I siempre estaba asociado con F<sup>+</sup> en las cepas Col<sup>+</sup>I que ellos aislaban. Por lo tanto según los casos, Col<sup>+</sup> sería homólogo de F<sup>+</sup>, o cumpliría funciones similares.

**B) Relación entre la fertilidad y los factores de resistencia a las drogas.-**

Watanabe T. et al, encontraron disminución de la fertilidad con cepas portadoras de factores de resistencia múltiple a ciertos antibióticos (R.F.), aún cuando Yagido Y. e Hirata Y. han aislado un tipo de cepa resistente múltiple, capaz de dar fertilidad. Estos factores se comportarían de manera similar a la que le hace Col B en E. coli y Col I en Salmonella respectivamente. (16, (17).

**F) Motivos para realizar el presente trabajo:**

En primer término era necesario conocer con exactitud si el factor Col B se comportaba como un plasmido o como un episoma. Por otra parte Fredericq y Bets-Bareau (18) estudiando el comportamiento de los factores colicinógenos FR, B, K, S<sub>3</sub>, en cruzamientos F<sup>+</sup>Col<sup>+</sup> x F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup> y F<sup>+</sup>Col<sup>+</sup> x F<sup>-</sup>Col<sup>+</sup> se encontraron con una gran esterilidad para los cruzamientos citados en espe

cial los que se efectuaron con el factor colicinógeno B. Se consideró oportuno realizar un estudio más intenso y detallado respecto de las características de este fenómeno de esterilidad. Para ello se decidió conocer cual era la situación en los cruzamientos a alta frecuencia. Además era necesario comprobar si el efecto de esterilidad era un fenómeno esporádico<sup>o</sup> habitual.

En este último caso el estudio de la naturaleza del fenómeno podría resultar fructífera.

## 2 - CEPAS UTILIZADAS

## A) Lista de las cepas.

Tabla 1 Cepas utilizadas

Nombre	Características	Origen	Referencias
E. Coli K <sub>12</sub>			
12-98	Col <sup>+</sup> B Str-s met <sup>-</sup>	x	
112	Col <sup>+</sup> B Str-s	x	
58-161	Met- Str-r F <sup>-</sup>	---	Tatum y Lederber(1947)
HfrH	thi <sup>-</sup> Str-s		Hayes (1953) (19)
Hfr tipo 4	thr <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> thi <sup>-</sup> Str-s C-600		Jacob y Wollman (1957) (20)
Hfr tipo 2 met <sup>-</sup>	Str-s	58-161	Jacob y Wollman (1957) (20)
112	lys <sup>-</sup> his <sup>-</sup> Str-s F <sup>+</sup>	---	Wollman (1953) (21)
PA 3 <sup>09</sup>	thr <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> thi <sup>-</sup> his <sup>-</sup> try <sup>-</sup> arg <sup>-</sup> Str-r F <sup>-</sup>	P 678	Str-r Jacob y Wollman (1958) (22)
<b>Bacteriophage</b>			
P <sub>1</sub>		&	

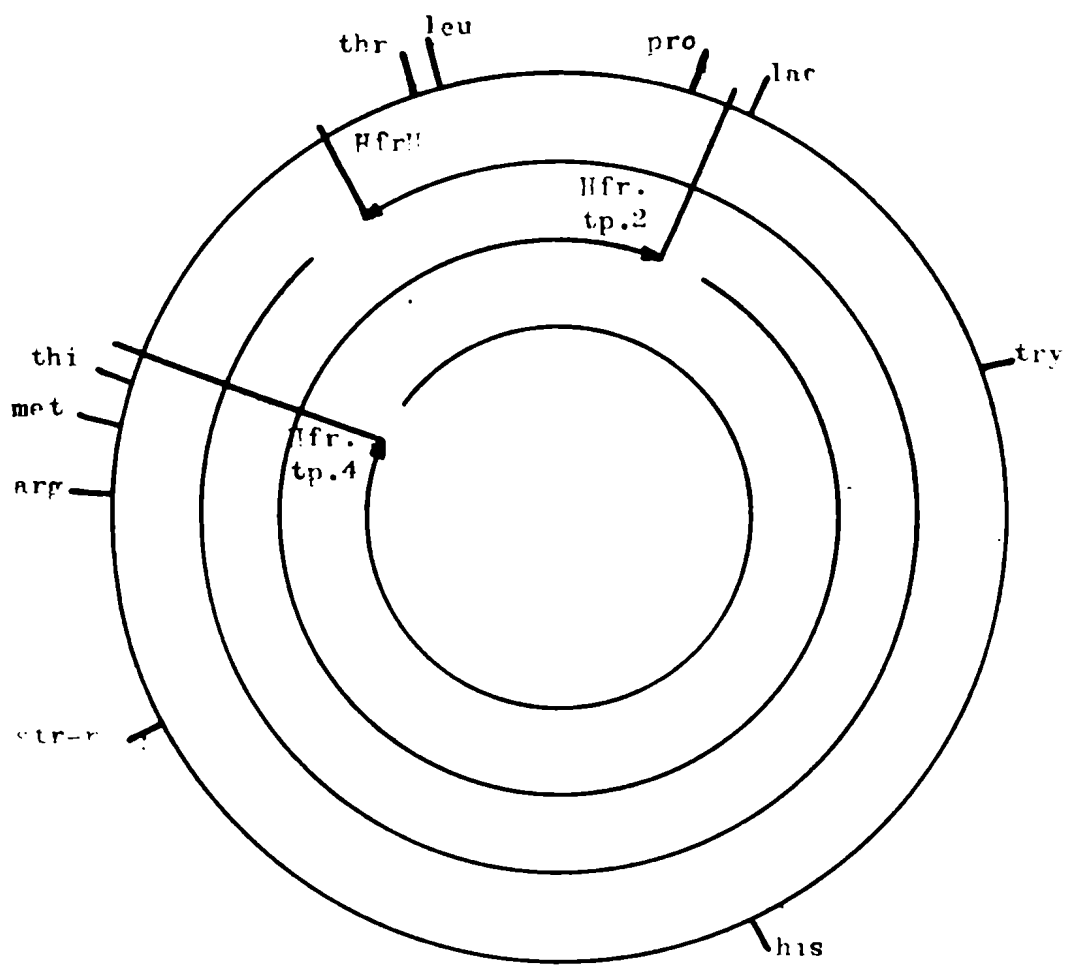
---

x-Estas cepas fueron enviadas por el Cold Spr. Harbor, que  
proviene del Dr. P.Frederick.

&-Este bacteriophage fué enviado por el D.P. Amati del M.I.T.

---

GENÉTICO DE ESCHERICHIA COLI K<sub>12</sub>



Tomado de Wollman y Jacob, 1959; Taylor y Adelberg, 1960. En el círculo mas exterior se indican las abreviaturas de los distintos marcadores. En los círculos interiores las indicaciones de los orígenes y polaridad de cada Hfr. (23), (24).

## B- Lista de las abreviaturas utilizadas en la tesis:

thr: treonina	cys: cisteina	thr <sup>+</sup> : sintetisa thr
leu: leucina	pro: prolina	thr <sup>-</sup> : requiere thr
try: triptofano	thi: vitamina B <sub>1</sub>	Col <sup>+</sup> : produce colicina B
his: histidina	Str-s: sensible a la estreptomicina	Col <sup>-</sup> : no produce colicina B
arg: arginina	Str-r: resistente a la estreptomicina	/B : resitente a la colicina B
met: metionina		

## 3º) MATERIALES Y METODOS.

Todas las cepas que se hicieron Col B, lo fueron a partir de la cepa 12-98 Col<sup>+</sup>B, del siguiente modo: dos cultivos, uno de la donante Col<sup>+</sup>B y otro de la receptora Col<sup>-</sup>B se pusieron a desarrollar; el primero hasta su fase exponencial, y el segundo hasta agotar su crecimiento. Luego se mezclaron alícuotas de ambos y se incubaron juntos durante 8 horas. Una porción de la mezcla se sembró en caja de Petry por triple capa (25), sobre un medio adecuado para seleccionar la cepa receptora. La F<sup>-</sup> se hizo Col<sup>+</sup> a partir de la HfrH Col<sup>+</sup>B. Además también se hicieron Col<sup>+</sup>B la PA 309 y la HfrH, por transducción con fago P<sub>1</sub> multiplicado sobre la cepa 112 Col<sup>+</sup>B.

