

Tesis de Posgrado

Comportamiento genético de los factores colicinógenos E1 y V-I en *Escherichia coli* K12

Nagel de Zwaig, Rosa

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Nagel de Zwaig, Rosa. (1963). Comportamiento genético de los factores colicinógenos E1 y V-I en *Escherichia coli* K12. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1170_NageldeZwaig.pdf

Cita tipo Chicago:

Nagel de Zwaig, Rosa. "Comportamiento genético de los factores colicinógenos E1 y V-I en *Escherichia coli* K12". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1170_NageldeZwaig.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Comportamiento genético de los factores
colicinógenos E_1 y V-I en Escherichi coli K12

Rosa Nagel de Zwaig

tesis: 11''0

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas
(*Orientación Zoológica*).
1963

El presente trabajo fué realizado en el Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Microbiología y completado en el Laboratorio de Genética I de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Agradezco al Dr. J.L. Reissig su apoyo y sugerencias.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Ing. J.I. Valencia por su decidido apoyo que posibilitó la termina-ción de este trabajo y al Dr. I. Pirotsky por el constante estímulo brindado al Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Microbiología

Mi sincero reconocimiento a la Lic. D.N. Antón y al Dr. J. Puig por la colaboración prestada en los experimentos de cinéticas y por las constantes y útiles discusiones mantenidas durante la realización del trabajo.

Este trabajo fué realizado con ayuda de un subsidio otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

INDICE

Resumen.....	1
Cap. I. <u>Introducción</u>	
Generalidades.....	2
Naturaleza química de las colicinas.....	2
Factores colicinógenos: Características.....	3
Transmisibilidad por conjugación.....	6
Comportamiento genético.....	7
Comportamiento genético del factor colE ₁	8
Concepto de episoma.....	10
Comportamiento genético de los factores colE ₂ , colI, colV y colB.....	11
Objeto del presente trabajo.....	13
Cap. II. <u>Materiales y métodos</u>	
Medios de cultivo.....	14
Cepas de bacterias y fagos.....	14
Preparación de cepas resistentes y de stocks de fagos.....	17
Transferencia del factor colE ₁	17
Técnica de los cruzamientos.....	18
PARTE EXPERIMENTAL	
Cap. III.	
<u>Cruzamientos Hfr colE₁⁺ x F⁻ colE₁⁻ y F⁺ colE₁⁺ x F⁻ colE₁⁻</u>	
Transferencia del factor colE ₁	21
Tiempo de entrada del factor colE ₁	25
Porcentaje de células colE ₁ ⁺ en recombinantes.....	26
Cap. IV. <u>Cruzamientos Hfr colE₁⁻ x F⁻ colE₁⁺</u>	
Transferencia de colE ₁ ⁻	28
Cigosis letal.....	29

Cap. V. Cinética de transferencia de $colE_1$ en cruzamientos Hfr $colE_1^+$ x F- $colE_1^-$ y F+ $colE_1^+$ x F- $colE_1^-$

Cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras.....	33
Cruzamientos en los cuales se interrumpió la conjugación con fago T_6	40
Cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 1 célula receptora.....	41

Cap. VI. Transferencia de $colE_1^+$ de cepas F- a cepas F- y Hfr

Cruzamientos F+ $colE_1^+$ x F- $colE_1^-$	47
Cruzamientos F- $colE_1^+$ x HfrH $colE_1^-$	48

Cap. VII. Cinéticas de transferencia de $colV^+$ en cruzamientos Hfr $colV^+$ x F- $colV^-$ y F+ $colV^+$ x F- $colV^-$

Cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. Interrupción de la conjugación con fago T_6	50
Comportamiento de las células $colV^-colI$ frente al fago MS2...	55
Transferencia de $colV^-colI$ de F- a F-.....	55
Interferencia con la fertilidad cromosómica.....	56

Cap. VIII. Discusión y conclusiones

El factor $colE_1$ como plásmido.....	58
Transferencia de $colE_1$. Inferencias sobre el proceso de conjugación.....	60
Factores colicinógenos y factores de fertilidad.....	64
Comparación con el comportamiento de otros factores colicinógenos.....	69
Factores colicinógenos y plásmidos.....	72
Factores colicinógenos y otros elementos celulares.....	73

RESUMEN

El estudio del comportamiento genético del factor $colE_1$ en cruzamientos entre cepas Hfr $colE_1^+$ o F^+ $colE_1^+$ y cepas F^- $colE_1^-$ de Escherichia coli K12, y sus correspondientes recíprocos, permitió determinar que: a) el factor $colE_1$ se transfiere con máxima eficiencia en la conjugación; b) que se transfiere con igual frecuencia de cepas donantes F^+ o Hfr con diferente origen y polaridad; c) que no presenta ligamiento con factores cromosómicos; d) el carácter $colE_1^-$ de la cepa donante no aparece nunca entre recombinantes o células F^- y no ocurre muerte de las células F^- capaz de encubrir una presunta transferencia del mismo; e) el factor $colE_1$ es capaz de multiplicación autónoma en la cigota transmitiéndose de ésta a todas las células hijas.

Todos estos resultados llevan a concluir la naturaleza extracromosómica del factor $colE_1$ en células Hfr, F^+ y F^- .

No se observó transferencia del factor $colE_1$ de células F^- a F^- , ni de células F^- a Hfr.

Se compararon las cinéticas de transferencia de los factores $colE_1$ y $colV-colI$, en experimentos en los cuales se mató a determinado tiempo la cepa donante con fago T_6 y estreptomycinina. En base al resultado de las mismas y al comportamiento de las células F^- $colV-colI$ frente al fago MS2, se infiere que los factores $colV-colI$ se transfieren de cepas F^- a F^- .

Se discuten estos resultados así como también las interacciones observadas entre los factores $colV-colI$ y la fertilidad cromosómica.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Generalidades:

Los factores colicinógenos son factores hereditarios que controlan en las enterobacterias la síntesis de sustancias con actividad letal conocidas como colicinas.

Estas fueron descritas por primera vez por Gratia (1925) quien observó que filtrados de cultivos de una cepa de Escherichia coli, libres de células, poseían un agente que designó como principio V, capaz de matar a otras cepas de E. coli, el cual, a diferencia de los bacteriófagos, no se multiplicaba sobre células sensibles. Desde entonces se han descubierto numerosas sustancias de este tipo producidas por otros grupos de bacterias y para las cuales se ha propuesto el término más general de bacteriocinas. (Para revisiones sobre este tema ver: Jacob y Wollman, 1959; Ivanovics, 1962).

Gran parte de los estudios sobre colicinas y factores colicinógenos fueron llevados a cabo por P. Fredericq, a quién se deben numerosas e importantes contribuciones en este terreno (Ver Revisiones 1957; 1963 a).

Naturaleza química de las colicinas:

Se conocen actualmente distintas colicinas, designadas por letras, que difieren entre sí por una serie de características físicas y químicas, tales como especificidad de acción, sensibilidad frente a en-

zimas proteolíticas, difusibilidad, estabilidad frente al calor, etc. (Fredericq, 1957).

La clasificación que se hace actualmente de las mismas (Fredericq, 1957) se basa fundamentalmente en la especificidad de su acción, de modo tal que aquellas colicinas que seleccionan un mismo tipo de mutante resistente son ubicadas dentro de un mismo grupo, aún cuando en esa forma pueden quedar agrupadas sustancias químicamente diferentes.

Los estudios realizados sobre la naturaleza química de las colicinas K y V (Goebel y Barry, 1958; Goebel, 1962; Hutton y Goebel, 1961), sobre colicina A (Barry et al. 1963) y sobre una colicina no identificada producida por E. coli 710 (Nuske et al. 1957) indican que se trata de sustancias químicamente muy complejas (lipo-carbohidrato-proteína) relacionadas o idénticas al antígeno somático O.

Ciertas evidencias, tales como la sensibilidad de las colicinas a la acción de enzimas proteolíticas, así como también los resultados de Rude y Goebel (1962) basados en la comparación de los antígenos O de una cepa productora de colicina K (colK+) y una cepa derivada de ésta, no productora de colicina K (colK-) sugerirían, sin embargo, que la actividad bactericida es llevada solamente por la parte proteica de la molécula.

Factores Colicinógenos:

Características:

Los factores colicinógenos son factores hereditarios estables y pueden transmitirse de una cepa bacteriana a otra por cultivo mixto.

No se ha observado nunca hasta ahora la transformación de una cepa no colicinógena (col-) en colicinógena (col+) por mutación. Es decir que la colicinogenia es una condición que, al igual que la lisogenia, sólo se adquiere por entrada del factor "desde afuera".

La síntesis de colicina por una bacteria es también, al igual que síntesis de fago por una bacteria lisógena, una capacidad potencial. Sólo unas pocas células del cultivo producen colicina y esta síntesis es letal para las mismas (Stocker, Ozeki y de Margerie, 1959). En forma similar a su acción sobre el profago, la radiación ultravioleta puede "inducir" la síntesis de algunas colicinas en todas las células del cultivo.

Al igual que con los fagos, se distinguen dos mecanismos diferentes por los cuales una cepa puede perder su sensibilidad a una determinada colicina (Fredericq, 1956, b): a) la resistencia: producida por una mutación que afecta los receptores específicos de la pared, sobre los cuales se adsorbe la colicina. b) la inmunidad: determinada, no por la pérdida de los receptores, sino por la presencia en la célula bacteriana del factor colicinógeno correspondiente a esa colicina (Fredericq, 1956b). Aunque aparentemente relacionadas, es muy probable que la inmunidad de la bacteria colicinógena a la colicina responda a un mecanismo diferente y más complejo que el de la inmunidad de las bacterias lisógenas al fago homólogo al que llevan al estado de profago.

La transferencia del factor colicinógeno de una cepa a otra parece realizarse siempre por un proceso de conjugación, ya que no

pudo logarse con bacterias colicinógenas muertas, filtrados o sobrenadantes de cultivos de bacterias colicinógenas vivas.

También se ha encontrado que los factores colicinógenos pueden transferirse por transducción. Así se ha observado que el factor que determina la síntesis de colicina E₂ (col E₂) puede ser transducido por el fago PLT 22 en Salmonella typhimurium (Fredericq, 1958 a, 1959 y Ozeki y Stocker, 1958) y que los factores col E₁ y col B son transducidos por el fago P₁ en E. coli. (Fredericq, 1958 a).

En los últimos años se han realizado estudios tendientes a conocer la naturaleza del factor colicinógeno. Una serie de evidencias indirectas previas, tales como analogía con ciertos fagos y transducibilidad con fagos, sugerían que los factores colicinógenos estaban formados por ácido desoxiribonucleico.

Los intentos de Lavallé y Jacob (1961) de estudiar el contenido de ácido nucleico del factor col E₁ en experimentos de suicidio con P₃₂ no resultaron exitosos. Silver y Ozeki (1962) utilizando un sistema de células conjugantes (células HFC de S. typhimurium como donantes y células de E. coli como receptoras) entre las cuales no había transferencia cromosómica detectable, pero sí transferencia de factores colicinógenos correlacionaron la transferencia de éstos con la de timidina marcada, y por ende del DNA. Lograron así hacer una estimación aproximada del tamaño de los factores col E₂, I y E₁ en número de pares de nucleótidos.

Transmisibilidad por conjugación:

Algunos factores colicinógenos pueden transferirse por cultivo mixto entre cepas pertenecientes a distintos géneros de la Familia Enterobacteriaceae. Así se ha observado transferencia de ciertos factores colicinógenos de cepas de E. coli a otras cepas E. coli y Paracoli (Fredericq 1954 a, 1956 a), de Shigella sonnei a E. coli y viceversa (Fredericq, 1954, a), de cepas de Shigella y E. coli a Salmonella typhimurium (Ozeki, Stocker y Smith, 1962), a S. typhi, S. paratyphi B, Sh. sonnei y Klebsiella (Hamon, 1956) y de S. typhimurium a E. coli (Silver y Ozeki, 1962).

La eficiencia de la transferencia es bastante variable. Fredericq (1954 a) estudió la transferencia de factores colicinógenos de distintas cepas productoras a una cepa F- de E. coli K12, por cultivo mixto de 24 horas. Encontró que ciertos factores tales como col E₁ y col E₂, I se transfieren con alta frecuencia, mientras que col B y col K se transfieren mucho menos. No detectó transferencia de col V de E. coli V, de col D y de otros factores determinantes de la síntesis de colicinas del grupo E de E. coli CA 38 y de paracoli ML .

La transferencia de factores colicinógenos en S. typhimurium LT2 fué estudiada por Ozeki, Stocker y Smith (1962). Estos autores encontraron que col I y col B son fácilmente transmisibles en cultivos mixtos con cepas recientemente hechas col+; que col E₂ y col K no se transmiten y que col E₁ se transmite a baja frecuencia. Además observaron que col E₁, col E₂ y col K se transmiten eficientemente de cepas donantes que llevan col I o col B.

De estos y otros resultados concluyeron que los factores col I y col B recién adquiridos por células S. typhimurium LT2 posibilitan la conjugación así como su propia transmisión y la de otros factores colicinógenos presentes en la misma célula. Establecieron además que en estos sistemas de alta frecuencia de transferencia de col I conocidos como HFC (high-frequency-colicinogeny-transferring), el factor col I se comporta como el F, por cuanto posibilita la recombinación entre factores cromosómicos. (Stocker, Smith y Ozeki, 1963).

Comportamiento genético:

El comportamiento del factor colicinógeno E_1 en cepas de E. coli K12 fué estudiado por Fredericq y Betz-Bareau (1953 b,c) en cruzamientos $F^+ col^+ \times F^- col^-$ y sus recíprocos $F^+ col^- \times F^- col^+$. En los cruzamientos en los cuales la cepa donante (F^+) era colicinógena se encontró transferencia del factor en estudio a los recombinantes, si bien no se observó ligamiento entre colicinogenia y determinantes cromosómicos. En los cruzamientos $F^+ col^- \times F^- col^+$ los recombinantes eran siempre col^- .

De la asimetría de transferencia de col E_1 en estos cruzamientos y de la falta de ligamiento con factores cromosómicos se infirió que el factor colicinógeno era independiente de la estructura genética normal de la bacteria.

Fredericq y Betz-Bareau (1956) estudiaron el efecto que tenían los factores col B, col K y col E_1 y col S_3 (E_2) sobre la fertilidad de cruzamientos $F^+ \times F^-$. Observaron que en el caso de los

factores col^E, col K y col E₂, la fertilidad de los cruzamientos era totalmente inhibida cuando la bacteria F⁺ era colicinógena, hecho que interpretaron, en analogía con el comportamiento de ciertos fagos atemperados, como debido a la "inducción" de la producción de colicina en la célula receptora. También observaron cierta disminución de fertilidad en los cruzamientos F⁺ col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻, respecto del control F⁺ col⁻ x F⁻ col⁻.

En los cruzamientos recíprocos F⁺ col⁻ x F⁻ col⁺ detectaron acentuada disminución de la fertilidad con el factor col E₂.

Comportamiento genético del factor col E₁:

Un análisis más completo del comportamiento del factor col E₁ fué llevado a cabo por Alfoldi, Jacob y Wollman (1957) y Alfoldi Jacob, Wollman y Mazé (1958). Este estudio se realizó en base al comportamiento del factor col E₁ también en E. coli K12, en cruzamientos en los cuales se utilizaron cepas donantes F⁺ y Hfr. Todas las cepas utilizadas se hicieron previamente resistentes a la colicina.

En confirmación de los resultados de Fredericq, encontraron que el factor col E₁ se transfería de bacterias F⁺ col⁺ a bacterias F⁻ col⁻ con gran eficiencia y que el carácter col⁻ no se transfería de bacterias F⁺ a bacterias F⁻.

En cambio, en los cruzamientos en los cuales se utilizaron Hfr con distinto origen y polaridad como donantes colicinógenas, encontraron diferentes transferencias de col⁺ (Figura A). Determinaron además que el tiempo de entrada del carácter difería

con cada Hfr utilizada y era tanto más temprano cuanto mayor era la frecuencia de transferencia. Ello permitió ubicar al factor col E₁ sobre el cromosoma bacteriano, entre TL y MB₁.

El estudio de cigotas individuales aisladas con micromanipulador mostró que toda la descendencia de una cigota col+ era col+.