En los experimentos de recombinación se procedió del siguiente modo: los cultivos de la Hfr. o de la F<sup>+</sup> por un lado, y los de la F<sup>-</sup> por otro, se hicieron desarrollar en estufa a 37°C, cuando ambos llegaron a la fase exponencial de cre



cimiento, alcanzando una concentración de aproximadamente 1 a  $2 \times 10^8$ , se igualaron sus concentraciones y se mezclaron en proporción de 1 donante a 20 receptoras, o de 20 donantes a 1 receptora en un volumen final de 2 ml de mezcla, incubándose a  $37^\circ\text{C}$  en erlenmeyers de 150ml. Cuando se requirieron mayores volúmenes se utilizaron recipientes que permitieron mantener la misma relación de superficie a volumen de líquido. Todas las mediciones se efectuaron a los 90 minutos de realizada la mezcla. Al cabo de ese tiempo, diluciones convenientes de alícuotas de la mezcla, se sembraron en cajas que contenían medio sintético de Davis adicionando de los aminoácidos correspondientes para seleccionar los recombinantes deseados; y sobre cajas de Petry que contenían Agar nutritivo y estreptomicina para medir frecuencia de transferencia de Col<sup>+</sup>B por el método de la triple capa. Para medir Col<sup>+</sup>B entre los recombinantes se picaban colonias bien aisladas y se las volvía a sembrar sobre agar Str, a razón de 25 colonias por caja, volcándosele la indicadora al día siguiente, luego de haber matado las colonias con cloroforme.

Las frecuencias de recombinantes, así como las frecuencias de transferencia de Col<sup>+</sup>B, se midieron a los 90 minutos, y se obtuvieron dividiendo la concentración de los recombinantes en cuestión, por la concentración de la cepa parental en defecto, y multiplicando por 100.

Los experimentos de interrupción se efectuaron tomando muestras de la mezcla en conjugación a los tiempos convenientes y sometiéndolas a fuerte agitación mediante una licuadora durante 1 minuto, Wellman y Jacob (26).-

## C A P I T U L O    I I

1 - CRUZAMIENTOS  $\text{Col}^+ \times \text{Col}^+$ 

A) Cruzamientos Hfr  $\text{Col}^+ \text{B} \times \text{F}^- \text{Col}^- \text{B}$ , y  $\text{F}^+ \text{Col}^+ \text{B} \times \text{F}^- \text{Col}^- \text{B}$

B) Tiempos de entrada de  $\text{Col}^+ \text{B}$ .

C) Cinética de la transferencia de  $\text{Col}^+ \text{B}$

## 2 - ANALISIS DE LOS RECOMBINANTES

## 3 - CONCLUSIONES.

A) Cruzamientos Hfr Col<sup>+</sup>B x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup>/B y F<sup>+</sup>Col<sup>+</sup>B x F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup>/B

El objeto de estos cruzamientos fué, determinar la frecuencia de transferencia del factor Col<sup>+</sup>B en cada uno de ellos. Además se midió la frecuencia de transferencia del primer marcador en cada Hfr y la frecuencia de transferencia del primer marcador en cada F<sup>+</sup> y la frecuencia de transferencia de marcadores cromosómicos en la F<sup>+</sup>. Todos los cruzamientos fueron comparados con los testigos Col<sup>+</sup>B x Col<sup>+</sup>B/B Col<sup>-</sup>B x Col<sup>-</sup>B/B. Todas las F<sup>-</sup> se hicieron previamente resistentes a la colicina para prevenir cualquier distorsión de los resultados por muerte de células sensibles a la acción de la colicina B de las donantes.

Los cruzamientos y las mediciones se efectuaron de acuerdo con las técnicas descritas en la página nº // . Debe entenderse que todas las mediciones se efectuaron a los 90 minutos de iniciada la mezcla. Los resultados se sintetizan en la tabla nº 2.

A primera vista se puede observar, un marcado descenso de la fertilidad en todos los cruzamientos Col<sup>+</sup>B x Col<sup>-</sup>B/B en lo relativo a marcadores cromosómicos. Esa misma situación se encuentra en los cruzamientos Col<sup>+</sup> x Col<sup>+</sup>. La interpretación de este fenómeno se discute en el Cap. V. Las frecuencias de transferencia del factor Col<sup>+</sup>B varían dentro de cifras del mismo orden, tanto entre las Hfr de distinta polaridad como en la F<sup>+</sup>.

T A B L A N° 2

Frecuencia de transferencia de Col<sup>+</sup>B en los cruzamientos: A) Hfr Col<sup>+</sup>B x F-Col<sup>-</sup>B/B, y B) F<sup>+</sup>Col<sup>+</sup>B x F Col<sup>-</sup>B/B. Los cruzamientos se efectuaron en la proporción de 1 célula donante a 20 receptoras, y las frecuencias se midieron a los 90 minutos de efectuada la mezcla.

A)

	CRUZAMIENTOS	Frecuencia de células ColB str-r	Frecuencia del primer marcador en cada Hfr.	
			thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	ARG <sup>+</sup> str-r
Control	HfrH Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>-</sup> B/B	29%	0,03%	
	(HfrH Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>+</sup> B/B	--	0,01%	
	HfrH Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>-</sup> B/B	--	24%	
Control	Hfrtip.2 Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>-</sup> B/B	50%	0,005%	
	(Hfrtip.2 col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>+</sup> B/B	--	0,001%	
	Hfrtip.2 Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>-</sup> B/B	--	16%	
Control	Hfrtip.4 Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>-</sup> B/B	11%		0,01%
	(Hfrtip.4 Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>+</sup> B/B	--		0,02%
	Hfrtip.4 Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309 str-r Col <sup>-</sup> B/B	--		7%

B)

CRUZAMIENTOS		Frecuencia de células Col <sup>+</sup> B str-r	Frecuencia de marcadores cromosómicos		
			thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	try <sup>+</sup> str r	arg <sup>+</sup> str r
Control	112F <sup>+</sup> Col <sup>+</sup> B x PA309 str-rCol <sup>-</sup> B/B	14%	0	0	0
	112F <sup>+</sup> Col <sup>+</sup> B x PA309 str-rCol <sup>+</sup> B/B	--	0	0	0
	112F <sup>+</sup> Col <sup>-</sup> B x PA309 str-rCol <sup>-</sup> B/B	--	3x10 <sup>5</sup>		

B) Tiempos de entrada de Col<sup>+</sup>B.

Los tiempos de entrada de Col<sup>+</sup>B se midieron en cruzamientos donde la cepa donante era la Col<sup>+</sup>B y la receptora la Col<sup>-</sup>B. Se utilizó para ello una licuadora para agitar las mezclas en conjugación de acuerdo a lo explicado en la página n° . En cada cruzamiento se efectuaron dos interrupciones una a los 10 minutos y otra a los 20. La medición de las colonias Col<sup>+</sup>B se efectuó mediante la técnica de la triple capa pág. (11).- Los resultados se insertan en la tabla N° 3.

## T A B L A    N°    3

Medición del tiempo de entrada del factor ColB en el citoplasma de la F<sup>-</sup>.

C R U Z A M I E N T O S	Tiempos de entrada de Col B en minutos de efectuada la -mezcla.-
HfrH Col <sup>+</sup> B/B x PA309 Col <sup>-</sup> /B	< 10
Hfrtipo2Col <sup>+</sup> B x PA309 Col <sup>-</sup> /B	< 10
Hfrtipo4Col <sup>+</sup> B x PA309 Col <sup>-</sup> /B	< 10
112F Col <sup>+</sup> B x PA309 Col <sup>-</sup> /B	< 10

Los tiempos de entrada por más que no se hayan medido con mucha precisión, indican que el factor entra en todos los casos tempranamente. Es decir antes de los diez minutos. En ningún caso se observa una entrada tardía de Col<sup>+</sup>B.

## C) Cinética de la transferencia de Col B.

Se estudió también la cinética de la transferencia del factor Col B en cruzamientos HfrH Col<sup>+</sup>B y F<sup>+</sup>Col<sup>+</sup>B x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup>/B. Efectuada la mezcla, se tomaron alícuotas de la misma a los

tiempos que figuran en la curva, y se trataron con licuadora, pág. // , se sembraron en agar nutritivo adicionado de estreptomomicina, para medir Col B (por triple capa), y simultáneamente la concentración de células str-r.

F I G U R A N° 2

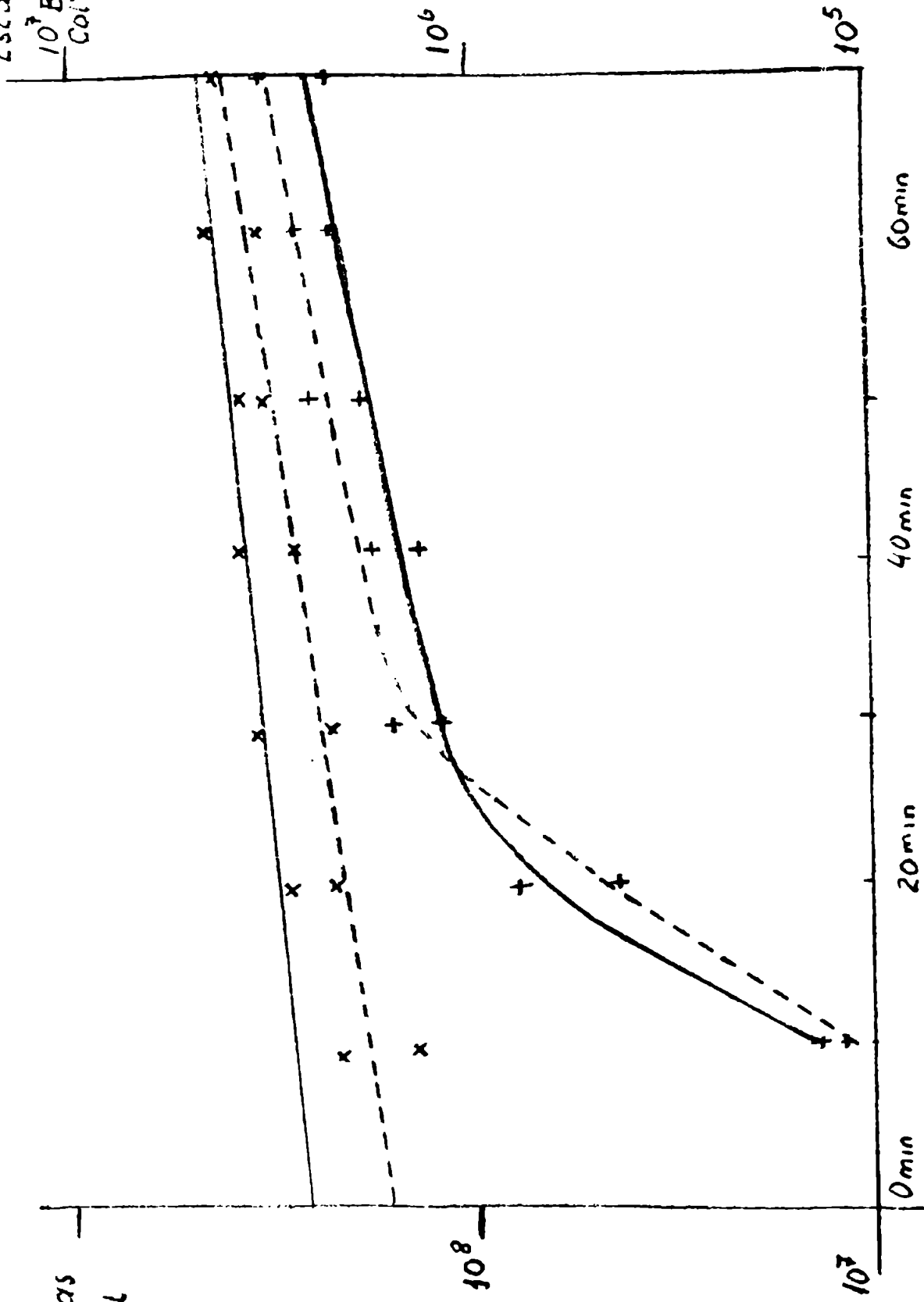
Estudio cinético de la transferencia de Col<sup>+</sup>B. Las líneas de puntos representan los cruzamientos HfrH Col<sup>+</sup>B x F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup>B/B. Las líneas llenas representan los cruzamientos ll2Col<sup>+</sup>B x F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup>B/B. x puntos de la curva de las células str-r. + puntos de la curva de las células Col<sup>+</sup>B str-r.-

Escala

$10^9$  Bacterias  
str-r/ml

Escala

$10^7$  Bacterias  
Col<sup>+</sup> B str-r



x Puntos curva str-r  
 + " " col<sup>+</sup> B str-r  
 --- HfrH Col<sup>+</sup> B x F Col B/B  
 — 112F' Col' B x F Col E/B



En la cinética de ambos cruzamientos se observó un pronunciado incremento de las células Col B, en la primera parte de la curva, a partir de los 10 minutos aproximadamente. La velocidad de crecimiento de estas células va disminuyendo posteriormente, a partir de los 30 minutos, y aproximadamente hasta hacerse similar a la velocidad de crecimiento de las células str-r, sin pasar en ninguno de los dos casos por un período intermedio de "plateau".

## 2 - ANALISIS DE LOS RECOMBINANTES.

De los cruzamientos que comprenden a la HfrH por la F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup> y a la Hfr tipo 4 x la F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup> (ambas Hfr tienen polaridad opuesta) se aislaron alrededor de 100 re combinantes de cada marcador. Ellos se volvieron a sembrar en cajas de agar nutritivo adicionadas de estreptomicina a razón de 25 colonias por caja. En estas cajas se midió el n° de colonias ciliocinógenas.

T A B L A    N°    4

Porcentaje de Col B entre los recombinantes de los cruzamientos de las Hfr Col B x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup>B/B.

CRUZAMIENTOS	Frecuencia de ColB entre los recombinantes:			
	thr <sup>+</sup> led <sup>+</sup> str-r	try <sup>+</sup> str-r	his <sup>+</sup> str-r	arg <sup>+</sup> str-r
HfrHCol <sup>+</sup> Bx <sup>+</sup> FCol <sup>-</sup> B/B.....	48%	80%	100%	100%
número de colonias probadas	95	65	65	15
frecuencia del primer marcador	0,04%			
-----				
Hfrtipo4Col <sup>+</sup> Bx <sup>+</sup> F <sup>-</sup> Col <sup>-</sup> B/B.....	—	98%	90%	35%
número de colonias probadas		40	80	100
Frecuencia 1° marcador				0,03%

### 3) SINTESIS DE LOS RESULTADOS

En los cruzamientos analizados en este capítulo, se han obtenido los siguientes resultados:

1º) Las frecuencias de transderencia de Col B en las diferentes Hfr. estudiadas y en la F son del mismo orden, y relativamente altas si se las compara con las frecuencias a que normalmente transfieren sus marcadores cromosómicos las Hfr. la Hfr<sup>4</sup> tipo 4 son de polaridad opuesta y transfieren Col B con una frecuencia del 29% y 11% respectivamente.

2º) Los tiempos de entrada del factor Col<sup>+</sup> B son similares en las 3 Hfr y en la F<sup>+</sup>. Esos tiempos indican que el factor entra tempranamente.

3º) Las cinéticas de Col<sup>+</sup> B tanto con la F<sup>+</sup> o la Hfr son total comparables. En ninguno de los dos casos se observa "plateau". Ni marcada diferencia entre las pendientes de las curvas de las células str-r y Col<sup>+</sup> B str-r a partir de los 40 minutos.

4º) Del análisis de los recombinantes surge que Col<sup>+</sup> B tienen mayor incidencia entre los marcadores distales que entre los proximales en las Hfr estudiadas.