En los cruzamientos recíprocos Hfr col- x F- col+ observaron la no transferencia de col- y disminución en el número de célu -

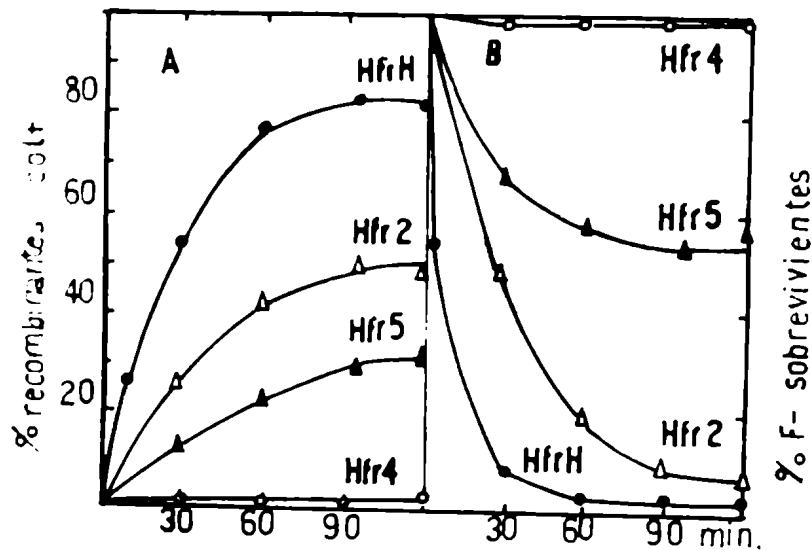


Figura A. Transferencia de col+ en cruzamientos Hfr col+ x F- col- realizados en la proporción 1 Hfr : 20 F-. El origen y sentido de las distintas Hfr se indica en la figura 1. (de Alfoldi et al. 1958).

Figura B. Cruzamientos Hfr col- x F- col+ realizados en la proporción 20 Hfr : 1 F-. El origen y sentido de las Hfr se indica en la figura 1 (de Alfoldi et al. 1958).

las receptoras (cigosis letal), diferente con cada Hfr (Figura B) y de magnitud comparable a la frecuencia de transferencia de col⁺ observada en el cruzamiento recíproco correspondiente (Figura A).

Por observación microscópica de cigotas aisladas con micromanipulador corroboraron que las cigotas que reciben col⁻ morían después de unas pocas divisiones.

Estos resultados indicaban que el pasaje de col⁻ de la cepa donante a la receptora inducía la muerte de las mismas por un mecanismo no bien conocido, y que el factor col E₁ era capaz de existir en la célula bacteriana bajo dos estados diferentes: a) en estado autónomo, en bacterias F⁺ y F⁻, b) integrado al cromosoma, en las bacterias Hfr.

Concepto de episoma:

La denominación de episoma fué propuesta por Jacob y Wollman (1957) para partículas tales como el factor sexual F, ciertos fagos atemperados y el factor col E₁. Estas partículas celulares presentaban ciertas características comunes que las diferenciaban de las estructuras cromosómicas clásicas o de los elementos citoplásmicos, en el sentido que:

- a) eran estructuras dispensables de la célula bacteriana, es decir, que podían estar ausentes o presentes en la misma.
- b) no podían adquirirse por mutación. Solo podían ser adquiridas "desde afuera" por mecanismos tales como la conjugación, la transducción o la transformación.

- c) Podían presentar en la célula uno de dos estados diferentes :
- a) el estado autónomo, en el citoplasma o
 - b) el estado integrado, en el cromosoma.

Comportamiento de los factores col E₂, col I, col V y col B.

Un estudio similar al realizado con col E₁ se encaró con los factores colicinógenos E₂, I y V (Nagel de Zwaig, Antón y Puig, 1962) en el intento de establecer si presentaban un comportamiento similar al de col E₁.

Estos estudios indicaron que, aún cuando la frecuencia de transferencia de cada uno de estos factores en la conjugación era muy diferente (col I : 0.1 % ; col E₂ : 1 % y col V : mayor del 100 %), su comportamiento presentaba muchas semejanzas. Así se estableció que:

- 1) El carácter col⁺ era transferido con similar frecuencia en cruzamientos que involucraban como donantes colicinógenas diferentes Hfr (que transfieren el cromosoma con distinto origen y polaridad) y cepas F⁺ (que transfieren su cromosoma con baja frecuencia).
- 2) Con estas mismas cepas donantes, los tiempos de entrada del factor col V en la cepa receptora también eran similares.
- 3) El carácter col⁺ no presentaba ligamiento con marcadores cromosómicos.
- 4) El carácter no colicinógeno de la cepa parental donante no aparecía en los recombinantes de los cruzamientos recíprocos

Hfr col- x F- col+ ; tampoco se observó cigosis letal atribuible al pasaje de col- y capaz de enmascarar su presunta transferencia.

Todos estos resultados indicaban que esos factores colicinógenos no se encontraban localizados sobre el cromosoma bacteriano en las células donantes F+ y Hfr.

Igual interpretación era perfectamente aplicable al comportamiento de col V en la célula receptora, ya que las cinéticas de este factor indicaban que era capaz de multiplicarse en la cigota autónomamente sin requerir integración, de modo de asegurar su pasaje a todas las células hijas.

Debido a la falta de evidencias indicadoras de fijación o localización cromosómica, se incluyó a los factores col E₂, col I y col V en la categoría de plásmidos. (Lederberg, 1952; Jacob, Schaeffer y Wollman, 1960). Este término fue propuesto por Lederberg (1952) para designar todas aquellas estructuras extracromosómicas capaces de reproducirse en forma autónoma y que no presentan estado integrado.

Los estudios sobre el factor colicinógeno B (Luig, 1963) revelaron la naturaleza extracromosómica de este factor en cepas de E. coli K12, pues al igual que los factores col E₂, col I y col V, no seguía en la conjugación el comportamiento de los factores cromosómicos. Se observó además, que a diferencia de los factores col E₂ y col I previamente mencionados, el factor col B interaccionaba con la fertilidad de cepas F+ y Hfr.

Objeto del presente trabajo:

En este trabajo se analizará el comportamiento del factor colicinógeno E_1 en cruzamientos $F^+ \times F^-$ y $Hfr \times F^-$, en condiciones similares a las empleadas para el estudio de los factores col E_2 , col I y col V y se estudiará la transferencia del factor col E_1 de células F^- a F^- y de F^- a Hfr .

Se compararán además las cinéticas de transferencia del factor col E_1 con las del factor colicinógeno V en conjugaciones en las cuales se mata la cepa donante a determinado tiempo con fago T_6 a alta multiplicidad de infección y estreptomycinina. Se estudiarán también las interacciones de estos factores con la fertilidad de cepas donantes de E. coli K12.

MATERIALES Y METODOSMedios de cultivo:

Se utilizó como medio sintético el descrito por Davis y Mingioli (1950). Las sales, glucosa y agar fueron esterilizados se paradamente y mezclados antes de ser volcados en las cajas. Se adicionaron, en los casos necesarios, aminoácidos en concentración de aproximadamente 80 $\mu\text{g/ml.}$, vit. E₁ en conc. de 5 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomycin, en conc. de 200 $\mu\text{g/ml.}$

Se emplearon también: caldo nutricio y caldo nutricio agarizado al 1.5 % .

Para los experimentos de transducción y para la preparación de stocks de fago P₁ se utilizaron caldo L y caldo L agarizado al 1.5 % (Lennox, 1955).

Para la siembra de bacterias sobre cajas de agar se empleó agar en conc. de 7 g/l .

Cepas de bacterias y fagos:

Las cepas de bacterias y fagos utilizados figuran en la tabla 1. Cepas derivadas de éstas empleadas en el curso del trabajo , se describirán en los capítulos correspondientes.

La cepa 58-161 se utilizó como indicadora sensible a las colicininas y cepas resistentes derivadas de ella como indicadoras resistentes.

Tabla 1. Cepas de bacterias y fagos

<u>Bacterias</u>	<u>Características relevantes</u>	<u>Origen</u>	<u>Referencias</u>
<u>Escherichia coli K12</u>	Met ⁻		
#58	S ^S + col B ₁ + F+	---	---
112	C- H- S ^S + F+	---	Wollman (1953)
Hfr H	B ₁ - Ss	---	Hayes (1953)
Hfr 4	T- L- B ₁ -	C600	Jacob y Wollman (1957)
Hfr 2	M- Ss	58-161	Jacob y Wollman (1957)
Hfr AT-III A	Prot. Ss	AB311	Taylor y Adelberg (1960)
58-161	M- Sr F-	---	Tatum y Lederberg (1947)
PA 209	T- L- B ₁ - H- Tr-	P678	Jacob y Wollman (1958)
C600	Arg- Sr F-	Y10	Appleyard (1954)
12-94	M- Sr col V+ F+	---	---

Fagos

<u>Fagos</u>	<u>Procedencia</u>
P ₁	Prof. S.E. Luria. MIT
T ₆	Lic. H. Lereq. Max Plank Institut Fur Biochemie. Munich
MS2	Dr. P. Anati. Harvard Biological Laboratories.

Los orígenes y sentido de las Hfr utilizadas se indican en la Figura 1.
 Abreviaturas: incapacidad de sintetizar treonina (T-); leucina (L-); tripto-
 fano (Tr-); vitamina B₁ (B₁-); arginina (Arg-); metionina (M-); cisteína
 (C-); histidina (H-); prototófico (Prot.); resistencia a la estreptomina
 (Sr); sensibilidad a la estreptomina (Ss); lactosa (Lac); galactosa (Gal).
 #Enviada por el Dr. E.L. Wollman; + Recibida de Cold Spr. Harbor. ~~P~~entene-
 te a P. Fredericq.

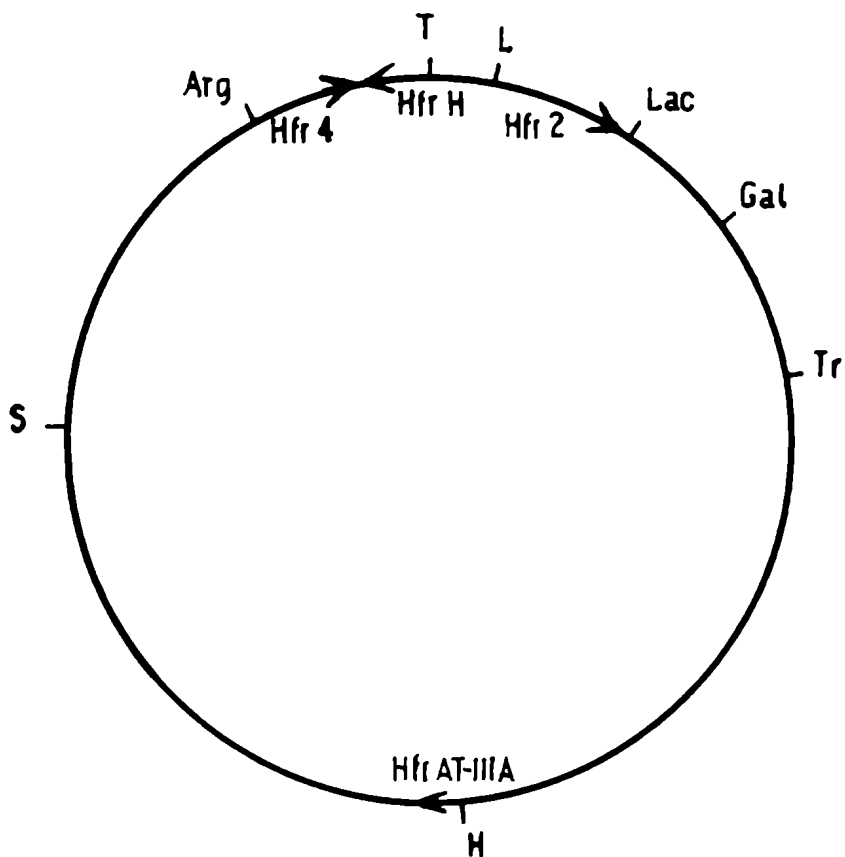


Figura 1. Mapa de ligamiento de E. coli K 12
Se indican la ubicación de algunos determinantes genéticos y los orígenes y sentido de las Hfr utilizadas (Jacob y Wollman, 1961). Los símbolos se explican en Tabla 1 .

Las cepas descritas en la tabla 1 fueron gentilmente cedidas por los Dres. E.L. Wollman y E. Balbinder, P. Amati y por los Prof. S.E. Luria y P. Fredericq.

Aislamiento de cepas resistentes:

Las colonias de cepas productoras de colicina se sembraban por punción con ansa en cajas con agar nutricio, se incubaban a 37° durante 24 hs y luego se mataban con vapores de cloroformo. La cepa sensible se volcaba sobre estas cajas en capa de agar blando. Las cepas resistentes a una colicina se aislaban de colonias que crecían en los halos de inhibición producidos por la colicina sobre la cepa sensible.

Para la preparación de stocks de P₁ se siguió la técnica de Lennox (1955) y de Arber (1960).

La preparación de stocks de T₆ se realizó según la técnica de Adams (1959).

Transferencias del factor col E₁:

El factor col E₁ fué transferido de la cepa original 58 F+ a la cepa F- PA 209 por dos métodos diferentes:

a) por cultivo mixto: se mezclaron cultivos en caldo nutricio de ambas cepas en proporción de volúmenes 1:1. Se incubó la mezcla durante la noche a 37°C y se sembró al día siguiente, en dilución adecuada, en cajas de agar nutricio con estreptomina, donde sólo crecían las bacterias receptoras. Las colonias hechas col+ se detectaron por el método de la doble capa de agar (Frede-

ricq, 1954). Estas fueron picadas, aisladas sobre cajas de agar nutricio y sus características controladas.

b) por transducción: Fago P₁ preparado por crecimiento lítico sobre 58 F+ (col E₁+) se hizo adsorber sobre F- PA 209 durante 10 minutos a 37°C en caldo L + Cl₂Ca 2x10⁻⁵ M y luego se dejó el cultivo a temperatura ambiente durante 2 horas. La siembra se realizó en cajas de agar y las colonias col+ fueron detectadas por el método de la doble capa de agar, reaisladas y controladas.

De la cepa F- PA 209 / E col E₁⁺ se transfirió el factor col E₁ a la cepa 112 F+ por cultivo mixto, según se explica en a) y de ésta se transfirió el factor por cultivo mixto a las diferentes Hfr. En estos casos las siembras se realizaban en medios selectivos adecuados que permitían el crecimiento de las cepas aceptoras de col.

En las transferencias en las cuales se emplearon cepas F+ o Hfr como aceptoras de col+, se utilizaron cultivos de éstas últimas en fase estacionaria, para hacerlas fenotípicamente F- . (Lederberg et. al., 1952).

Para la preparación de las cepas col V empleadas ver Nagel de Zwaig et al. (1962).

Técnica de los cruzamientos:

Los cruzamientos se realizaron mezclando cultivos en fase exponencial de cepas donantes (F+ o Hfr) y células receptoras (F-) con un título de aproximadamente 1-2 x 10⁸ bacterias/ml. Las

mezclas se realizaron en proporción de volúmenes de 1:20 , 1:1 ó 20:1 donantes a receptoras, en Erlenmeyers de 125 ó 200 ml., según que el volumen total de mezcla fuera 2 ó 4 ml. La mezcla conjugante se incubaba en estufa a 37°C . De allí se extraían alícuotas a distintos tiempos, se diluían en buffer y se sembraban en medio selectivo adecuado.

La interrupción de la conjugación se realizó por agitación en homogeneizadora, durante 1 minuto, de una dilución 1/100 en buffer de una alícuota de la mezcla conjugante.

En algunos experimentos, se interrumpió la conjugación con fago T₆ (Hayes, 1957) a alta multiplicidad de infección. (n. i. > 500) y estreptomycinina.

La frecuencia de recombinación fué medida generalmente a los 90 minutos de realizada la mezcla de las cepas y se calculó dividiendo el número de recombinantes por el número inicial de bacterias de la cepa parental minoritaria en la mezcla, y multiplicando por 100 . Los recombinantes que recibían la capacidad de sintetizar un aminoácido o vitamina de la cepa donante y el carácter Sr de la receptora fueron seleccionados en cajas con medio sintético agarizado adicionado de los aminoácidos correspondientes y de estreptomycinina.

La frecuencia de transferencia de col⁺ fué calculada como la frecuencia de recombinantes, es decir, refiriendo el número de células Sr (F⁻) hechas col⁺ al número inicial de la cepa parental minoritaria en la mezcla.

La transferencia de col+ en cruzamientos Hfr col+ x F- col- ó F+ col+ x F- col- se determinó sembrando diluciones convenientes de alícuotas de las mezclas conjugantes en cajas con agar nutritivo con estreptomycin, en las cuales solo las F- formaban colonias; el carácter col+ de las mismas fué determinado por el método de la doble capa de agar, por los halos de inhibición formados sobre una cepa indicadora sensible.

En todos los cruzamientos realizados se determinó la frecuencia de recombinantes para un marcador proximal de las Hfr, para controlar su eficiencia como tal.

En el caso de que éstas presentasen baja frecuencia de recombinación, se procedía a su aislamiento, por réplica sobre cajas de medio selectivo para recombinantes, sembradas con cultivo denso de las F- y aislamiento de aquellas colonias que diesen recombinantes en la réplica.

Cura de factor F:

La cura del factor F se realizó por tratamiento con naranja de acridina (A.C.) (Hirota, 1960).

Observación:

Para lograr la formación de halos nítidos de inhibición por la colicina V, las cajas debían colocarse a 37°C inmediatamente después de sembrada la cepa indicadora sensible. Es muy probable, pues, que la colicina V presente su óptimo de actividad a esta temperatura.

CAPITULO IIICRUZAMIENTOS HfrH col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻ y F⁺ col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻A) Transferencia del factor col E₁:

La transferencia del factor col E₁ se estudió en cruzamientos H⁺ col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻ y Hfr col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻, realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras, en las condiciones indicadas en Métodos.

Todas las cepas se hicieron previamente resistentes a la colicina para evitar una posible distorsión de los resultados por la acción letal de la misma sobre células sensibles.

Además de la medida de transferencia de col E₁, realizada en base al número de células col⁺ Sr, es decir, de aquellas que recibían el carácter col⁺ de la cepa parental donante y el carácter Sr de la cepa receptora, se determinó en cada cruzamiento el porcentaje de recombinación para un marcador proximal de las Hfr, de modo de verificar su condición de tal.

Los cruzamientos col⁺ x col⁻ fueron comparados con los cruzamientos control col⁺ x col⁺.

Los resultados obtenidos en estos cruzamientos figuran en las tablas 2 y 3.

Es necesario hacer notar que las frecuencias de transferencia de col E₁ que se consignan en la Tabla 2 son promedio de varios experimentos; en los distintos experimentos se observa cierta variación en las frecuencias, en forma similar a lo que ocurre con los porcentajes de recombinación para marcadores cromosómicos. Así

por ejemplo, utilizando la cepa HfrH col E_1^+ como donante se midieron en distintos experimentos frecuencias de transferencia que iban desde el 500 al 1.350 %. Más adelante, se analizarán los factores que pueden incidir en tales variaciones.

TABLA 2

Porcentaje de transferencia de col E_1 en cruzamientos
Hfr col E_1^+ x PA 209 col E_1^- y F+ col E_1^+ x PA 209 col E_1^-

Cepas donantes	Frecuencia (en %) de transferencia de col+	Frecuencia (en %) de recombinación para un marcador temprano de las Hfr y para T^+L^+ de la F+ .
HfrH col E_1^+	780	50
Hfr 4 col E_1^+	1000	35
Hfr 2 col E_1^+	600	14
Hfr AT-III A col E_1^+	900	26
112 (F+) col E_1^+	600	10^{-3}

Estos cruzamientos fueron realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. Los porcentajes de células col+ Sr y de recombinantes cromosómicos fueron determinados a los 90 min. de comenzada la conjugación. Los porcentajes consignados en esta tabla son promedio de 4 o más experimentos.

En la tabla 2 se advierte que las frecuencias de transferencia de col E_1 son similares con las distintas cepas donantes utiliza -

das, ya sean éstas F+ o Hfr.

Además es dable observar que la transferencia de col E_1 se cumple muy eficientemente, ya que supera en mucho las frecuencias de transferencia de los marcadores comosómicos de las Hfr, aún de los proximales.

TABLA 3

Comparación de los porcentajes de recombinación en cruzamientos
Hfr col E_1^+ x PA 209 col E_1^- con los controles
Hfr col E_1^+ x PA 209 col E_1^+

Cruzamiento	% de recombinación para un marcador temprano de las Hfr y para T^+L^+ de la F+ .
Hfr H col E_1^+ x PA 209 col E_1^-	46
Hfr H col E_1^+ x PA 209 col E_1^+ (control)	52
Hfr 4 col E_1^+ x PA 209 col E_1^-	20
Hfr 4 col E_1^+ x PA 209 col E_1^+ (control)	25
Hfr 2 col E_1^+ x PA 209 col E_1^-	8 ; 11
Hfr 2 col E_1^+ x PA 209 col E_1^+ (control)	28 ; 9
112 (F+) col E_1^+ x PA 209 col E_1^-	1.10^{-3}
112 (F+) col E_1^+ x PA 209 col E_1^+ (control)	1.10^{-3}

Los cruzamientos se realizaron en la proporción 1 donante a 20 receptores.
Las frecuencias de recombinación fueron medidas a los 90 min. de iniciada la conjugación.

Las frecuencias de recombinación para factores cromosómicos son similares en los cruzamientos $col^+ \times col^+$ y en los controles $col^+ \times col^+$. Si bien en algunos experimentos la frecuencia de recombinación es menor en el cruzamiento $col^+ \times col^-$, las diferencias observadas no pueden considerarse significativas (Tabla 3).

Las cepas Hfr col^+ que figuran en la Tabla 2 se hicieron colicinógenas por cultivo mixto con la cepa F+ 112 $col E_1^+$, a la cual se había transferido el factor $col E_1$ por cultivo mixto con la F- PA 209 $col E_1^+$. A ésta última se le había transferido el factor colicinógeno por transducción (ver Métodos).

Para verificar si los resultados consignados en las tablas 2 y 3 podían tener relación con el hecho de que el factor $col E_1$ había sido transferido originalmente por transducción, se prepararon cepas donantes y receptoras colicinógenas por cultivo mixto, a partir de la cepa 58 $col E_1^+$ (ver Métodos).

Los resultados de los cruzamientos realizados con estas cepas i figuran en la Tabla 4.

Se puede observar de los datos de esta tabla que se repiten prácticamente los resultados obtenidos anteriormente (Tablas 2 y 3), en cuanto a:

- a) altas frecuencias de transferencia, y
- b) similar frecuencia de transferencia con las distintas cepas donantes.

TABLA 4

% de transferencia de col E_1 en cruzamientos .

Hfr col E_1^+ x PA 209 col E_1^-

Cepas donantes	Frecuencia de transferencia de col E_1 .	Frecuencia en % de recombinación para un marcador proximal de c/ Hfr.
Hfr H col E_1^+	1.100	70
Hfr 4 col E_1^+	1.100	29
112 (F+) col E_1^+	900	

Los cruzamientos se realizaron en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. Las frecuencias se midieron a los 90 minutos de comenzada la mezcla. (Los resultados son promedio de 2 experimentos).

Los experimentos que se describirán de aquí en adelante se realizaron con las cepas que figuran en las tablas 2 y 3 .

B) Tiempo de entrada del factor col E_1 :

El tiempo de entrada del factor en la célula receptora se determinó en experimentos en los cuales se interrumpió la conjugación con homogeneizadora (ver Métodos).

Se estableció así que el factor col E_1 (Tabla 5) aparece en la célula receptora antes de los 5 minutos de realizada la mezcla de las cepas parentales, en conjugaciones en las cuales se emplearon como donantes de col E_1 diferentes cepas Hfr y una cepa F+.

TABLA 5

Tiempo de entrada de col E_1 en cruzamientos

Hfr col E_1^+ x PA 209 col E_1^- y F+ col E_1^+ x PA 209 col E_1^-

Cepas donantes	Tiempo de entrada
Hfr H col E_1^+	antes de los 5 minutos
Hfr 4 col E_1^+	
Hfr AT-III A col E_1^+	
112 (F+) col E_1^+	

Los cruzamientos se realizaron en la proporción de 1 donante a 20 receptores. La conjugación se interrumpió a distintos tiempos con homogeneizadora.

C) Porcentaje de células col E_1^+ en recombinantes.

En los cruzamientos en los cuales se utilizaron las cepas Hfr H col E_1^+ , Hfr 4 col E_1^+ , Hfr 2 col E_1^+ y Hfr AT-III A col E_1^+ como donantes y PA 209 col E_1^- como receptora, se seleccionaron distintos tipos de recombinantes. Estos recombinantes se picaron, se sembraron en forma ordenada sobre cajas del mismo medio selectivo y se determinó el carácter col+ o col- de cada uno de ellos.

El número de recombinantes de cada tipo y cada Hfr analizado, y el porcentaje de colicinógenos observado figuran en la Tabla 6 .

El porcentaje de células colicinógenas en las distintas clases de recombinantes es similar y en todos los casos supera ligeramen-

te al 50%. Es decir pues que el carácter col E_1 no presenta ligamiento con los caracteres T, L, H y Tr, los cuales se encuentran ubicados en distintos lugares a lo largo del grupo de ligamiento genético de E. coli K12 (ver Figura 1).

TABLA 6

Porcentaje de células colicinógenas entre recombinantes de cruzamientos Hfr col E_1^+ x PA 209 col E_1^-

Cepas donantes	R e c o m b i n a n t e s			
	T ⁺ L ⁺ Sr	Tr ⁺ Sr	H ⁺ Sr	Arg ⁺ Sr
Hfr H col E_1^+	65 (115)	67(115)	64(100)	68(120)
Hfr 4 col E_1^+		73(100)	57(110)	58(100)
Hfr 2 col E_1^+	57(140)	68(98)	75(100)	59(140)
Hfr AT-III A col E_1^+	79(100)	86(105)	74(105)	77(30)

Los cruzamientos fueron realizados en la proporción de 1 Hfr a 20 F- y el porcentaje de células col E_1^+ entre recombinantes corresponde a los 90 minutos de iniciada la conjugación. Se indica entre paréntesis el número de colonias de cada tipo analizadas.

CAPITULO IV

CRUZAMIENTOS Hfr col E₁- x F- col E₁+

A) Transferencia de col E₁-:

Se realizaron los cruzamientos recíprocos Hfr col E₁- x F- col E₁+ en las proporciones de 1 Hfr a 20 F- y de 20 Hfr a 1 F- para determinar si había transferencia del carácter col- a la célula receptora.

Como en el caso de los cruzamientos Hfr col E₁+ x F- col E₁- se seleccionaron recombinantes diferentes, luego se repicaron éstos al mismo medio selectivo y se determinó el carácter colicinógeno de los mismos frente a una cepa indicadora sensible a la colicina E₁.

Los resultados obtenidos están resumidos en la Tabla 7. También se consignan en esta tabla los porcentajes de células colicinógenas entre las células F- (Sr) correspondientes a los **cr**uzamientos realizados en la proporción de 20 células donantes a 1 célula receptora.

De los datos de la tabla 7 resulta evidente de que el factor col E₁- no aparece en los recombinantes ni entre las células Sr (receptoras).

TABLA 7

Porcentaje de células col- entre recombinantes de cruzamientos Hfr col E₁⁻ x PA 209 col E₁⁺, realizadas en la proporción de 1 Hfr : 20 F- y de 20 Hfr : 1 F-

Cepa donante	Proporción de número de células donantes a receptoras en la mezcla	Recombinantes		F-(Sr)
		T ⁺ L ⁺ Sr	Arg ⁺ Sr	
Hfr H col E ₁ ⁻	1 : 20	0(220)		
	20 : 1	0(220)		0(370)
Hfr 4 Col E ₁ ⁻	1 : 20		0(21)	
	20 : 1		0(22)	0(300)
Hfr 2 col E ₁ ⁻	1 : 20	0(42)		
	20 : 1	0(41)		0(200)

Figuras entre paréntesis el número de colonias analizadas.

B) Cigosis letal:

La no aparición del carácter col- en las bacterias receptoras podría deberse a: 1) no transferencia del factor col- de la bacteria donante a la receptora ó 2) muerte o desaparición de aquellos recombinantes o cigotas que hubiesen recibido el carácter col- .

Para decidir sobre la validez de esta segunda posibilidad, se realizaron cruzamientos en la proporción de 20 donantes a 1 recep-

tora, en los cuales se determinó el número de células receptoras a los 0 minutos y a los 90 minutos de iniciada la mezcla de las cepas (Tabla 8).

TABLA 8

Determinación del número de bacterias receptoras a los 0 y a los 90 minutos de iniciada la mezcla de las cepas en cruzamientos Hfr col E₁⁻ x PA 209 col E₁⁻ y Hfr col E₁⁻ x PA 209 col E₁⁺ realizados en la proporción de 20 Hfr a 1 F-

Cepas donantes	Tiempo de conjugación en minutos	Cepas receptoras		
		PA 209 col E ₁ ⁻	PA 209 col E ₁ ⁺	
Hfr H col E ₁ ⁻	Exp. 1	0	1.3x10 ⁷	6 x10 ⁶
		90	7 x10 ⁶	7 x10 ⁶
	Exp. 2	0	1.4x10 ⁷	1.6x10 ⁷
		90	5 x10 ⁶	5 x10 ⁶
Hfr 4 col E ₁ ⁻	Exp. 1	0	1.4x10 ⁷	1 x10 ⁷
		90	3,2x10 ⁷	3 x10 ⁷
Hfr 2 col E ₁ ⁻	Exp. 1	0	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷
		90	1.8x10 ⁷	1.7x10 ⁷
	Exp. 2	0	1.6x10 ⁷	1.1x10 ⁷
		90	4.6x10 ⁷	2 x10 ⁷

Los resultados que figuran en la Tabla 8 muestran que no sólo no hay muerte de las células receptoras, sino que éstas llegan a duplicarse y aún a triplicarse hasta los 90 minutos, con excepción de aquellos cruzamientos en los cuales actúa como donante la HfrH. En éste último caso, si bien se observa a los 90 minutos disminución en el número de bacterias receptoras respecto al número inicial, tal disminución no puede ser atribuida a la presencia o transferencia del factor col E_1^- a la célula receptora, ya que aparece también en los cruzamientos controles HfrH col- x F- col- realizados en la proporción de 20 : 1 .

Este comportamiento un tanto anómalo de las bacterias F- que se conjugan con cepas HfrH o derivadas de ella, como donantes en la proporción de 20 Hfr : 1 F- , había sido observada previamente por Nagel de Zwaig et al. (1962). En los cruzamientos HfrH x F- realizados en proporción 20 : 1, el número de células F- mostraba una disminución que oscilaba, en distintos experimentos, desde el 0 hasta el 92%, referido al recuento viable al tiempo de mezcla. En ese estudio se descartó que la disminución pudiera deberse a algún tipo de aglutinación de las células F- en presencia de un exceso de células HfrH, por tratamiento de la mezcla en homogeneizadora antes de la siembra.

Tampoco en esos casos la "cigosis" de las F- pudo ser atribuida a la transferencia de factores col+ o col- .

Además de los cruzamientos que figuran en la Tabla 8, se hizo un cruzamiento en proporción 20 ; 1 , utilizando como receptora la

cepa PA 209 col E_1^+ hecha colicinógena por cultivo mixto, y como donante la cepa Hfr 2 col E_1^- . Al igual que en el cruzamiento con la cepa PA 209 hecha colicinógena por transducción, esta cepa PA 209 no sólo no disminuyó su número, sino que lo triplicó al cabo de los 90 minutos de iniciarse la conjugación. Tampoco se observó en este caso transferencia del factor col E_1^- .

CAPITULO V

CINETICA DE TRANSFERENCIA DE col E₁ EN CRUZAMIENTOS

Hfr col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻ y F⁺ col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻

Las altas frecuencias de transferencia de col E₁ observadas en los cruzamientos entre cepas Hfr col E₁⁺ o F⁺ col E₁⁺ y la cepa PA 209 col E₁⁻, similares a las encontradas anteriormente por Nagel de Zwaig, et al. (1962) para el factor colicinógeno V, inducían a suponer que al igual que este último, col E₁ no sólo se transfería con máxima eficiencia en la conjugación, sino de que además, una vez en la célula receptora, era capaz de expresarse y multiplicarse sin requerir integración al cromosoma.

Para verificar esta presunción se estudió la cinética de transferencia del factor col E₁ en cruzamientos :

Hfr H col E₁⁺ x PA 209 col E₁⁻ ; Hfr 2 col E₁⁺ x PA 209 col E₁⁻ y 112 (F⁺) col E₁⁺ x PA 209 col E₁⁻ , realizados en la proporción de 1 donante a 20 receptoras y de 1 donante a 1 receptora. En estos experimentos se tomaron muestras de la mezcla conjugante a distintos tiempos, se diluyeron y trataron en homogeneizadora (ver Métodos).

A) Cruzamientos realizados en la proporción de 1 donante a 20 receptoras.

En la figura 2 se representa el incremento en el número de células col⁺ Sr en el cruzamiento Hfr H col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻, desde

la iniciación de la conjugación hasta los 200 minutos.

Cinéticas similares a ésta han sido observadas en el cruzamiento Hfr 2 col E_1^+ x F- col E_1^- (Figura 3).