## C A P I T U L O   I I I

CRUZAMIENTOS   Col<sup>-</sup>B x Col B

- 1-) Frecuencia de Col<sup>-</sup> entre los recombinantes
  
- 2-) Análisis de la cigosis letal en los cruzamientos  
20 donantes a 1 receptora.

**1 - FRECUENCIA DE Col<sup>-</sup>B entre los recombinantes de los cruzamientos Col<sup>-</sup>B x Col<sup>+</sup>B**

En estos experimentos se trató de comprobar si había pasaje de Col<sup>-</sup> de las donantes de las receptoras. Para ello se analizaron los recombinantes que se obtuvieron de los cruzamientos con la HfrH, Hfr tipo 4 y la 112 F<sup>+</sup>. El método utilizado fue el mismo que el descrito para el análisis de Col<sup>+</sup>B en los cruzamientos Col<sup>+</sup>B x Col<sup>-</sup>B. Los resultados están registrados en la tabla n° 6.

**T A B L A N° 6**

**Frecuencia de Col<sup>-</sup>B entre los recombinantes de Col<sup>-</sup> x col B en la proporción de 1 donante a 20 receptoras. Los recombinados fueron obtenidos de siembras efectuadas a los 90 minutos de mezclarse las cepas.**

**obtenido:**

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencias de Col <sup>+</sup> B y Col <sup>-</sup> entre los recombinantes:							
	thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r		Arg <sup>+</sup> str-r		try <sup>+</sup> -str-r		his <sup>+</sup> -str-	
	Col <sup>+</sup>	Col <sup>-</sup>	Col <sup>+</sup>	Col <sup>-</sup>	Col <sup>+</sup>	Col <sup>-</sup>	Col <sup>+</sup>	Col <sup>-</sup>
HfrHCol <sup>-</sup> Bx <sup>-</sup> F <sup>-</sup> ColB	100	0	100	0	100	0	100	0
Frecuencia del primer marcador.....	7%							
Hfrtipo4Col <sup>-</sup> Bx <sup>-</sup> F <sup>-</sup> Col B	100	0	100	0	100	0	100	0
frecuencia del primer marcador .....	4%							
112FCol <sup>-</sup> Bx <sup>-</sup> F <sup>-</sup> ColB	100	0	100	0	100	0	100	0
frecuencia de un marcador cromosómico .....	5.10 <sup>-5</sup>							

La medida de Col<sup>-</sup> se efectuó entre los recombinantes, es decir entre células donde existió un puente o i topasmico. El análisis ~~abarcó~~ abarcó a dos Hfrs de polaridad opuesta y a la F. En ningún caso se observó pasaje de Col<sup>-</sup>. Es decir los cruzamientos Col<sup>-</sup>xCol<sup>+</sup>B son asimétricos de los Col<sup>+</sup>B x Col<sup>-</sup>B.

## 2) ESTUDIO DE LA CIGOSIS LETAL DE LOS CRUZAMIENTOS Col<sup>-</sup>x Col<sup>+</sup>B.

Queda aun la posibilidad de que Col<sup>-</sup> provoque algún tipo de letalidad cuando pasa al citoplasma de las Col B. Para

ello se efectuaron cruzamientos Hfr Col<sup>-</sup> x F<sup>-</sup> ColB en la proporción de 20 donantes a una receptora (7), y se midió la sobrevivencia de células str-r a los 90 minutos de efectuada la mezcla. Los resultados se anotan en la tabla 7.

T A B L A N° 7

Sobrevivencia de células str-r cruzamiento Hfr Col<sup>-</sup> x F<sup>-</sup> ColB en proporción 20:1 y medida a los 90 minutos.

C R U Z A M I E N T O S	Sobrevivencia de células Str-r	Frecuencia del 1° marcador		
		thr <sup>+</sup> -leu <sup>+</sup> 20:1	str-r 1:20	arg <sup>+</sup> str-r 20:1
HfrHCol <sup>-</sup> BxPA309Col B	40%	4%	8%	
HfrHCol <sup>-</sup> BxPA309 Col <sup>-</sup> B	50%	7%	12%	
Hfrtipo2Col <sup>-</sup> BxPA 309ColB	350%	2%		
Hfrtipo4 Col <sup>-</sup> BxPA309ColB	180%			2%

De la tabla se deduce que solo con la HfrH hay una disminución en el número de células str-r, pero ella es similar a la de los testigos Col<sup>-</sup>xCol<sup>-</sup>. Con las otras dos Hfr hay multiplicación de células str-r en lugar de ciosis. Es decir Col<sup>-</sup> al entrar en el citoplasma Col<sup>+</sup> no produce ningún efecto letal.-

## C A P I T U L O V

1- FERTILIDAD DE LOS CRUZAMIENTOS  $Col^+$  x  $Col^-$ .

## A) Introducción

B) Efecto de  $Col^+$  sobre la transferencia de marcadores cromosómicos en los cruzamientos  $F^+ Col^+ B$  x  $F^- Col^- B/B$ .

C) Efecto de  $Col^+$  sobre la transferencia de marcadores cromosómicos en los cruzamientos  $HfrCol^+ B$  x  $F^- Col^- B/B$ .

2- ESTUDIO DE LA FERTILIDAD CROMOSOMICO EN LOS CRUZAMIENTOS  $Hfr Col^-$  x  $F^- Col^+$ .3- EFECTO DE  $Col^+ B$  sobre la transferencia del plasmido  $ColE_1$ .4- ENRIQUECIMIENTO DE LAS CEPAS  $HfrCol^+ B$  en su condición de  $Hfr$ .



### A) Introducción.

En los cruzamientos que comprenden aislamientos Hfr Col<sup>+</sup>B por F<sup>-</sup>Col<sup>-</sup>/B se encontró una gran disminución de la frecuencia de transferencia de marcadores cromosómicos. También pudo constatarse esta misma situación en los cruzamientos de las F<sup>+</sup> hechas Col<sup>+</sup>B. Si bien Fredericq y Betz Bareaux ya habían encontrado una marcada esterilidad en los cruzamientos F<sup>+</sup> x F<sup>-</sup> (18), esa situación no era conocida en las Hfr. Tampoco se dió ninguna explicación ni se intentó aclararlo hasta este momento.

Para probar si realmente la presencia del factor Col<sup>+</sup>B era la que determinaba, por sí o por no que disminuyese la fertilidad de los cruzamientos. Es decir, para probar si tal situación estaba siempre asociada a Col<sup>+</sup>B se realizaron los siguientes experimentos:

Se efectuó una mezcla de las donantes Col<sup>+</sup> y las F<sup>+</sup> o Hfr Col<sup>-</sup> que se pretendía hacer Col<sup>+</sup>. Se efectuaban una serie de aislamientos de la F<sup>+</sup> o DE la Hfr que se habían hecho Col<sup>+</sup>B, alrededor de 10 para cada Hfr, 4 para la F<sup>+</sup>. Simultaneamente, de las mismas cajas se aislaban colonias F<sup>+</sup> o Hfr pero que durante el proceso de transferencia no se habían hecho Col<sup>+</sup>. Es decir colonias F<sup>+</sup> o Hfr que habían sufrido todo el proceso de contacto con las donantes Col<sup>+</sup> sin recibir el factor. Una vez obtenidos ambos tipos de aislamientos, cada uno de ellos se los ensayaba por cruzamiento con la PA309 Col<sup>-</sup>B/B, y se medía frecuencia de transferencia del primer y último marcador cromosó-

mico en cada Hfr, de tres marcadores cromosómicos en la  $F^+$ , y de  $Col^+B$  en los cruzamientos  $Col^+ \times Col^-$ . Todos estos cruzamientos eran comparados con los  $Col^- \times Col^+$  y con los  $Col^{+B} \times Col^+$ .

B) Efecto de  $Col^+B$  sobre la transferencia de marcadores cromosómicos en los cruzamientos  $F^+Col^+B \times F^-Col^-B/B$ .