En la figura 2 se observa que:

a) los recombinantes cromosómicos aumentan inicialmente su número con pendiente rápida, esta pendiente va luego disminuyendo gradualmente hasta alcanzar, aproximadamente a los 90 minutos, un "plateau" que se extiende hasta los 120-140 minutos y que corresponde a una frecuencia de recombinación de alrededor de 40-50 % .

A partir de los 120-140 minutos los recombinantes comienzan a dividirse al mismo ritmo que las células F- (Sr) de la población.

b) Las células col+ Sr también presentan un rápido incremento inicial; luego la pendiente va disminuyendo, pero, a diferencia de lo observado con los recombinantes T^+L^+Sr , no presentan plateau. A partir de los 90-100 minutos aumentan su número paralelamente al resto de las células F-. A los 120 minutos se suelen registrar frecuencias de col+ Sr de 800-1000, a veces mayores, alcanzándose en algunos casos frecuencias de hasta 2000% .

Cuando un determinante cromosómico se transfiere de una cepa donante a una cigota, sólo es transmitido a la descendencia de la misma después de un proceso de integración. (Wollman, Jacob y Hayes, 1956). Es decir que la frecuencia medida para recombinantes cromosómicos es consecuencia de dos eventos sucesivos: la transferencia y la integración. Mientras el proceso de integración no se complete, el determinante cromosómico de la donante se podrá expresarse

sar si es dominante, pero no se multiplicará. De allí que los recombinantes cromosómicos presenten un "plateau".

El hecho de que las células col+ Sr no presenten este "plateau" es índice de que el factor col E_1 , a diferencia de los factores cromosómicos, no requiere integrarse para multiplicarse.

Sin embargo, en ciertos experimentos no se ha observado formación de plateau en la cinética de formación de recombinantes, según se observa en la Figura 4.

Cabrían dos posibilidades para explicar este comportamiento:

a) que los marcadores cromosómicos puedan completar su integración tempranamente, de modo de comenzar a dividirse desde los 90 minutos. Esta posibilidad debe descartarse según se verá más adelante por los resultados de las cinéticas de formación de células col+ Sr y recombinantes cromosómicos observadas en cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras, en los cuales se interrumpió a determinado tiempo la conjugación con fago T_6 y en cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 1 célula receptora.

b) que las células donantes sean capaces, bajo ciertas condiciones de seguir conjugándose hasta los 120 minutos.

La cinética de formación de las células col+ Sr en los cruzamientos $F^+ \text{ col } E_1^+ \times F^- \text{ col } E_1^-$ es similar a la observada con las Hfr, aún cuando la pendiente de las células col+ Sr después de los 120 minutos de iniciada la conjugación, es un poco mayor que la correspondiente a las células F^- (Figura 6).

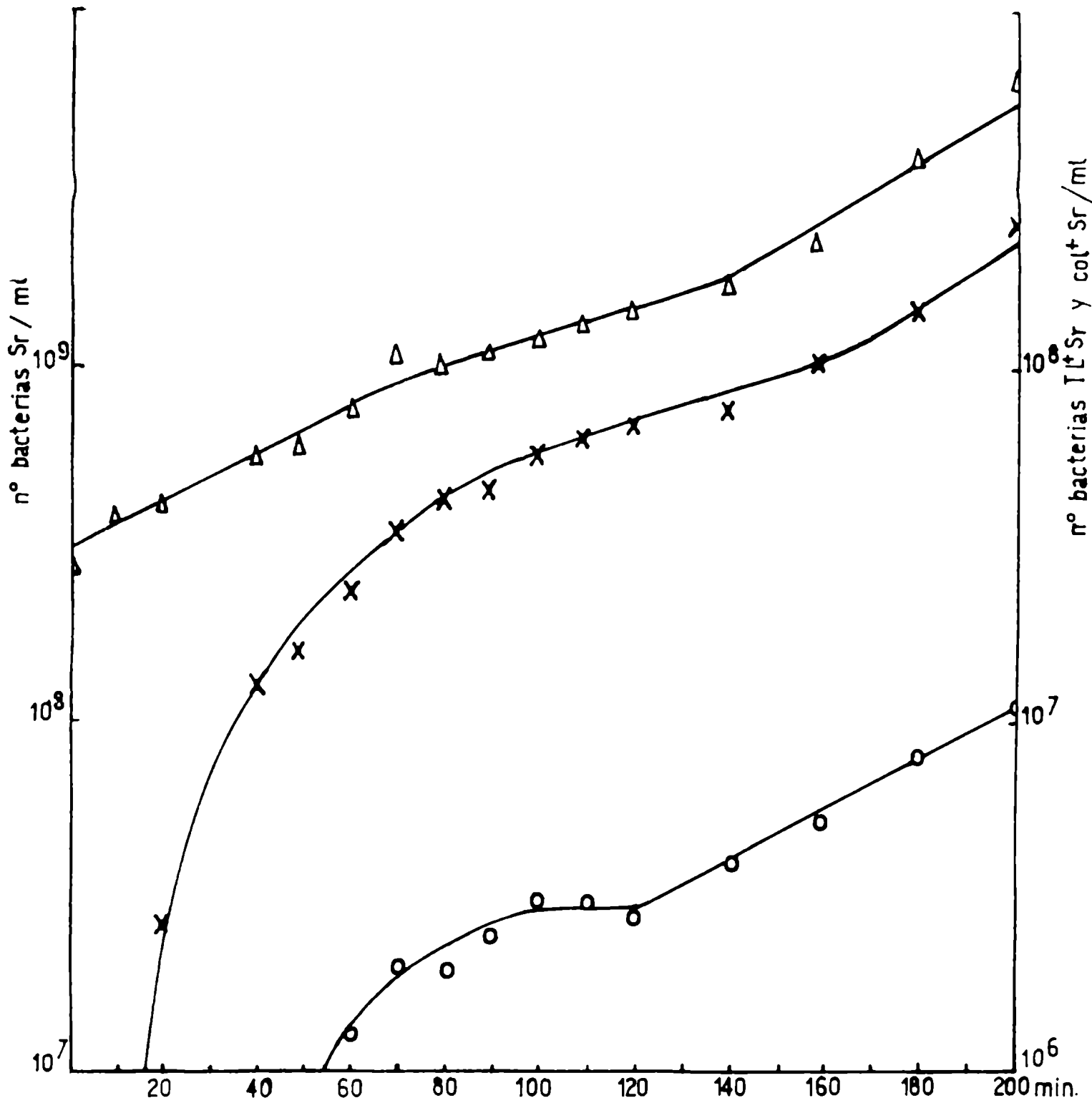


FIG. 2

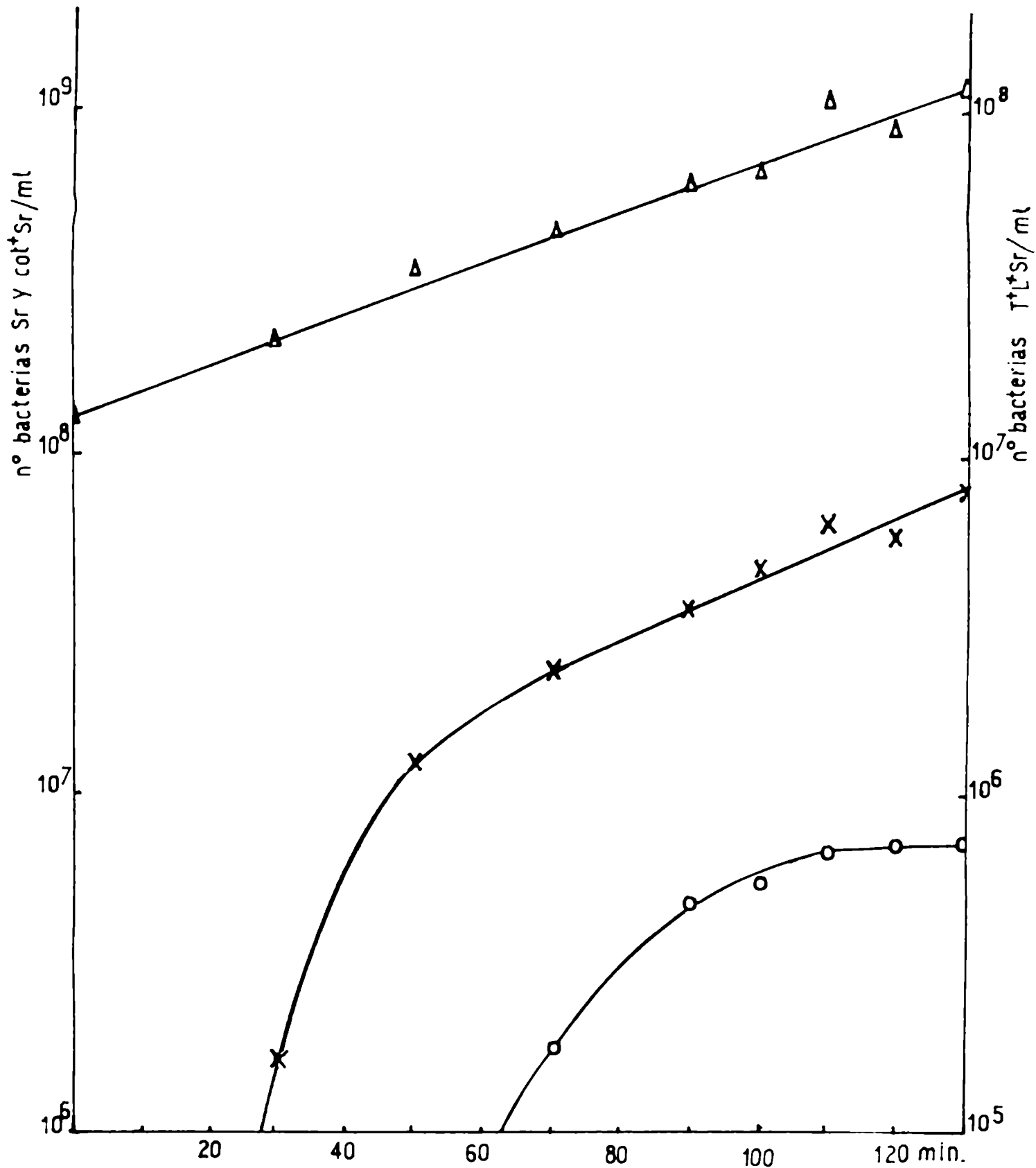


FIG. 3

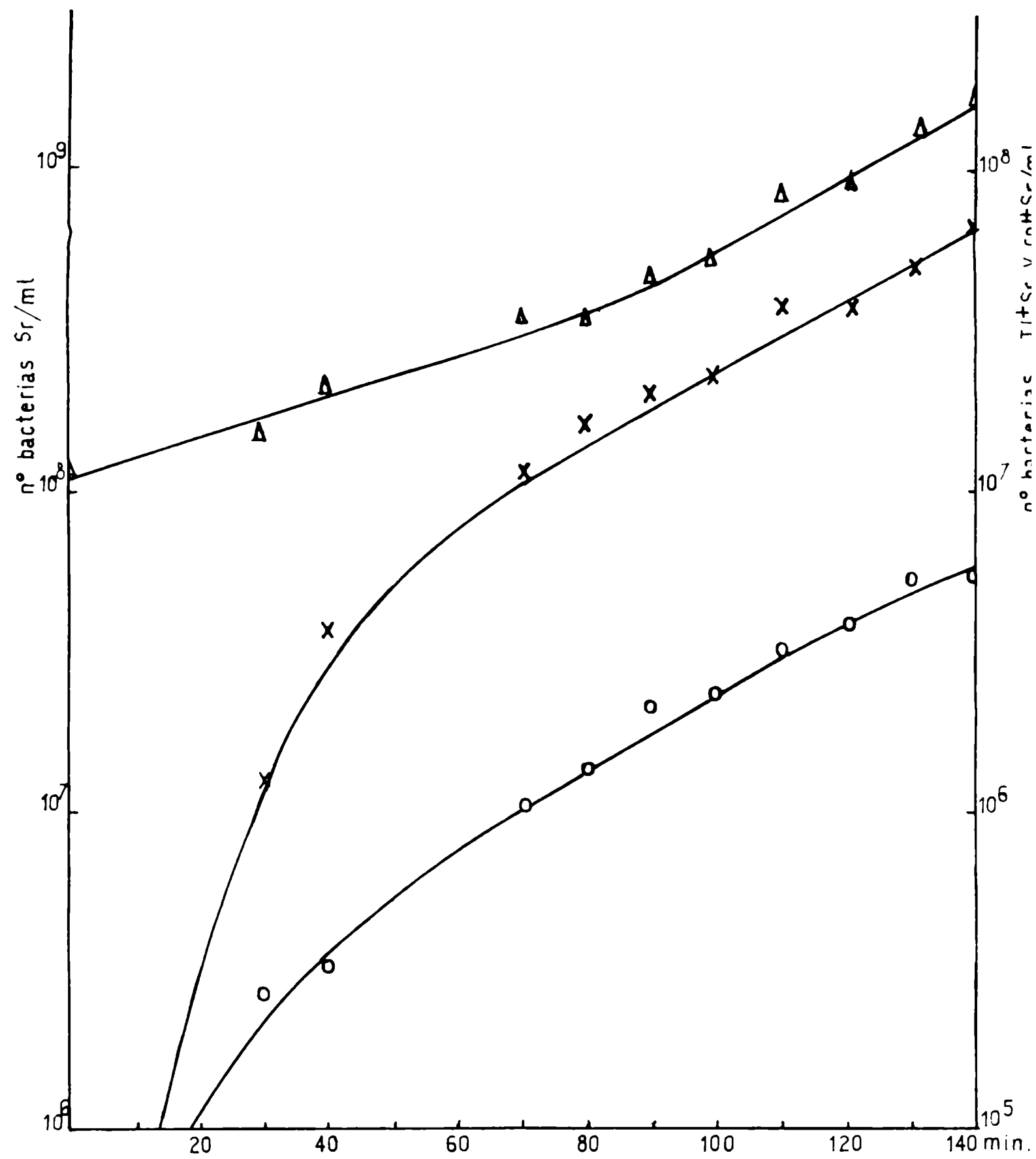


FIG. 4

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

- Figura 2. Cinética de aumento de las células col+ Sr y T⁺L⁺Sr en el cruzamiento Hfr H col E₁⁺ x PA 209 col E₁⁻ realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. Se tomaron muestras de la mezcla conjugante a distintos tiempos, se trataron en homogeneizadora, se diluyeron y sembraron sobre medio selectivo. A los 100 minutos de iniciada la conjugación se realizó una dilución 1/10 en caldo nutritivo para mantener las bacterias en fase logarítmica, y se extrajeron muestras de ella después de los 120 minutos.
- Figura 3. Cinética del aumento de las células col+ Sr y T⁺L⁺Sr en el cruzamiento Hfr 2 col E₁⁺ x PA 209 col E₁⁻ realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. Se tomaron a distintos tiempos muestras de la mezcla conjugante, se trataron en homogeneizadora, se diluyeron y sembraron sobre medio selectivo.
- Figura 4. Cinética de aumento de las células col+ Sr y T⁺L⁺Sr en el cruzamiento Hfr H col E₁⁺ x PA 209 col. E₁⁻ realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. A los 40 minutos de iniciada la conjugación se realizó una dilución 1/10 en caldo nutritivo. El procedimiento es igual al indicado en Figura 3.

Cruzamientos en los cuales se interrumpió la conjugación con fago T₆

Se realizaron conjugaciones en la proporción de 1 célula donante T₆^S a 20 células receptoras T₆^R, en las cuales se interrumpió la conjugación a los 40 o 60 minutos de iniciada la misma por tratamiento con fago T₆ a alta multiplicidad de infección y estreptomomicina (ver Métodos), con el objeto de comparar el comportamiento de las células col⁺ Sr y de recombinantes para un marcador cromosómico proximal de las Hfr en la mezcla tratada, en ausencia de conjugación, con el de una mezcla control.

En la figura 5 se registra el aumento de las células col⁺ Sr y de los recombinantes T⁺L⁺ Sr en el cruzamiento :
Hfr 2 T₆^S col E₁⁺ x PA 209 T₆^R col E₁⁻, en el cual se adicionó el fago y la estreptomomicina a los 40 minutos de iniciada la conjugación.