Se probaron por cruzamiento con la PA309  $Col^-B/B$  cuatro aislamientos 112  $F^+Col^+B$  y cuatro  $F^+Col^-B$  de acuerdo a lo descrito en el punto A). Los resultados se registran en la tabla n° 7.

De la tabla 7 se deduce que  $Col^+ \times Col^-$  son cruzamientos estériles con relación a los marcadores cromosómicos. En cambio  $Col^+B$  pasa con una frecuencia de alrededor del 12%. Los aislamientos  $Col^-$  de la  $F^+$  siguen transfiriendo marcadores cromosómicos normalmente sin haber sido afectados por el experimento de transferencia de  $Col^+$ .

#### T A B L A N° 7

A) Prueba de 4 aislamientos  $Col^+B$  de la 112  $F^+$ , por cruzamiento con la  $F^-$  PA309  $Col^-/B$ . Los cruzamientos se efectuaron en la proporción de 1 célula donante a 20 receptoras y se hicieron las mediciones a los 90 minutos de efectuada la mezcla.

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencia de los recombinantes			Frecuencia de Col <sup>+</sup> B str-r
	Arg <sup>+</sup> str-r	try <sup>+</sup> str-r	thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	
Aislamiento 1 112F <sup>+</sup> Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B...	0%	0%	0%	14%
Aislamiento 2 112F <sup>+</sup> Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B....	0%	0%	0%	9%
Aislamiento 3 112F <sup>+</sup> Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B....	0%	0%	0%	11%
Aislamiento 4 112F <sup>+</sup> Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B....	0%	0%	0%	14%

B) Prueba de 4 aislamientos Col<sup>-</sup>B de la 112 F<sup>+</sup>, por cruzamiento con la F<sup>-</sup>PA309 Col<sup>-</sup>/B.  
Los cruzamientos se efectuaron como en A.

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencia de los recombinantes:		
	arg <sup>+</sup> str-r	try <sup>+</sup> str-r	thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r
Aislamiento 1 112F <sup>+</sup> Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA 309Col <sup>-</sup> B/B	4.10 <sup>-5</sup>	1.10 <sup>-4</sup>	1.10 <sup>-4</sup>
Aislamiento 2 112F <sup>+</sup> Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA 309Col <sup>-</sup> B/B	1.10 <sup>-5</sup>	1.10 <sup>-4</sup>	3.10 <sup>-4</sup>
Aislamiento 3 112F <sup>+</sup> Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA 309Col <sup>-</sup> B/B	7,5.10 <sup>-5</sup>	3.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-4</sup>
Aislamiento 4 112F <sup>+</sup> Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA 309Col <sup>-</sup> B/B	---	1.10 <sup>-4</sup>	1.10 <sup>-4</sup>

C) Efecto de Col<sup>+</sup>B sobre la transferencia de marcadores cromosómicos en los cruzamientos Hfr Col<sup>+</sup> B x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup> B/B.

Se probaron por cruzamiento con la PA309Col<sup>-</sup>B, 10 aislamientos de cada HfrCol<sup>+</sup> y cinco Hfr Col<sup>-</sup>, de acuerdo a lo descrito en el punto A). Los resultados se registran en las tablas N° 8, 9 y 10, y comprenden la frecuencia de transferencia de Col<sup>+</sup> y la frecuencia de transferencia de marcadores cromosómicos. Los cruzamientos testi-

gos  $Col^+ \times Col^+$  ;  $Col^- \times Col^+$  y  $Col^- \times Col^-$  se registran en la tabla 11.-

T A B L A N° 8

- A) prueba de 11 aislamientos de la HfrH  $Col^+B$  por cruzamiento con la  $F^-PA309Col^-B/B$ . Cada cruzamiento se realizó en la proporción 1 donante a 20 receptoras de acuerdo con lo especificado en materiales y métodos.
- B) prueba de 6 aislamientos  $Col^-B$  de la HfrH obtenidos de las mismas cajas de la transferencia utilizada para hacer  $Col^+$ . La prueba se realizó por cruzamiento con la  $F^-PA309Col^-B/B$ .

8 - A

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencia de recombinación		Frecuencia de $Col^+B$ str-r
	$thr^+leu^+$	$str^+arg^+$	
Aislamiento 1 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,01%	0,0001%	23%
Aislamiento 2 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,01%	0,0001%	25%
Aislamiento 3 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,014%	0,0001%	26%
Aislamiento 4 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,02%	—(x)	29%
Aislamiento 5 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,025%	0,0001%	29%
Aislamiento 6 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,007%	—	16%
Aislamiento 7 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,03%	—	35%
Aislamiento 8 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,017%	—	15%
Aislamiento 9 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,03%	0,0001%	20%
Aislamiento 10 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,03%	—	28%
Aislamiento 11 HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^-B/B$	0,05%	—	40%
TESTIGO HfrH $Col^+B$ x $F^-PA309 Col^+B$	0,02%	—	

8 - B

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencia de los recombinantes	
	thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	arg <sup>+</sup> str-r
Aislamiento 1 HfrHCol <sup>-</sup> Bx PA309 Col <sup>-</sup> B/B	38 %	0,2%
Aislamiento 2 HfrHCol <sup>-</sup> Bx PA309 Col <sup>-</sup> B/B	38 %	0,1%
Aislamiento 3 HfrHCol <sup>-</sup> Bx PA309 Col <sup>-</sup> B/B	41%	0,2%
Aislamiento 4 HfrH Col <sup>-</sup> Bx PA309 Col <sup>-</sup> B/B	17%	0,2%
Aislamiento 5 HfrH Col <sup>-</sup> Bx PA309 Col <sup>-</sup> B/B	7%	0,1%

## T A B L A N° 9

A) Prueba de 9 aislamientos de la Hfr tipo 4 Col<sup>+</sup>B por cruzamiento con la F<sup>-</sup> PA309 Col<sup>-</sup>B/B. Cada cruzamiento se realizó en una proporción de 1 donante de 20 receptoras. Las mediciones se efectuaron a los 90 minutos de realizarse la mezcla.

B) Prueba de 5 aislamientos Hfrtp.4 Col<sup>-</sup>B obtenidos de las mismas cajas que los Col<sup>+</sup>.

9 - A.

C R U Z A M I E N T O	Frecuencia de recombinación			Frecuencia de Col <sup>+</sup> B str-r
	arg <sup>+</sup> str-r	hist <sup>+</sup> str-r	try <sup>+</sup> str	
Aislamiento 1 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,0008%	0,0006%	—	7%
Aislamiento 2 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,001 %	0,0008%	—	5%
Aislamiento 4 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,005%	—	—	5%
Aislamiento 4 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,001%	0,0002%	—	7%
Aislamiento 5 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,02 %	0,0003%	—	10%
Aislamiento 7 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,01%	—	—	6%
Aislamiento 7 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA 309 Col <sup>-</sup> B/B	0,002%	—	—	4%
Aislamiento 8 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,04 %	0,001 %	0,0001%	20%
Aislamiento 9 Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>-</sup> B/B	0,001%	0,0002%	—	10%
TESTIGO Hfrtp.4 Col <sup>+</sup> Bx F <sup>-</sup> PA309 Col <sup>+</sup> B	0,02%			

9 - B.

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencia de recombinantes		
	arg <sup>+</sup> str <sup>-r</sup>	his <sup>+</sup> str <sup>-r</sup>	try <sup>+</sup> str <sup>-r</sup>
Aislamiento 1Hfntp.4 Col <sup>-</sup> B F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	10%	0,4%	0,08%
Aislamiento 2Hfntp.4 Col <sup>-</sup> B F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	10%	0,2%	0,04%
Aislamiento 3Hfntp.4Col <sup>-</sup> B F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	2%	0,2%	0,01%
Aislamiento 4Hfntp.4Col <sup>-</sup> B F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	12%	1 %	0,09%
Aislamiento 5Hfntp.4Col <sup>-</sup> B F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	15%	0,8%	0,4%

## T A B L A N° 10

A) Prueba de 10 aislamientos de la Hfr tipo 2 Col<sup>+</sup>B por cruzamiento con la F<sup>-</sup>PA309 Col<sup>-</sup>B/B. Cada cruzamiento se realizó en una proporción de 1 donante a 20 receptoras. Las mediciones se efectuaron a los 90 minutos de realizarse la mezcla.-

B) Prueba de 4 aislamientos Hfr tipo 2 Col<sup>-</sup>B obtenidos de las mismas cajas que los Col<sup>+</sup>.