En esta figura se observa que:

a) Los recombinantes cromosómicos no aumentan su número desde el momento del tratamiento hasta los 140 minutos. Por el contrario, en el cruzamiento control continúan aumentando su número hasta aproximadamente los 120 minutos. Ello es índice de que el aumento de recombinantes observado entre los 60 y 100 ó 120 minutos en algunos de los cruzamientos realizados en la proporción de 1 donante a 20 receptoras, no se debe a integración temprana del factor y ulterior incremento por división celular; de ser realmente así tal incremento se hubiese manifestado también en la mez

cla tratada, aún después de la muerte de las células donantes originales. Tal aumento de recombinantes en el cruzamiento control sólo puede explicarse por conjugaciones tardías entre la donante original y las células receptoras.

b) Inmediatamente después del tratamiento con fago T_6 , las células col+ Sr continúan aumentando a igual velocidad que las células F- de la población. El mayor aumento de estas mismas células en la mezcla control sería debido a conjugación.

Cinéticas similares a la de la Figura 5 han sido observadas en experimentos en los cuales se utilizaron las cepas Hfr II col E_1^+ T_6^S y F+ col E_1^+ T_6^S como donantes (Figura 6).

El hecho de que las células col+ Sr originadas en el cruzamiento F+ col E_1^+ x F- col E_1^- continúen aumentando paralelamente a las células F- después del tratamiento con fago T_6 sugiere que el factor F no pasa a alta frecuencia conjuntamente con col E_1 , al menos hasta los 60 minutos de iniciada la conjugación. Si F se transfiriese a alta frecuencia debería esperarse que un alto porcentaje de las cigotas recibiese simultáneamente ambos factores, haciéndose así donantes potenciales de col E_1 , las cuales podrían transferir col E_1 a las restantes células F- .

Cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 1 célula receptora.

En la figura 7 se registran las cinéticas de formación de re -

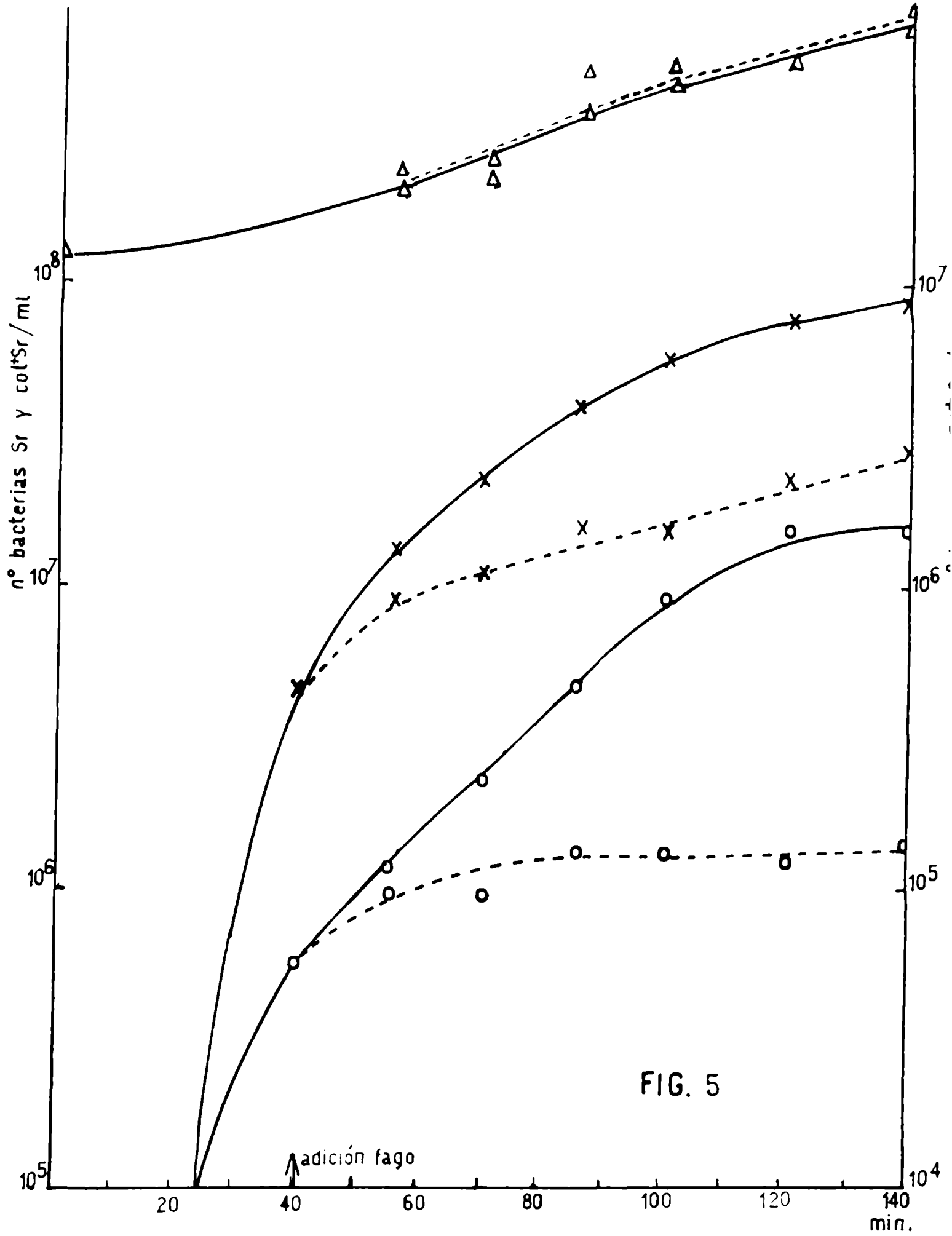
combinantes T^+L^+Sr y de células $col^+ Sr$ observadas en los cruza - mientos $Hfr H col E_1^+ \times F^- col E_1^-$ realizados en la proporción de mezcla 1 donante a 1 receptora. En estas condiciones se hacen mucho más netas las diferencias entre las cinéticas de formación de células $col^+ Sr$ y las de formación de recombinantes T^+L^+Sr , entre los 70 y 140 minutos de iniciada la conjugación, que en los cruza - mientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 célu - las receptoras.

De la comparación de los resultados de los cruzamientos reali - zados en la proporción 1 : 1 , respecto de los 1 : 20, se despren - de que:

a) la frecuencia de recombinación para marcadores cromosómicos es mucho menor (15 a 20 % para los marcadores T^+L^+ frente al 40 - 50 % obtenido en los cruzamientos 1 : 20).

b) la frecuencia de transferencia de col^+ es también menor (del orden del 300 % frente al 800 - 1000 % obtenido en el cruzamiento 1 : 20).

En los cruzamientos realizados en proporción de 1 donante a 1 receptora el plateau de formación de recombinantes se manifesta - ría más tempranamente que en los cruzamientos 1 : 20 y por ende la frecuencia de éstos será menor debido a que al estar ambas ce - pas en iguales proporciones, son menores las probabilidades de ul - teriores conjugaciones con células F^- , que cuando éstas se encuen - tran en exceso.



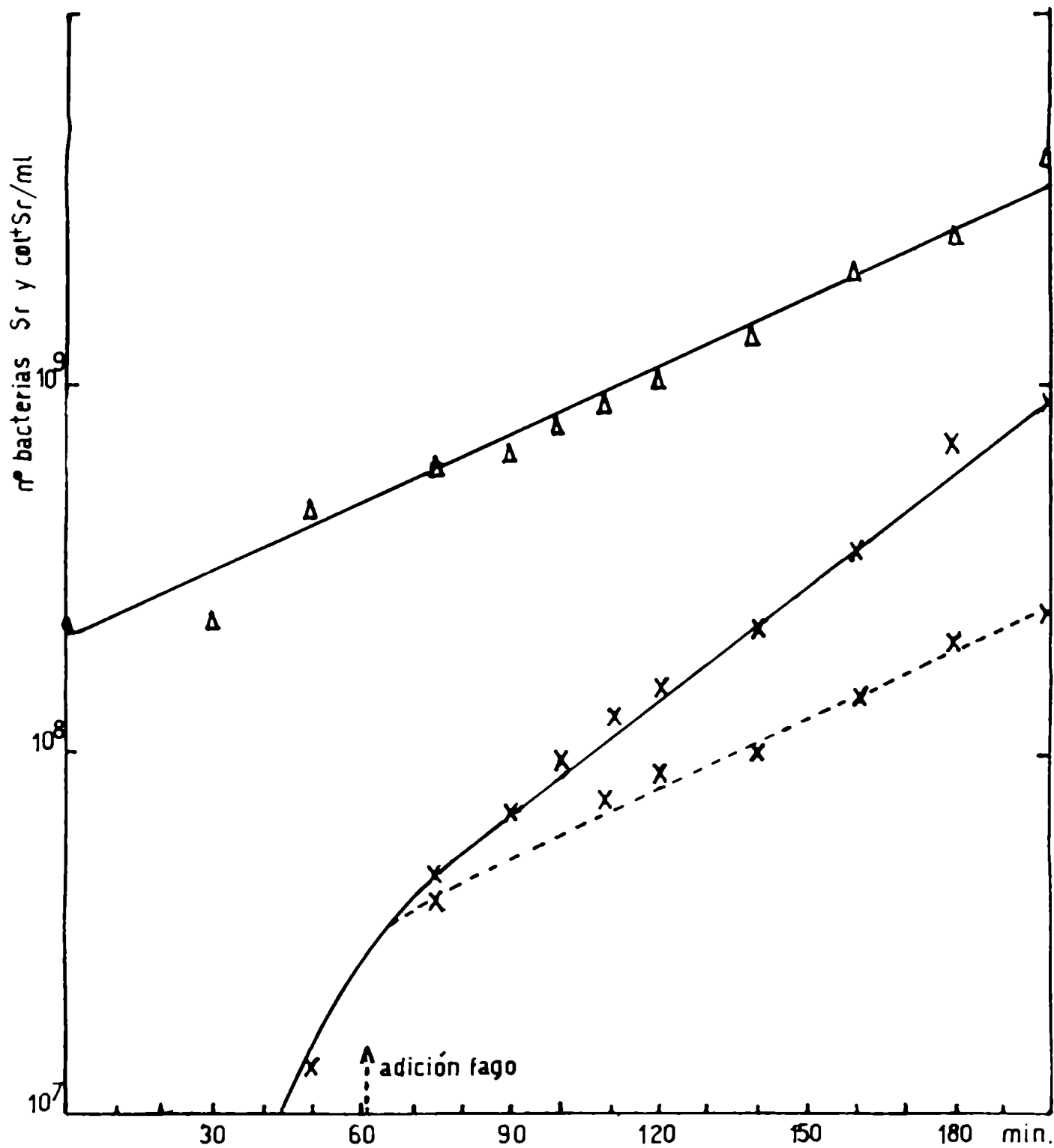


FIG. 6

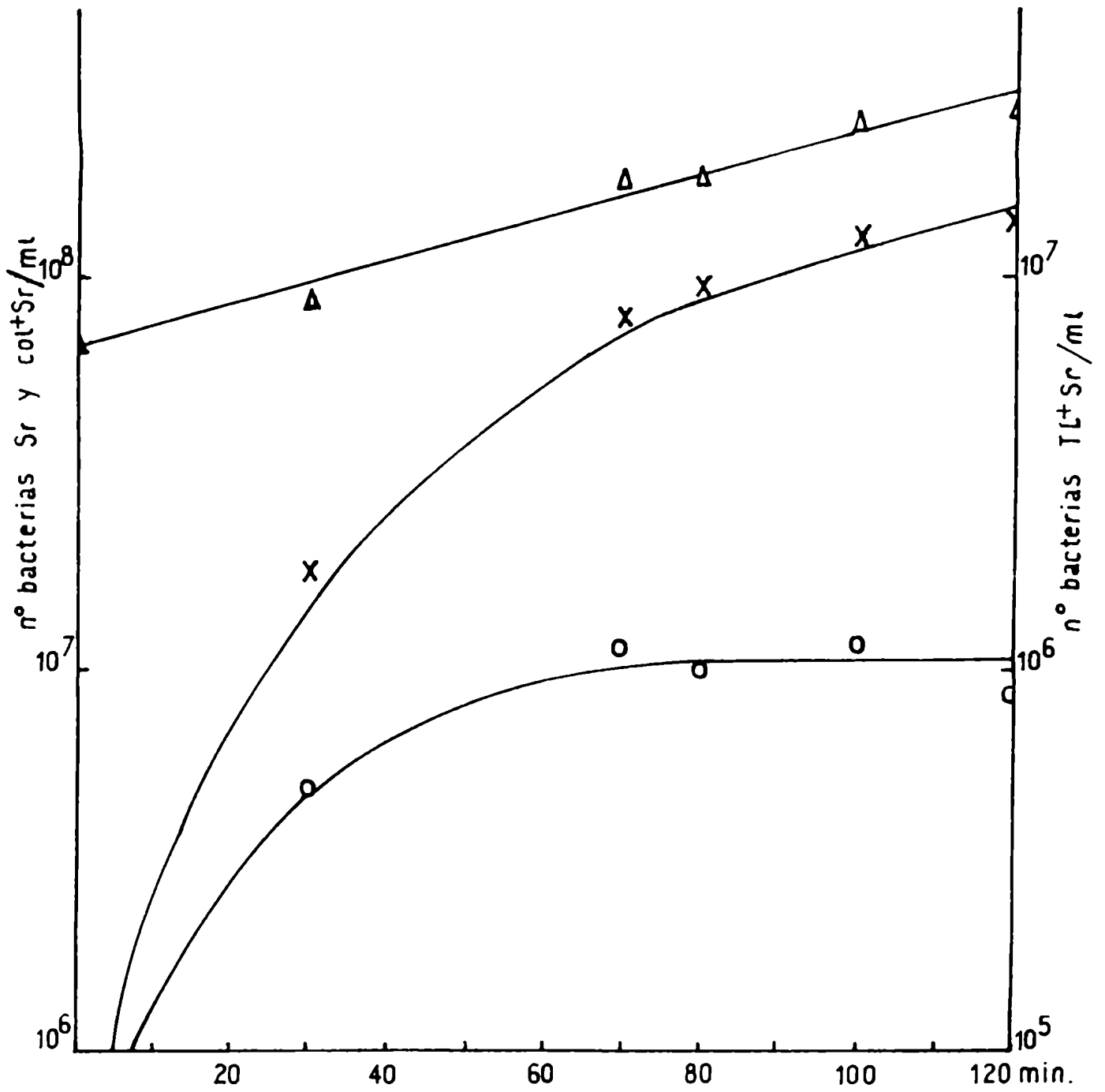


FIG. 7

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Figura 5. Cinética de formación de células col+ Sr y T^+L^+Sr en el cruzamiento Hfr 2 col $E_1^S + T_6^S$ x PA 209 col $E_1^-T_6^R$ realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. A una alícuota de la mezcla conjugante se le adicionó fago T_6 a alta multiplicidad de infección y estreptomycinina a los 40 minutos de iniciada la conjugación.

Se indica en línea continua el aumento de las células en la mezcla control y con línea punteada el correspondiente en la tratada con T_6 .

Δ células Sr - x células col+ Sr - o células T^+L^+Sr .

Figura 6. Cinética de formación de células col+ Sr en el cruzamiento 112 (F+) col $E_1^S + T_6^S$ x PA 209 col $E_1^-T_6^R$ realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras, realizado según se indica en figura 5. Se señalan con línea continua y con línea punteada el aumento de las células en las mezclas control y tratada respectivamente.

Δ células Sr - x células col+ Sr .

Figura 7. Cinética de formación de células col+ Sr y T^+L^+Sr en el cruzamiento Hfr H col E_1^+ x PA 209 col E_1^- realizado en la proporción de 1 célula donante a 1 célula receptora. El procedimiento es igual al indicado en figura 3.

Δ células Sr - x células col+ Sr - o células T^+L^+Sr .

CAPITULO VI

TRANSFERENCIA DE col E₁⁺ DE CEPAS F- A CEPAS F- Y Hfr

Cruzamiento F- col E₁⁺ x F- col E₁⁻ :

En las cinéticas en las cuales se siguió el aumento en número de células col⁺ Sr (Cap. V) se observó que, en ausencia de la cepa dominante original, éstas continuaban aumentando al mismo ritmo que las células col⁻ de la población. Este hecho sugería que no había aumento de las células col⁺ por transferencia del factor col E₁ de células F- a F-.

Para ratificar esta presunción se realizó un cruzamiento F- col E₁⁺ x F- col E₁⁻ .

Las cepas F- empleadas se prepararon por tratamiento con AO (ver Métodos) de las cepas PA 209 / col E y de C 600 / col E . La cepa derivada de PA 209 se hizo además T⁺L⁺Arg⁺col E₁⁺ por cruzamiento con Hfr 2 col E₁⁺, interrumpido a los 40 minutos con homogeneizadora .

Para la conjugación, se mezclaron ambas F- en proporción de volúmenes 1 : 20 y 20 : 1 , durante 2 horas a 37°C.

Los resultados se indican en la tabla 9.

No se observó, tal como se suponía, transferencia de col E₁ de F- a F- .

TABLA 9

Transferencia de col E₁⁺ en cruzamientoPA 209 T⁺L⁺Arg⁺ col E₁⁺ x C 600 col E₁⁻

Proporción de mezcla	Número de recombinantes T ⁺ L ⁺ Tr ⁺ H ⁺ (selección en medio mínimo y E ₁)	Número de células hechas col ⁺ (selección en medio mínimo con T, L y E ₁).
1 : 20	0	0 (30.000)
20 : 1	0	0 (30.000)

Previamente a la siembra se centrifugó la mezcla conjugante y se re suspendió en buffer.

Entre paréntesis se indica el número de colonias analizadas.

Cruzamiento F⁻ col E₁⁺ x Hfr H col E₁⁻

Si bien quedaba ya claramente establecido que el factor col E₁ no se transfería de células F⁻ a otras F⁻, es decir que no confería polaridad sexual, quedaba aún sin dilucidar el interrogante de si, una vez establecido el puente de conjugación, el factor col E₁ era capaz de pasar a través de él en sentido opuesto al de la polaridad cromosómica, es decir, de células F⁻ a F⁺ o de células F⁻ a Hfr.

Para establecer si existía transferencia de col E₁ de F⁻ a Hfr, se realizó el cruzamiento Hfr H val^r col E₁⁻ x F⁻ col E₁⁺.

La cepa Hfr val^r se obtuvo por selección del recombinante

$T^+L^+Arg^-Tr^+H^+ val^F$ / col E Hfr proveniente del cruzamiento Hfr H / col E_1 x PA 209 $T^+L^+ val^F$. Esta última cepa fué gentilmente cedida por la Lic. D. Antón.

La cepa F^- col E_1^+ empleada es la misma que se utilizó en el cruzamiento F^- col E_1^+ x F^- col E_1^- .

Las cepas se mezclaron en la proporción de volúmenes y la mezcla se incubó durante 2 horas a $37^\circ C$.

La siembra se realizó, previa dilución en buffer, en cajas con medio sintético, adicionado con vitamina B_1 y valina, en las cuales sólo la Hfr podía crecer.

No se observó ninguna colonia col^+ entre aproximadamente 5000 colonias analizadas.

Estos resultados permiten afirmar que la transferencia de col E_1 de F^- a Hfr, si es que realmente ocurre, es de una magnitud muy inferior a la observada en el cruzamiento recíproco. Es decir que la eficiente transferencia de col E_1 observada en las conjugaciones se cumple gracias a la presencia del factor F , ya sea en estado autónomo o integrado, en la misma célula.

CAPITULO VII

CINEETICAS DE TRANSFERENCIA DE col V EN CRUZAMIENTOS

Hfr+ col V+ x F- col V- y F+ col V+ x F- col V- .

Cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. Interrupción de la conjugación con fago T₆ :

Las cinéticas de transferencia del factor col V estudiadas por Nagel de Zwaig et al. (1962) indicaban que el factor col V presentaba un comportamiento muy similar al factor col E₁. En estos estudios se había evidenciado que en los cruzamientos F+colV+ x F-colV- las células col+ Sr aumentaban su número después de los 80 minutos de iniciada la conjugación a mayor velocidad que las células col- de la población. Ello sugería que algún otro factor intervenía, además del correspondiente a la división celular. Dos hipótesis se formularon (N. de Zwaig et al. 1962) para explicar ese mayor aumento en el número de las células col+ Sr : a) que las células donantes originales (F+) fuesen capaces de reconjugarse con células F- col- , b) que como consecuencia de la transferencia conjunta del factor F y de col V a una misma cigota, ésta adquiriese la capacidad de transferir col V a otras células F- .

[Posteriormente, D.N. Antón (comunicación personal) observó que las cepas consideradas como productoras de col V producían además de la colicina V, la colicina I, y que ambas se transferían conjuntamente en la conjugación. Nos referiremos en el presente trabajo a

estas cepas como (col V-col I)+ }]

Para decidir entre ambas hipótesis se realizaron cruzamientos F^+ (col V-col I)+ x F^- (col V-col I)-, en la proporción de 1 F^+ : 20 F^- , en los cuales se mató a las células donantes a los 60 minutos con fago T_6 a alta m.i. y estreptomicina (Figura 8).

Se puede observar en la Figura 8 que, a diferencia de lo que ocurría en los cruzamientos F^+ col E_1^+ x F^- col E_1^- , una vez mata da la cepa donante original (F^+ (col V-col I)+), las células col+ Sr seguían aumentando en número con pendiente mayor que las otras células F^- .

Este resultado parecía indicar que, como se postulara en b), po dría ocurrir la transferencia conjunta de F^+ y col V- col I a algu nas de las cigotas, las que se convertirían así en nuevas donantes.

Experimentos similares al descrito se llevaron a cabo también con las cepas Hfr H (col V- col I)+ y Hfr 2 (col V- col I)+ como do nantes. Como en las cepas Hfr no existen partículas F en estado autónomo, la transferencia conjunta de col V- col I y F no podría tener lugar, de modo que era dable esperar que la pendiente de au mento de las células col+ Sr en ausencia de las células donantes originales fuese paralela a la de las otras células F^- , tal como ocurrió en las cinéticas con el factor col E_1 .

Sin embargo, y contrariamente a lo esperado, se observó que la pendiente de aumento de las células col+ Sr era mayor que la de las células F^- , una vez matada la cepa donante Hfr.

Estos resultados, si bien no permitían excluir la hipótesis de

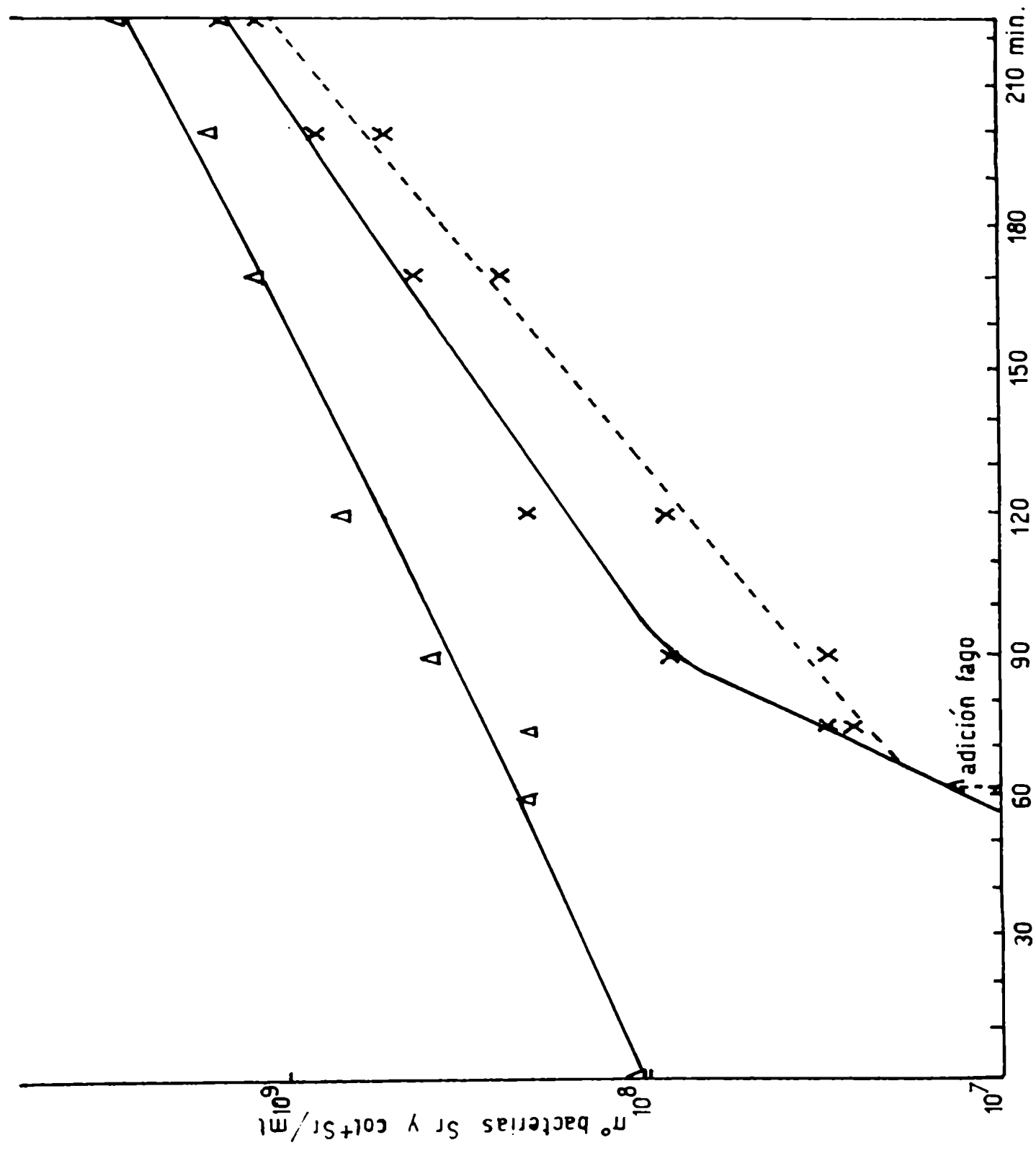


FIG. 8

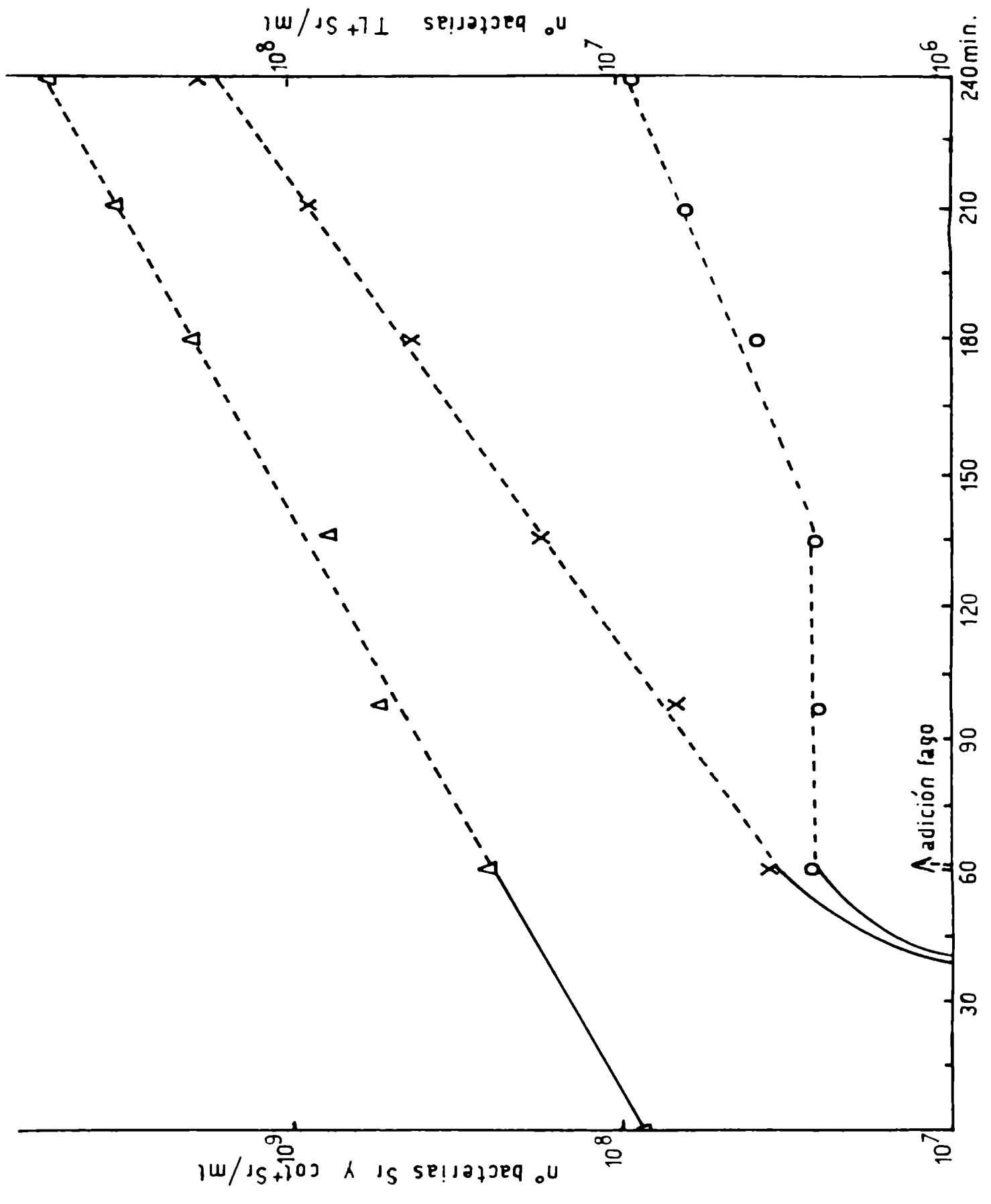


FIG. 9

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

FIGURA 8 : Cinética de aumento de las células col+ Sr en el cruzamiento:

112 (F+) (colV-colI)+ T₆^S x PA 209 (colV-colI)- T₆^R
realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. El tratamiento con fago se realizó a los 60 minutos. Se hicieron diluciones 1/10 en caldo nutricio de la muestra control y de la tratada a los 100 minutos de comenzada la conjugación para mantener los cultivos en fase logarítmica. En línea entera se indica el aumento de células en la mezcla control, en línea punteada la correspondiente a la mezcla tratada con fago.

Δ células Sr x células col+ Sr .

FIGURA 9 : Cinética de aumento de las células col+ Sr y T⁺L⁺Sr en el cruzamiento :

Hfr 2 (colV-colI)+ T₆^S x PA 209 (colV-colI)- T₆^R
realizado en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras. El procedimiento es igual al indicado en la figura 8.

Se señala con línea punteada el aumento de células en la mezcla después del tratamiento con fago.

Δ células Sr x células col+ Sr
o células T⁺L⁺Sr

transferencia conjunta de factores F+ y col V- col I , sugirieron una nueva posibilidad: que los factores col V- col I , (ambos, o sólo uno de ellos) llevaran en su propio genomio la capacidad de conferir fertilidad, al menos para posibilitar su propia transferencia.

Comportamiento de células col+ Sr frente al fago MS2:

Se picaron 33 colonias (col V-col I)+ Sr provenientes del cruceamiento Hfr 2 (col V-col I)+ x PA 209 (col V-col I)-, 7 colonias col V-col I)+Sr del cruceamiento Hfr H col V-(col V-col I)+ x PA 209 (col V-col I)- y 20 colonias (col V-col I)+ Sr del cruceamiento 112 (F+) (col V-col I)+ x PA 209 (col V-col I)- y se probaron frente al fago MS2 (Davis, Strauss y Sinsheimer, 1961). Todas ellas resultaron ser sensibles a este fago.

Se analizaron también 205 recombinantes T⁺L⁺Sr del cruceamiento Hfr H (col V-col I)+ x PA 209 (col V-col I)- , de los cuales 37 eran (col V-col I)- resistentes al fago MS2 y 168 eran (col V-col I)+ y sensibles al mismo. No se observó segregación entre los caracteres col V y col I en alrededor de 500 recombinantes analizados.

Transferencia de col V - col I de F- a F- :

En vista del resultado de los experimentos de cinética de aumento de las células (col V-col I)+ Sr en ausencia de conjugación, así como de la sensibilidad al fago MS2 de las bacterias F-(col V-col I)+, se realizó un cruceamiento entre cepas F- para determinar si los fag

tores col V- col I se transferían en estas condiciones. Para ello se mezclaron en proporción de 1 a 20, durante 2 horas, a 37°C una cepa F- T⁺L⁺Arg⁺ (col V-col I)+ Sr val^S (valina sensible) derivada de PA 209 y otra cepa F- T⁺L⁺ (col V-col I)- val^R Sr , también derivada de PA 209 . Previamente a la siembra se procedió a centrifugar y resuspender la mezcla en buffer. No se detectó formación de recombinantes Arg⁺ val^R; en cambio sí se observó alta frecuencia de células (col V-col I)+ en un medio que solo permitía el crecimiento de la cepa aceptora (col V-col I)- val^R .

Interferencia con la fertilidad cromosómica:

Cuando se intentó verificar la condición de F+ de la cepa 112 F+ (col V-col I)+, se observó de que no presentaba fertilidad para factores cromosómicos, aún cuando la transferencia de col V- col I se cumplía muy eficientemente.