10 - A.

CRUZAMIENTOS	Frecuencia de Recombinantes thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	Frecuencia de Col <sup>+</sup> B str-r
Aislamiento 1 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0005%	65%
Aislamiento 2 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B		43%
Aislamiento 4 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,01 %	41%
Aislamiento 4 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0005%	61%
Aislamiento 5 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0001%	60%
Aislamiento 6 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0005%	70%
Aislamiento 7 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0005%	100%
Aislamiento 8 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0002%	65%
Aislamiento 9 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0002%	50%
Aislamiento 10 Hfrtp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	0,0005%	65%
TESTIGO Hfr tp.2Col <sup>+</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>+</sup> B	0,0002%	



10 - B.

C R U Z A M I E N T O S	Frecuencia de Recombinantes			
	thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	arg <sup>+</sup> str-r	his <sup>+</sup> str-r	try <sup>+</sup> str-r
Aislamiento 1Hfrtp.2Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	10 %	--- ---	--- ---	--- ---
Aislamiento 2Hfrtp.2Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	8 %	--- ---	--- ---	--- ---
Aislamiento 3Hfrtp.2Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	14 %	--- ---	--- ---	--- ---
Aislamiento 4Hfrtp.2Col <sup>-</sup> B x F <sup>-</sup> PA309Col <sup>-</sup> B/B	10 %	--- ---	--- ---	--- ---

De las tablas 8, 9 y 10 se puede ver facilmente que la fertilidad disminuye sensiblemente en todas las Hfr estudiadas, pero contrariamente a lo que se observa con la F<sup>+</sup> no se esterilizan. Los marcadores cromosómicos son transmitidos por las Hfr Col<sup>+</sup>B con una frecuencia entre 10.000 y 1.000.000 de veces menor que las Hfr Col<sup>-</sup> utilizadas como testigos. La Hfr de fertilidad reducida siguen transfiriendo con la misma polaridad que las respectivas Hfr Col<sup>-</sup>. También en estos casos Col<sup>+</sup>B se transfiere a frecuencias relativamente altas en comparación con la frecuencia de transferencia de los marcadores cromosómicos en una Hfr normal.

**2- ESTUDIO DE LA FERTILIDAD "CROMOSOMICA" EN LOS CRUZAMIENTOS  
HfrCol<sup>-</sup> x F<sup>-</sup>Col<sup>+</sup>.**

Se efectuaron cruzamientos de las distintas Hfr Col<sup>-</sup> por las F<sup>-</sup>; PA309 Col<sup>+</sup>B., por la PA309Col<sup>-</sup> B/B y por la PA309, para estudiar el efecto que ejerce sobre la fertilidad Col B cuando es llevado por las células F<sup>-</sup>. También en este caso los cruzamientos se efectuaron en la proporción de 1: 20 y se sembraron a los 90 minutos de efectuada la mezcla. Los resultados se registran en la tabla N° 11.

De la tabla se deduce fácilmente que cuando la F<sup>-</sup> es Col<sup>+</sup>B no se nota ninguna disminución en la frecuencia de transferencia de los marcadores cromosómicos. Tampoco puede atribuírse la esterilidad al hecho de haber adquirido la F<sup>-</sup> la condición de resistencia a la colicina B. Los cruzamientos Hfr Col<sup>-</sup> x PA309/B no presentan variaciones apreciables de la fertilidad cuando se los compara con los Hfr H x PA309.

## T A B L A N° 11

FERTILIDAD EN LOS CRUZAMIENTOS Hfr Col<sup>-</sup>B x F<sup>-</sup> Col<sup>+</sup>B.

C R U Z A M I E N T O S	FRECUCENCIA DEL 1° MARCADOR	
	thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str-r	arg <sup>+</sup> str-r
Hfr H Col <sup>-</sup> B x PA 309	22 %	—
Hfr tipo 4 Col <sup>-</sup> B x PA 309	—	9 %
Hfr tipo 2 Col <sup>-</sup> B x PA 309	15 %	—
Hfr H Col <sup>-</sup> B x PA 309/B	24 %	—
Hfr tipo 4 Col <sup>-</sup> B x PA 309/B	—	7 %
Hfr tipo 2 Col <sup>-</sup> B x PA 309/B	16 %	—
Hfr H Col <sup>-</sup> B x PA 309Col <sup>+</sup> B/B	16 %	—
Hfr tipo 4 Col <sup>-</sup> B x PA 309Col <sup>+</sup> B/B	—	4 %
Hfr tipo 2 Col <sup>-</sup> B x PA 309Col <sup>+</sup> B/B	16 %	—

3 - EFECTO DE COL<sup>+</sup>B sobre la transferencia del plásmido Col E<sub>1</sub>.

Se hizo *la Hfr H Col<sup>+</sup>E<sub>1</sub>* colicinógena para B, utilizando el método descrito en el capítulo I. Esa cepa fué utilizada cruzándola con la PA309/E<sub>1</sub>/B. Hasta este momento era evidente la interferencia existente entre Col<sup>+</sup>B y los marcadores cromosómicos, pero a pesar de que el plásmido Col<sup>+</sup>B se transfería a una frecuencia relativamente alta, era necesario estudiar el efecto sobre otros plásmidos, pues no era posible separar la condición de plásmido de Col<sup>+</sup>B de su efecto sobre la fertilidad. Los datos obtenidos se registran en la tabla N°12.

T A B L A N° 12

C R U Z A M I E N T O	Frecuencia del 1° marcad. thr <sup>+</sup> leu <sup>+</sup> str <sup>-r</sup>	Frecuencia de Col <sup>+</sup> E <sub>1</sub> str <sup>-r</sup>	Frecuencia de Col <sup>+</sup> B str <sup>-r</sup>
Hfr H Col <sup>+</sup> E <sub>1</sub> Col <sup>+</sup> B x PA309/B/E <sub>1</sub>	0,02 %	170 %	28 %
Hfr H Col <sup>+</sup> B Col <sup>-</sup> E <sub>1</sub> x PA309/B/E <sub>1</sub>	0,05 %	--	25 %
Hfr H Col <sup>+</sup> E <sub>1</sub> Col <sup>-</sup> B x PA309/B/E <sub>1</sub>	60,00 %	1.200 %	--

De estos experimentos se deduce que Col E<sub>1</sub> disminuye su frecuencia de transferencia debido a la presencia de Col B, pero este efecto es mucho menor que el sufren los marcadores org

mósomicos: 7 veces contra 10.000 a 1.000.000 en estos últimos. En cambio, la transferencia del propio factor Col<sup>+</sup>B no es alterada en las cepas dobles colicinógenas.

#### 4- Enriquecimiento de las cepas Col<sup>+</sup>B en su condición de Hfr.

Se procuró resaislar Hfrs de mayor frecuencia de transferencia de marcadores cromosómicos. A partir del Hfr H Col<sup>+</sup>B de un 0,02 % de recombinación para el primer marcador se llegó a una Hfr H Col<sup>+</sup>B de un 1 % de recombinación. Para ello, por replica en caja, se fueron aislando las colonias que mostraban cierto enriquecimiento. Así, en sucesivas etapas se llegó al Hfr H del 1 %. Estas cepas son muy inestables y en pocos días vuelven a su condición original. En cambio, las cepas de baja frecuencia de transferencia de thr<sup>+</sup>leu<sup>+</sup>str<sup>-</sup>r se mantienen en esa situación por largo tiempo.

Las cepas que han llegado al 1% de frecuencia de recombinación, transfieren Col<sup>+</sup>B a la misma frecuencia que las Hfrs de baja frecuencia de transferencia. Las cepas activas Hfr segregan algunas colonias Col<sup>-</sup>. Por último, las cepas hechas Col<sup>+</sup>B por transducción con  $P_1$  se comportan de la misma manera que las hechas Col<sup>+</sup> por los métodos descriptos.