En vista de ello, y para descartar la posibilidad de que se tratase de una particularidad de la cepa empleada, se transfirieron nuevamente los factores col V- col I a la cepa 112 (F+) a partir de la cepa Hfr 2 (col V-col I)+ y de E. coli 12-94. Se aislaron 15 colonias diferentes; todas ellas producían las colicinas V e I y habían perdido prácticamente su fertilidad cromosómica.

Además, Nagel de Zwaig, Antón y Puig (resultados no publicados) habían observado previamente similares interacciones con la fertilidad en las cepas Hfr 4 y Hfr AT-III A. Cuando estas cepas se ha

cian (colV- col I)+ perdían su condición de Hfr; sólo se mantenían como tales aquellas que perdían los factores col V- col I .

Estos hechos ponían de manifiesto un tipo de incompatibilidad entre los factores col V- col I y el factor F .

CAPITULO VIII

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El factor col E₁ como plásmido:

Del estudio de la transferencia del factor col E₁ en cruzamientos Hfr col E₁⁺ ó F⁺ col E₁⁺ x F⁻ col E₁⁻ (Cap. III) se deduce que:

- a) El factor col E₁⁺ se transfiere con frecuencias más altas que las que corresponden a los marcadores cromosómicos más tempranos de las células Hfr (Tabla 2).
- b) Se transfiere con frecuencias similares de distintos tipos de células donantes Hfr ó F⁺ (Tabla 2). Así por ejemplo, se transfiere con igual eficiencia de la cepa Hfr H, cuyo cromosoma tiene su origen cerca de los marcadores T L , de la cepa Hfr AT-III A, con origen sobre el otro extremo del grupo de ligamiento de E. coli, cerca de H (ver mapa de E. coli, pág. 16) y de una cepa F⁺ que transfiere su cromosoma con una frecuencia 10⁻⁴ veces menor que las Hfr.
- c) También es transferido de estas mismas cepas donantes muy tempranamente y en tiempos iguales para todas ellas (Tabla 5).
- d) No presenta ligamiento con factores cromosómicos ubicados en distintos lugares del cromosoma de E. coli (Tabla 6).
- e) No interfiere con la fertilidad cromosómica de las cepas donantes (Tabla 3).

Las cinéticas de formación de células col⁺ Sr en cruzamientos

Hfr col E_1^+ x F- col E_1^- y F+ col E_1^+ x F- col E_1^- realizados en proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras y de 1 célula donante a 1 célula receptora (Cap. V), indican que el factor col E_1 , a diferencia de los factores cromosómicos, se multiplica en la cigota sin requerir integración.

Además, de los cruzamientos recíprocos Hfr ó F+ col- x F- col+ (Cap. IV), se concluye que:

- a) el carácter col- de la cepa donante no se transfiere a las cigotas (Tabla 7).
- b) la no aparición del carácter col- entre las células receptoras o los recombinantes no es debida a la muerte de aquellas cigotas que hubiesen recibido el carácter, pues en los cruzamientos realizados en la proporción de 20 células donantes a 1 célula receptora no se observó disminución en el número de células receptoras (Tabla 8). Sólo se observó disminución en el número de células receptoras en los cruzamientos en los cuales se empleó la cepa Hfr H como donante, pero tal disminución no puede atribuirse al pasaje de col-, ya que ocurre también con similar magnitud en los cruzamientos controles col- x col-

Todos estos resultados son coincidentes en el sentido de indicar no localización cromosómica del factor col E_1 en células F+ , Hfr y F- y llevan a incluirlo en la categoría de plásmido.

Las conclusiones alcanzadas en este estudio difieren de las de Alföldi et. al. (1957, 1958) en base a las cuales se ubicó al factor col E_1 en la categoría de episoma. Por otro lado concuerdan

con las obtenidas por Clowes (1963).

Transferencia de col E₁. Inferencias sobre el proceso de conjugación:

Las cinéticas de transferencia de col E₁ indican que, al igual que col V (Nagel de Zwaig et.al. 1962) este factor no sólo se transfiere con máxima eficiencia en la conjugación, sino que además, una vez en la cigota, es capaz de multiplicarse autónomamente y a una velocidad tal que asegura su pasaje a todas las células hijas (Cap. V). Los factores cromosómicos, por el contrario, deben integrarse al cromosoma para multiplicarse, de allí que el aumento de los recombinantes cromosómicos sólo se observa después de los 120 a 140 minutos de iniciada la conjugación, cuando el proceso de integración se ha completado.

La transferencia del factor col⁺ se detecta pues directamente ; en el caso de los factores cromosómicos, en cambio, inciden en las frecuencias de recombinación medidas, dos procesos: la transferencia y la integración.

Las cinéticas de transferencia, así como las frecuencias de transferencia de col E₁ en los cruzamientos realizados en la proporción de 1 Hfr a 1 F⁻ y de 1 Hfr a 20 F⁻ permiten hacer ciertas inferencias acerca de la eficiencia del proceso de conjugación.

En los cruzamientos realizados en la proporción de 1 célula donante a 1 célula receptora las frecuencias de transferencia del 200 - 300 % alcanzadas por col E₁ a los 90 minutos después

del comienzo de la conjugación, pueden explicarse considerando un 100 % de transferencia y ulterior aumento por división celular. En efecto, se observa (Figura 7) que alrededor de los 70 minutos de la iniciación de la conjugación, tiempo al cual los recombinantes cromosómicos alcanzan su "plateau", las células col⁺ Sr alcanzan frecuencias de 120-150 % y que luego continúan aumentando en número a igual ritmo que las otras células F⁻ de la población.

Los recombinantes cromosómicos T⁺L⁺Sr alcanzan en estos experimentos frecuencias del 15 al 20 %. Si se considera el coeficiente de integración calculado por De Haan y Gross (1962) para los marcadores cromosómicos en medio mínimo, se deduce que la transferencia de estos marcadores a la cigota también habría alcanzado en estas condiciones valores cercanos al 100 % .

En los cruzamientos realizados en la proporción de 1 Hfr a 20 F⁻ , (Cap. V) las células col⁺ Sr y los recombinantes T⁺L⁺Sr continúan aumentando su número hasta los 90 - 100 minutos y en algunos casos, hasta los 120 minutos de comenzada la conjugación. Las altas frecuencias alcanzadas por las células col⁺ Sr entre los 90 y 120 minutos, (del orden de 1000-1500 % referido al número inicial de bacterias Hfr en la mezcla) de ningún modo pueden explicarse suponiendo una transferencia de col del 100 % y ulterior aumento por división celular.

Tres hipótesis pueden formularse para explicar tan altas transferencias de col E₁ : 1) Que las células Hfr o sus células hijas sean capaces de reconjugarse; 2) que las células col⁺ Sr se mul-

tipliquen a mayor velocidad que las células col- Sr (F-) y 3) que las células F- col E₁⁺ transfieran col E₁ a otras F- .

Esta última posibilidad debe descartarse pues, se ha constatado (Cap VI) que no hay transferencia de col E₁ de F- a F- . Además, en los experimentos en los cuales se mata la cepa donante con fato T₆ y estreptomycin (Cap. V) se observa que las células col E₁⁺ Sr se dividen al mismo ritmo que las otras células F- . En consecuencia los altos valores de transferencia de col E₁ deben atribuirse al hecho de que las células donantes (o sus células hijas) son capaces de reconjugarse.

A igual conclusión se llega por el análisis de la frecuencia de recombinantes cromosómicos ya que alcanza valores del orden del 50 % a los 100 minutos de efectuada la mezcla . De acuerdo con el coeficiente de integración calculado por De Haan y Gross , la transferencia de estos marcadores tempranos habría sido del 150 - 200 % .

Dado que los choques entre bacterias donantes y receptoras se efectúa al azar. las probabilidades de que una bacteria donante vuelva a entrar en contacto con una célula receptora son mucho mayores en estos experimentos que en los realizados en la proporción de 1 donante a 1 receptora. Los resultados obtenidos sugieren, coincidentemente, que en las conjugaciones realizadas en la proporción de 1 célula donante a 20 células receptoras, una célula donante es capaz de formar contactos eficaces con más de una F-, ya sea por formación de varios puentes simultáneos o por con

jugaciones sucesivas.

Las frecuencias de transferencia de col V- col I son similares a las de col E₁ (Cap. VII). Más adelante se discutirán las diferencias observadas entre la cinética de aumento de las células (col V- col I)+ Sr y las col E₁+ Sr .

Muy altas frecuencias de transferencia fueron medidas también para los factores R (resistencia a sulfonamida, estreptomicina , cloranfenicol y tetraciclina) por Watanabe (1963a), en condiciones similares al sistema de alta transferencia de colicinogenia (HFC) encontrado por Stocker, Smith y Ozeki (1963) en S. typhimurium para el factor col I.

Las frecuencias de transferencia de los factores R en este sistema alcanzaban valores del 150 al 750 % (referido al número de células donantes resistentes en la mezcla), después de 1 hora a 37^oC, aún cuando en las condiciones usuales de transferencia sólo detectaban frecuencias del 3 % en igual tiempo.

Para explicar las altas transferencias observadas postulan, entre otros, como mecanismos posibles: a) que los ex-conjugantes puedan volver a conjugarse con otras receptoras y transferirles R. b) que las células receptoras que recibieron R puedan transferirlo a su vez a otras F- con alta frecuencia.

Cinéticas de transferencia similares a las de los factores col E₁ y col V han sido observadas para el factor F-gal (de Haan y Stouthamer, 1962).

Con respecto al factor F si bien no se han seguido las cinéti-

cas de transferencia, los estudios realizados (Cavalli, Sforza , Lederberg y Lederberg, 1953) indican que éste se transfiere rápidamente y eficientemente de células F+ a F-. Además por el análisis de cigotas individuales se ha llegado a establecer que al igual que estos factores colicinógenos y el F- gal, el factor F se multiplica en éstas autónomamente, de modo tal que todas las bacterias de la progenie son F+. (Lederberg, 1958).

Factores colicinógenos y factores de fertilidad:

Factor col E₁:

Se observó que el factor col E₁ no se transfiere de células F- a F- (Cap. VI), concordantemente con los resultados de Fredericq (1954,b). Tampoco se detectó transferencia del factor col E₁ de la célula F- a la célula Hfr, (Cap. VI) lo que permite concluir que la transferencia de este factor colicinógeno, si es que realmente tiene lugar en estas condiciones, es de una frecuencia muchísimo menor que la correspondiente al cruzamiento recíproco. Esto indica que la presencia del factor F determina la eficiente transferencia del factor col E₁ en el mismo sentido en que determina la del cromosoma.

Además, las cinéticas de aumento de las células col+ Sr en los cruzamientos F+ col E₁+ x F- col E₁- , en los cuales se mató a determinado tiempo la cepa donante con fago T₆ a alta m.i. (Cap. V), sugieren que el factor F no se transfiere o se transfiere con baja frecuencia , al menos hasta los 60 minutos de iniciada la con-

jugación, a las cigotas que reciben col E_1 .

Clark y Adelberg (1962) distinguen dos tipos de transferencia de material genético, según que exista o no ligamiento con el factor determinante de la polaridad sexual y que denominan conducción y donación, respectivamente. Siguiendo esta clasificación, el factor col E_1 representa un claro ejemplo de donación de material genético, ya que se transfiere con alta eficiencia solamente de cepas F+ o Hfr, por acción del factor F e independientemente de éste.

El factor col E_1 , al igual que los factores col E_2 y col I (Nagel de Zwaig et al., 1962), no presenta interacción con la fertilidad de cepas donantes en E. coli K12 (Cap. III).

Factores col V- col I:

Según se ha visto ya, los factores col V- col I, similarmente al factor col E_1 , se transfieren con máxima eficiencia en la conjugación; sin embargo presentan con este último factor, notables diferencias de comportamiento en lo que respecta a la fertilidad.

Así, la presencia de los factores col V- col I en la cepa 112 (F+) interfiere notablemente con la fertilidad cromosómica (Cap. VII) al punto de hacer la cepa prácticamente infértil. También se observó interferencia con la fertilidad cromosómica en las cepas Hfr 4 y Hfr AT-III A (Nagel de Zwaig, Antón y Puig, resultados no publicados). Tal interferencia no se manifestó, en cambio, en las cepas Hfr H y Hfr 2 .

La pérdida de la fertilidad cromosómica en las cepas (col V- col I)+ no puede atribuirse a exclusión entre el pasaje de col+ y el pasaje de cromosoma (Fisher, 1962), pues col V- col I se transfieren muy eficientemente de cepas tales como la Hfr H y Hfr 2 , sin interferir en absoluto con la fertilidad cromosómica. También debe descartarse un fenómeno de "inducción colicinógena" similar al de la "inducción lisógena", como fuera sugerido por Fredericq y Betz-Bareau (1956), pues las células F- no mueren al recibir los factores col V- col I .

Fredericq y Betz-Bareau (1953, a) mencionan el hecho de que los cruzamientos realizados entre 12 cepas de E. coli productoras de col V como donantes y la cepa de E. coli K12 W1177 resistente a la colicina V como receptora, resultaron infértiles. Fredericq (1953, a) no pudo explicar esta falta de fertilidad por un fenómeno de inducción colicinógena o lisógena; es bastante probable que al igual que en los casos observados en el presente estudio , la misma podría deberse a un tipo de interferencia con el factor F. No se conoce si estas cepas eran también productoras de colicina I.

Por otra parte, las cinéticas de aumento de las células col+Sr en los cruzamientos Hfr ó F+(col V- col I)+ T_6^S x F- (col V- col I)- T_6^F , en los que se mataba a determinado tiempo la cepa donante con fago T_6 (Cap. VII) manifestaron una nueva característica atribuible a los factores col V- col I. En estas cinéticas se observó que, en ausencia de las células donantes originales, las células

(col V- col I)+ Sr, a diferencia de las col E₁+ Sr, aumentaban a mayor velocidad que las otras F- (Cap. VII), lo que sugería la posibilidad de que existiese transferencia de los factores col V- col I de F- a F-. En confirmación de esta presunción se observó que las células F- que recibían los factores col V- col I se hacían sensibles al fago MS2 y que los factores col V- col I se transferían a alta frecuencia en cruzamientos F⁺ x F- (Cap. VII).

Estos resultados nos enfrentan ante dos hechos aparentemente contradictorios: a) los factores col V- col I interfieren con la fertilidad cromosómica en cepas F⁺ y en algunas cepas Hfr de E. coli K12. b) los factores col V- col I confieren fertilidad a cepas F- de modo de posibilitar, al menos, su propia transferencia. Resulta muy atractivo postular que ambas propiedades puedan ser manifestación de un mismo y único proceso, o, dicho en otras palabras, que sea el mismo factor genético que interfiere con la expresión del factor F de E. coli K12, el responsable de la polaridad que permite la transferencia de los factores col V- col I. No sería éste un fenómeno insólito, ya que se conocen ejemplos en E. coli de interferencia entre factores de fertilidad. Tal por ejemplo la exclusión observada entre el F autónomo y el F integrado (Jacob y Wollman, 1961), el F-lac y el F integrado (Scaife y Gross, 1962) o como se discutirá más adelante, la interferencia entre los factores R (que presentan similitudes con el F) y la expresión del F (Watanabe y Fukasawa, 1962). Se pueden así, en base a este esquema, formular dos hipótesis capaces de dar cuenta de

Los hechos observados:

a) que los factores col V- col I, (o sólo uno de ellos), lleven en su propio genoma información para conferir fertilidad, la cual interferiría al mismo tiempo con la información similar llevada por el factor F de E. coli K12.

Avalarían este criterio los experimentos que sindicaron al factor col I como determinante genético de fertilidad en S. typhimurium (Stocker, 1960; Ozeki y Howarth, 1961) y en E. coli (Clowes, 1961).

b) Que los factores col V- col I se transfieren en la conjugación ligados a un factor de fertilidad (F_x) y que sea este último el responsable de la fertilidad y de la interacción con el F de E. coli K12 en algunas cepas F^+ o Hfr .

Apoyan esta segunda hipótesis dos series de experimentos: los de Furness y Rowley (1957), por un lado, quienes observaron que los factores col I y F se encuentran frecuentemente asociados en cepas de E. coli; descartaron que fuese el factor col I el responsable de ambas propiedades (colicinogenia y fertilidad) pues lograron separarlas por tratamiento con cloruro de cobalto; las observaciones de P. Fredericq (1963,b), por otro, que indicarían que los factores colicinógenos V y B se transfieren ligados entre sí y con el factor F.

Una decisión entre ambas hipótesis puede, sin embargo, no resultar sencilla, en el caso de que exista un ligamiento muy estrecho entre el factor de fertilidad y el factor colicinógeno.

No se ha observado segregación entre los caracteres col V y col I entre los recombinantes analizados (Cap. VII).