**C A P I T U L O    V****DISCUSION                    Y                    CONCLUSIONES****1- ANALISIS GENETICO.**

**A) Ubicación del factor Col B.**

**B) Comparación de los resultados con los de otros autores.**

**2- EFECTO DE COL B SOBRE LA FERTILIDAD EN E.COLI K<sub>12</sub>.**

**A) Efecto sobre marcadores cromosómicos y sobre plasmidos.**

**B) Interpretación de los resultados.**

**3- RELACIONES ENTRE VIRUS-FACTOR Col B- y FACTOR F.-**

## 1 - ANALISIS GENETICO

### A) Ubicación del factor Col<sup>+</sup>B.

De los experimentos del capítulo segundo se deduce que no es posible demostrar ningún estado integrado para Col<sup>+</sup>B excluyente de otros citoplásmicos.

Todas las Hfr transfieren Col<sup>+</sup>B a una frecuencia relativamente alta, si se la compara con la frecuencia normal de transferencia de marcadores cromosómicos en cruzamientos Col<sup>-</sup>x Col<sup>-</sup>, pg. 14

También la F<sup>+</sup> transfiere Col<sup>+</sup>B con una frecuencia similar a la de las Hfr. Si hubiese un locus cromosómico para el factor, habría que esperar que, al transferir la Hfr H a alta frecuencia al factor Col<sup>+</sup>B, la Hfr tip 4 lo debería hacer con una frecuencia comparable a la de sus marcadores distales; pues ambas son de polaridad opuesta. Ello no ocurre. En el análisis de la incidencia de Col B entre los recombinantes de cada Hfr, se puede observar un incremento de ligamiento que va desde los marcadores proximales hacia los distales, lo que podría interpretarse suponiendo que Col<sup>+</sup>B está ligado a F<sup>+</sup>. Si este fuese el caso, los tiempos de entrada no deberían coincidir con los de los marcadores proximales, sino con los de los distales. En cambio en todos los casos el tiempo de entrada es menor a 10 minutos. Por otra parte las frecuencias de transferencia del factor no

están de acuerdo con las que habría que esperar si hubiese un ligamiento con F. en cambio suponiendo una ubicación extracromosómica del factor Col<sup>+</sup>B se podría esperar un incremento de la incidencia de Col<sup>+</sup>B entre los recombinantes más alejados del origen, que son los que tardan más en aparecer.

Las curvas de la fig, (2) <sup>Sugieren</sup> ~~demuestran~~, por su falta de plateau, que Col<sup>+</sup>B se divide al entrar en el citoplasma de las F<sup>-</sup>, sin necesidad de que transcurra un tiempo previo para su integración.

Tampoco Col<sup>-</sup> aparece entre los recombinantes de los cruzamientos Hfr Col<sup>-</sup>B x F<sup>-</sup> Col<sup>+</sup>B. Si Col B fuese un factor cromosómico habría que esperar un resultado distinto al anterior. Tampoco se ha observado cigosis letal como resultado del pasaje del Col<sup>-</sup>B al citoplasma Col<sup>+</sup>B de las F<sup>-</sup>, en los cruzamientos Hfr Col<sup>-</sup>B x F<sup>-</sup> Col<sup>+</sup>B en la proporción 20 donantes: 1 receptora.

En síntesis, la frecuencia similar de transferencia de Col<sup>+</sup>B en las 3 Hfr estudiadas y la F<sup>+</sup>; el tiempo similar de entrada de Col<sup>+</sup>B; el incremento de incidencia de Col<sup>+</sup>B entre los recombinantes, que va desde los proximales hacia los distales en cada Hfr; la falta de plateau en las curvas de la cinética de la transferencia de Col B; la no aparición de Col<sup>-</sup>B entre los recombinantes de los cruzamientos Hfr Col<sup>-</sup>x F<sup>-</sup> Col<sup>+</sup>B, y F<sup>+</sup> Col<sup>-</sup> x F<sup>-</sup> Col<sup>+</sup>B y la no aparición de cigosis letal, se explican



sosteniendo que Col B es un factor extracromosómico tanto en las Hfr,  $F^+$ , o  $F^-$ . Luego, como en el caso de Col  $E_2$ , Col I y Col V, estudiados por R.N. de Zwaig et al, Col B debe ser considerado un plásmido. Situación encontrada también para Col  $E_1$  por R. N. de Zwaig y por Clowes, separadamente.

B) Comparación de los resultados con los de otros autores.

Es evidente que en este caso, Col B no está ligado a F como en la Hfr aislada por Fredericq (13), pág. ( ). Esa diferencia puede ser explicada del siguiente modo:

- 1º) Que los dos factores Col B (el nuestro y el de Fredericq) tengan regiones homólogas a F de distinta extensión.
- 2º) Que los factores F sean los diferentes.
- 3º) Que la colicina B de Fredericq y la Colicina B nuestra no sean la misma colicina.

Estas suposiciones están avaladas por lo siguientes:

El mismo Dr. P. Fredericq (1956) (18) encontró una gran esterilidad en los cruzamientos  $F^+Col^+B \times F^-Col^-B$ . Esa situación es la que encontramos nosotros ahora con  $Col^+B$ . Pero al aislar (1963) el Dr. Fredericq, 1400 recombinantes de dichos

cruzamientos es de esperar que tal esterilidad no se ha producido, de lo contrario los recombinantes no existirían. Por otra parte uno de los recombinantes aislados por él, presenta la condición de Hfr, en cambio en nuestro caso todos los recombinantes PA 309 T<sup>+</sup>L<sup>+</sup>, PA 309 his<sup>+</sup> try<sup>+</sup> arg<sup>+</sup> que estudiados (datos no publicados) presentan una esterilidad total en lo relativo a transferencia de marcadores cromosómicos.

Es probable, también el Dr. Frederic haya trabajado con factores Col<sup>+</sup> B, Factores F<sup>+</sup> o colicinas diferentes en 1956 que en 1963.

Quedaría por <sup>considerar</sup> descartar que ColB pudiese comportarse como Col I en los sistemas HFC de Stocker. En los experimentos realizados, en que la donante está en defecto frente a la receptora (1:20) Col<sup>+</sup>B alcanza frecuencias de transferencia muy bajas comparadas con la de los sistemas H<sub>2</sub>C. Por otra parte cuando la proporción de donantes a receptoras es de 20:1 la frecuencia de transferencia no baja tan radicalmente como en aquellos. Tampoco la curva que representa la cinética de transferencia de Col B, tiene una pendiente marcadamente mayor que la de las células estreptomycinina resistentes, como habría que esperar si Col B confiriese polaridad.

En síntesis es poco probable que Col B confiera algún tipo de polaridad como el encontrado por Stocker para Col I en Salmonella.

### Efecto de Col<sup>+</sup>B sobre la fertilidad en E.Coli K<sub>12</sub>

- A) Efecto sobre la transferencia de marcadores cromosómicos y plasmidos.

En todos los cruzamientos Hfr Col<sup>+</sup>B x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup>B/B se ha podido observar que se obtienen muy bajas frecuencias de recombinación cuando se los compara con los testigos. Los recombinantes aparecen con frecuencias que son entre 10.000 y 1.000.000 de veces inferiores a la de los testigos. En cambio transfieren a una frecuencia relativamente alta al propio factor Col B. Eas Hfr "infértiles" mantienen sin embargo su polaridad. Pueden ser enriquecidas en su condición de tales, (por lo menos la HfrH), pero las cepas que se obtienen son sumamente inestables y rápidamente vuelven a la condición original, es decir a la de Hfr de muy baja frecuencia de recombinación. En los cruzamientos HfrCol<sup>-</sup> x F<sup>-</sup> Col<sup>+</sup>B se obtienen frecuencias de recombinantes similares a la de los testigos Hfr Col<sup>-</sup> x F<sup>-</sup> Col<sup>-</sup>.

Las cepas Hfr Col<sup>+</sup>B Col<sup>+</sup>E<sub>1</sub>, transfieren marcadores cromosómicos a la misma baja frecuencia que la Hfr Col<sup>+</sup>B solamente, pero Col E<sub>1</sub> es transferido con una frecuencia 7 veces mayor que el testigo Hfr Col<sup>+</sup>E<sub>1</sub>. Esta interferencia de todas maneras no es del mismo orden de magnitud que la ejercida sobre los marcadores cromosómicos; y probablemente no se pueda deg

cartar que el efecto sobre los cromosomas o sobre los plásmidos sea diferente.

**En síntesis:**

- 1°) La presencia de Col<sup>+</sup>B afecta radicalmente la transferencia de marcadores cromosómicos y en mucha menor medida la de los plásmidos.
- 2°) Las Hfr. mantienen su polaridad, luego no se esterilizan ni vuelven a una condición F.
- 3°) Los puentes deben producirse necesariamente, pues Col B y Col E<sub>1</sub> pasan a frecuencias relativamente altas, por más que no pase cromosoma. Por lo tanto la formación de los puentes descarta la posibilidad de que la esterilidad se deba a algún efecto del factor Col B sobre la pared bacteriana que impida su formación.
- 4°) Col B en las F<sup>-</sup> no afecta la integración del trozo de cromosoma proveniente de una Hfr Col<sup>-</sup>. Luego, es más probable que el efecto de Col<sup>+</sup>B se produzca en la célula donante.
- 5°) No es posible que la baja frecuencia de recombinación se deba a la presencia de unas pocas células

Col<sup>-</sup>buenas Hfr, en medio de una población Col B esteril, pues al poderse enriquecer una Hfr Col<sup>+</sup>B, se demuestra que Col<sup>+</sup>B coexistía con una condición potencialmente Hfr.

Por lo dicho este sería un caso de espitasis de Col B sobre F. Queda por saberse cual es el mecanismo de la acción de Col B. En este terreno se pueden plantear dos posibilidades fundamentales:

- a) que los factores Col B y F tengan cierto grado de homología en cuyo caso Col B al aparearse con F en las Hfr, lo eliminaría de su posición permitiendo que el cromosoma se cierre. En las F<sup>+</sup> al aparearse con el F, no permitiría que este se integrase provocando la esterilidad "cromosómica" de estas cepas. En cambio los puentes se seguirían formando y por él podrían pasar los plasmidos.
- b) Que Col<sup>+</sup>B. Interfiera de algún modo con el mecanismo fisiológico que moteriza el DNA a través del puente. En este caso sería preciso suponer que hay un mecanismo para el DNA cromosómico y otro para el de los plasmidos.

Respecto de la primera posibilidad es necesario señalar que Fredericq encontró que Col<sup>+</sup>B y F se transfieren juntos. En otras palabras que ambos factores tienen cierto grado de homología.

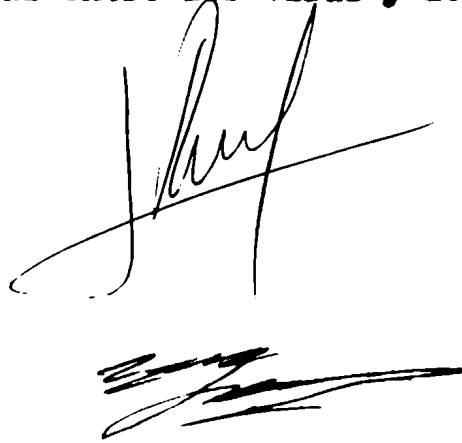
Si como se dijo al principio el factor ColB (pg. ) fuese una porción de DNA más o menos compleja podríamos esperar distintos grados de homología con F. (Lo mismo podría esperarse si la variable fuese F). En otras palabras, en ciertos casos Col B y F estarían más estrechamente unidos entre sí que F al cromosoma; en otro Col B y F estarían más debilmente unidos entre sí que F con el cromosoma.

En el primer caso provocaría esterilidad, en el segundo funcionaría Col B como un episoma de otro episoma o sea un "epi-episoma".-

### 3 - POSIBLES RELACIONES ENTRE VIRUS- Col B- y F.

Si se acepta la hipótesis de Fredericq, quizá más por lo atractiva que por estar sustentada por pruebas incontrovertibles, podríamos con cierta libertad extender su esquema y decir Col B y F derivan de un fago común que al atenuarse puede seguir dos caminos: transformándose en un plásmido capaz de sintetizar colicina, (por pérdida de una parte del genoma viral), o en un episoma F, que no sintetiza colicina pero

conserva cierta homología con Col B, (por pérdida de otra parte del genomio viral). O también, si se nos más cautos  $F^+$  y  $Col^+B$  serían estadias intermedias entre los virus y los factores cromosómicos.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. L. ...', with a horizontal line drawn through it. Below the signature are several horizontal, scribbled lines.

B I B L I O G R A F I A

- 1-Gratia, (1925) A. Compt. rend Soc. Biol. (Paris), 93,1040.-
- 2-Goebel W.F., Barry G.T., Jesaitis M.A., and Miller E.M. (1955).  
Nature, 176, 700.
- 3-Hunton and Goebel 1961 Proc. Nat. Acad. Sci - V. 47 N° 9-1998.
- 4-Rudi E. and Goebel W.F. (1962) Jour. Exp. Medic. 116, 73.
- 5-Fredericq, P. (1954). Transduction des propriétés colicinogenes  
chez E. Coli et S. Sonnei. C.R. Soc. Biol. Paris, 148, 399.
- 6-Fredericq, P & Bets-Bareau, M. (1958) Transfert Génétique de la  
propriété colicinogene en rapport avec la polarité P des parents.  
C.R. Soc. Biol., Paris, 147, 2043.
- 7-Alfoldi, L., Wellman, E.L., Jacob, P. & Masé, R. (1958). Sur le dé  
terminisme génétique de la colicinogénie. C.R. Acad. Sci., Paris,  
246, 3531.
- 8-Zwaig, Rosa N. de, Anton Dora M., Puig J. (1962). The Genetic  
Control of Colicinogenic Factors E<sub>2</sub>, I and V.J. gen Microbiol.  
29, 473.
- 9-Zwaig, Rosa N de, Comunicación personal.
- 10-Clows R.C. (1963) Genet. Res., Camb. Colicin Factors and Epige  
nes. 4, 162.-
- 11-Fredericq, P. (1963). J. of Theoretical Biology, V.4, n 2.
- 12-Ozeki H., Stocker, B.A. D. (1959). Production of Colicine by sig  
gle Bacteria.  
Nature. Lond., 184, 337.



- 13-Frdericq,P.(1963).Microbial Genetic Bulletin. 19 N° 19.
- 14-Stecker,B.A.D., Smith Sylvia M. & Ozeki H.(1963).High Infectivity of Salmonella typhimurium newly infected by the Col I factor. J. gen. Microbiol., 30, 201.
- 15-Furness J. and Rowley (1957) J.gen. Microbiol. 17,550.
- 16-Watanabe T. & Funkasawa T.(1962)Jour. of Bacteriology, V 83, 727. Interaction between resistance transfer factor and F factor.
- 17-Yugida Y. and Hirota Y.(1962).Conjugal Fertility associated with resistance factor R. In E.Coli.Jour.of Bact..V-84,902.
- 18-Frdericq,P & Betz-Bureau,M. (1956).Influence de diverses propriétés colicinogenes sur la fertilité d'E. coli. C.R. Soc.Biol., Paris, 150, 615.
- 19-Hayes,W.(1953).The mechanism of genetic recombination in E.coli. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 18,75.
- 20-Jacob,F. & Wollman, E.L. (1957).Analyse des groupes de liaison génétique de différentes souches donatrices. C.R. Acad.Sci. , Paris, 245, 1840.
- 21-Wollman,E.L.(1953).Sur le déterminisme génétique de la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur, 84, 281.
- 22-Jacob,F. & Wollman, E.L. (1958). Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez E.coli.IV. Ann.Inst.Pasteur, 95,497.
- 23-Wollman,E.L. & Jacob,F.(1959).La sexualité des bactéries.Paris: Masson et Cie. p.72.
- 24-Taylor,A.L. & Adelberg,E. (1960).Linkage analysis with very high frequency males of E.Coli. Genetic, 45,1233.