Se continuará con el estudio de estos factores con el objeto de establecer cual es el factor responsable de la fertilidad e interferencia con la expresión del F en cepas donantes.

Es necesario hacer notar que no se conoce si el factor col I de los denominados aquí factores col V- col I, es idéntico al factor col I estudiado por Stocker y colaboradores o al col I estudiado por Nagel de Zwaig et al. (1962) con el cual no se observara interferencia con la fertilidad de cepas donantes.

Un comportamiento similar al de los factores col V - col I en lo referente a interferencia con la fertilidad cromosómica de cepas F+ y Hfr de E. coli K12 ha sido observado con el factor col B (Puig, 1963). No se estudió aún si este factor confiere fertilidad a cepas R- de E. coli. Los resultados de Stocker et al. (1962) sugieren que este factor, al igual que col I, confiere fertilidad a cepas de S. typhimurium posibilitando su propia transferencia y la de otros factores colicinógenos. De extenderse esta observación a E. coli, el factor col B respondería, también en este aspecto, al mismo tipo de comportamiento que los factores col V- col I.

Comparación con el comportamiento de otros factores colicinógenos:

Los estudios realizados sobre el comportamiento genético de los factores colicinógenos E₂, I, V y B (Nagel de Zwaig et. al., 1962)

Puig, 1963) son coincidentes con el presente estudio pues llevan a postular también para estos factores un determinismo citoplásmico en cepas de E. coli K12.

Al igual que con col E₁, no se observó con ninguno de ellos la existencia de "cigosis letal" atribuible al pasaje del factor col- (Nagel de Zwaig et. al., 1962; Puig, 1963). Tampoco R. Ben Gurion (1963) observó efecto letal sobre las F- en los cruzamientos Hfr col B- x F- col B+ , Hfr col E- col I- x F- col E+ col I+ y Hfr col K- x F- col K+ . Si bien se observó en estos cruzamientos disminución en el número de recombinantes H⁺Sr respecto de los cruzamientos controles, que la autora sugiere pudiesen ser debidos a cigosis letal motivada por la entrada de col-, esta menor frecuencia de recombinantes H⁺Sr podría explicarse por algún otro mecanismo, como por ejemplo, resistencia parcial de las cepas a la colidina involucrada.

En cuanto a la eficiencia de transferencia, Fredericq (1954, a) había ya observado que distintos factores colicinógenos se transferían con frecuencias diferentes de distintas cepas donantes de E. coli (ver Introducción). Si nos atenemos a las observaciones de Nagel de Zwaig, Antón y Puig (1962), Puig (1963) y a las derivadas del presente estudio en lo referente a la transmisión de los distintos factores a partir de las mismas cepas donantes de E. coli K12, se advierte también que si bien todos se transfieren con similar frecuencia de cepas donantes F+ o Hfr, cada uno de ellos presenta frecuencias de transferencia características. Así,

col E_2 y col I se transmiten con baja frecuencia (1 % y 0,1 %, respectivamente), col B con frecuencia intermedia (10 %) y col E_1 y col V con máxima eficiencia (mayor del 100 %).

Aún cuando no se conocen las causas que determinan el pasaje de material genético de una cepa a otra, se puede pensar en varios factores capaces de incidir en la eficiencia de transferencia de determinantes genéticos extracromosómicos, tales como :

- 1) distinto número de partículas por célula; 2) ubicación en la célula que favorezca o no su pasaje durante la conjugación;
- 3) diferente relación con el factor de sexualidad. También podría afectar las frecuencias de transmisión medidas el grado de estabilidad del factor colicinógeno en la cigota o su descendencia. Es muy poco probable que los factores colicinógenos pasen a través del puente de conjugación por fijación temporaria sobre el cromosoma, pues en tal caso las frecuencias de transferencia de los factores colicinógenos de células que transfieren el cromosoma a alta frecuencia (Hfr) serían mayores que las correspondientes a células que lo transfieren a muy baja frecuencia (F+). También es poco probable que estas diferencias en la transferencia puedan atribuirse a distinto tamaño de las partículas, pues los factores col I, col E_1 y col E_2 , para los cuales se determinaron frecuencias de transferencia muy diferentes, no presentan acentuada variación en el tamaño, ya que contendrían, de acuerdo a las estimaciones de Silver y Ozeki (1962): 6×10^4 , 7×10^4 y 3×10^4 pares de nucleótidos, respectivamente.

Factores colicinógenos y plásmidos:

Si bien las evidencias experimentales indican la naturaleza extracromosómica de los factores colicinógenos E_2 , I, V, B y E_1 en E. coli K12 y llevan a incluirlos en la categoría de plásmidos, no puede excluirse la posibilidad que estos factores puedan integrarse o fijarse al cromosoma bajo determinadas condiciones.

En base al comportamiento del factor col I en sistemas HFC y en condiciones normales, en cepas de S. typhimurium, Stocker(1960) propone que este factor puede existir en la célula en dos estados diferentes: en estado autónomo en células recientemente hechas col I, de las cuales se transfiere rápidamente a otras células ; en estado integrado en las células colicinógenas después de varias generaciones, las cuales no transfieren col I. Las evidencias de integración para el factor col I son en este caso indirectas y algunos autores sugieren hipótesis diferentes para explicar el comportamiento del mismo basadas en sistemas de represión o interferencia (Frederic 1963,a ; Clark y Adelberg, 1962).

Debería esperarse que las probabilidades de fijación sobre el cromosoma fuesen mayores para aquellos factores colicinógenos que manifiestan efectos sobre la fertilidad, ya que podrían presentar en su genomio regiones homólogas al factor F, para el cual se conoce estado integrado. En concordancia con esta presunción, Fredericq (1963,c) ha informado recientemente la obtención de una cepa Hfr de E. coli K12 en la cual el factor col B se encuentra integrado al extremo distal del cromosoma como resultado de una

estrecha asociación con el factor F.

Factores colicinógenos y otros elementos celulares:

El estudio genético de partículas celulares diferentes de los determinantes cromosómicos clásicos, tales como los fagos atemperados, los factores de fertilidad, los factores colicinógenos y los factores de resistencia múltiple a las drogas ha permitido revelar la existencia de notables semejanzas en algunos aspectos de su comportamiento.

En lo referente a factores colicinógenos y fagos, muchos autores han destacado las analogías existentes entre factores colicinógenos y fagos atemperado por un lado, especialmente en lo referente a inmunidad e inducción (Jacob y Wollman, 1961; Fredericq, 1956,b) y entre colicinas y fagos virulentos (Fredericq, 1953,b; Jacob y Wollman, 1961), por otro, en cuanto a su campo de acción, llegando a postular estrechas relaciones filogenéticas entre estos tipos de partículas .

Nos hemos ocupado precedentemente de las relaciones existentes entre algunos factores colicinógenos y factores de fertilidad. Relaciones un tanto similares se manifiestan también con los factores de resistencia múltiple a las drogas (factores R).

Así, los factores R al igual que los factores colicinógenos se comportan como partículas autónomas que se transfieren en la conjugación independientemente del cromosoma. Sólo recientemente se informó (Watanabe, 1963,b) sobre evidencias de fijación al cromosoma.

soma (los trabajos originales han aparecido en japonés).

Se ha observado también que a semejanza de los factores col B y col V-col I, los factores R interaccionan con la fertilidad cromosómica en células Hfr y F+ de E. coli K12 (Watanabe y Fukasawa, 1962) y pueden transmitirse de cepas F- a F-.

Sugino e Hirota (1962) observaron que los factores R confieren fertilidad cromosómica a cepas F- de E. coli K12. Por transducción con fago P₁kc lograron establecer que el factor determinante de la fertilidad no puede ser separado del responsable de la transmisibilidad, pero sí en cambio, de los locus de resistencia a las drogas. Estos resultados sugieren una notable semejanza entre los factores R y los factores F'. Sin embargo, a diferencia de los factores F conocidos y de los factores col V-col I, la presencia de los factores R en la célula bacteriana no determina sensibilidad a fagos del tipo MS2. Más aún, cuando se introducen factores R en células F+ o Hfr, éstas se vuelven resistentes a fagos de este tipo (Iijima, 1962; Egawa e Hirota, 1962).

Según las observaciones de Iijima (1962) los factores R actuarían al igual que el factor F como "promotores" (ver Clark y Adelberg, 1962) de la transferencia de col E₁ en cepas F-. Del mismo modo, también el factor col I actuaría como promotor de la transferencia de otros factores colicinógenos, no sólo en S. typhimurium (Ozeki et al. 1962), sino también entre géneros diferentes de enterobacterias (Hamon, 1956; Silver y Ozeki, 1962). Es probable que también el factor col B cumpla un rol similar en S. ty-

phimurium (Ozeki et al., 1962) y en E. coli (Puig, 1963).

Por otra parte, el estudio de las partículas celulares ha permitido establecer no sólo semejanzas entre distintos tipos de partículas autónomas (plásmidos o episomas), sino también interesantes interrelaciones entre partículas episómicas y factores cromosómicos merced a las cuales un factor cromosómico puede pasar a episómico y viceversa (Jacob y Wollman, 1961). De este modo van surgiendo indicios de homologías genéticas entre partículas que aparecían originalmente como muy diferentes. En este aspecto, y dentro de los factores colicinógenos, factores tales como col B, col V- col I y col I que presentan características similares y tal vez homologías con factores de fertilidad para los cuales se conoce estado integrado y recombinación con factores cromosómicos, podrían constituir un material de estudio promisorio.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.H. 1959. "Bacteriophages". Interscience Publishers, New York.
- Alfoldi, L. , Jacob, F. y Wollman E. L. 1957. Zygoze létale dans des croisements entre souches colicinogènes et non colicinogènes d'E. coli. C.R.Acad.Sci. Paris, 244, 2974.
- Alfoldi, L.; Jacob, F. , Wollman E. L. y Mazé, R. 1958. Sur le déterminisme génétique de la colicinogénie. C.R. Acad.Sci. Paris. 246, 3531.
- Appleyard , R.K. 1954. Segregation of λ lysogenicity during bacterial recombination in E. coli K12. Genetics. 39, 429.
- Arber, W. 1960. Transduction of chromosomal genes and episomes in E. coli. Virology, 11, 273.
- Barry, G.T., Everhart, D.L. y Graham, M. 1963. Colicine A. Nature. 198, 211.
- Ben-Gurion R., 1963. On the nature of the "lethal zygote" produced by crossing non-colicinogenic with colicinogenic bacteria. J. Gen. Microbiol. 30, 173.
- Cavalli-Sforza, L.L., Lederberg, J. y Lederberg, E.M. 1953. An infective factor controlling sex compatibility in Bacterium coli. J. Gen. Microbiol. 8, 89.
- Clark, A.J. y Adelberg, E.A. 1962. Bacterial conjugation. Ann. Rev. Microbiol. 16, 289.

- Clowes, R.C., 1963. Colicin factors and episomes. Genet. Res., Camb. 4, 162.
- Davis, B.D. y Mirioli, E.S. 1950. Mutants of E. coli requiring methionine or vitamin B-12. J. Bacteriol. 60, 17.
- Davis, J.E., Strauss, J.H. y Sinsheimer R. L., 1961. Bactériophage MS2 : another RNA phage. Science. 134, 1427.
- de Haan, P.G. y Gross J.D. 1962. Transfer delay and chromosomal withdrawal during conjugation in E. coli. Genet. Res., Camb. 2, 251.
- de Haan, P.G. y Stouthamer, A.H. 1962. F-prime transfer and multiplication of sexduced cells. Genet. Res. Camb. 4, 125
- Egawa, R. e Hirota Y. 1962. Inhibition of fertility by multiple drug-resistance factor (R) in E. coli K12. Jap. Jour. Genet. 37, 66.
- Fisher, K.W. 1962. Conjugal transfer of immunity phage λ multiplication in E. coli K12. J. Gen. Microbiol. 28, 711.
- Fredericq, P. 1953 a. Recombinants issus du croisement de souches lysogènes et colicinogènes. C.R. Soc. Biol. 147, 1113.
- Fredericq, P. 1953 b. Colicines et bactériophages. Ann. Inst. Pasteur 84, 294.
- Fredericq, P. 1954 a. Transduction génétique des propriétés colicinogènes chez E. coli y Sh. sonnei. C.R. Soc. Biol., 148, 399.

- Fredericq, P. 1954 b. Intervention du facteur de polarité sexuelle F dans la transduction des propriétés colicinogènes chez E. coli. C.R.Soc.Biol. 148, 746.
- Fredericq, P. 1956 a. Recherches sur la fréquence de souches transductrices des propriétés colicinogènes. C.R.Soc.Biol. 150, 1036.
- Fredericq, P. 1956 b. Résistance et immunité aux colicines. C. R. Soc.Biol. 150, 1514.
- Fredericq, P. 1957. Colicines. Ann.Rev.of Microbiol. 11, 7.
- Fredericq, P. 1958 a. Transduction of colicinogenicity. Bacterial genetics. Carnegie Institution of Washington. p. 396.
- Fredericq, P. 1959. Transduction par bacteriophage des propriétés colicinogènes chez Salmonella typhimurium. C.R. Soc.Biol. 2, 357.
- Fredericq, P. 1963 a. On the nature of colicinogenic factors: A review. J. Theoret. Biol. 4, 159.
- Fredericq, P. 1963 b. Linkage of colicinogenic factors with F agents and with the chromosome in E. coli. Microb. Genet. Bull. N° 19, 9.
- Fredericq, P. 1963 c. Linkage of colicinogenic factors with an F agent and nutritional markers in the chromosome and in an episome of E. coli. Abstracts. 11th. Int. Cong. Genetics 4.19. p. 42.

- Fredericq, P. y Betz-Bareau, M. 1953 a. Transfert génétique de la propriété colicinogène chez E. coli. C. R. Soc. Biol. 147, 1110 .
- Fredericq, P. y Betz-Bareau, M. 1953 b. Transfert génétique de la propriété de produire un antibiotique. 147, 1653.
- Fredericq, P. y Betz-Bareau, M. 1953 c. Transfert génétique de la propriété colicinogène en rapport avec la polarité F des parents. 147, 2043.
- Fredericq, P y Betz-Bareau, M. 1956. Influence de diverses propriétés colicinogènes sur la fertilité d'E. coli. 150, 615.
- Furness, G. y Rowley, D. 1957. The presence of the transmissible agent F in non-recombining strains of E. coli . J. gen. Microbiol. 17, 550.
- Goebel, W. F. y Barry, G.T. 1958. Colicine K.II. The preparation and properties of a substance having colicine K activity. J. Exptl. Med. 107, 185.
- Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. C. R. Soc. Biol. 93, 1040.
- Hamon, Y. 1956. Etude générale du transfert des propriétés colicinogènes. C.R.Acad.Sc. 242, 2064.
- Hayes, W. 1953. The mechanism of genetic recombination in E. coli. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol . 18, 75 .

- Hayes, W. 1957. The kinetics of the mating process in E. coli.
J. gen. Microbiol. 16 ; 97 .
- Hirota, Y. 1960. The effect of acridine dyes on mating type
factors in E. coli. Proc. Natl. Acad.Sc. 46, 57.
- Hutton, J. J. y Goebel, W.F. 1961. Colicine V. Proc. Natl. Acad.
Sc. 47, 1498.
- Iijima, T. 1962. Transfer of a colicinogenic factor with multiple
resistance factor in E. coli K12. Jap. Journ.
Genet. 37, 187.
- Ivánovics. G. 1962. Bacteriocins and bacteriocin-like substances.
Bact. Rev. 26, 1.
- Jacob, F., Scaeffler, P. y Wollman, E.L. 1960. Episomic elements
in bacteria. 10th Symp. Soc. Gen. Microbiol.
London. p.82.
- Jacob. F. y Wollman, E.L. 1957. Analyse des groupes de liaison
génétique de différentes souches donatrices. C.
R. Acad. Sc. Paris. 245, 1840.
- Jacob, F. y Wollman, E.L. 1958. Sur les processus de conjugaison
et de recombinaison chez E. coli. Ann.Inst.
Pasteur. 95, 497.
- Jacob, F. y Wollman, E.L. 1959. Colicins and other bacteriocins
in Bacteriophages by M.H. Adams. Interscience
Publishers. New York. p. 381.
- Jacob, F. y Wollman, E.L. 1961. Sexuality and the genetics of
bacteria. Ac. Press. New York.

- Lavallé, R. y Jacob, F. 1961. Sur la sensibilité des épisomes sexuel et colicinogène d'E. coli K12 à la désintégration du radiophosphore. C.R.Acad.Sci.Paris. 252, 1678.
- Lederberg, J. 1952. Cell genetics and hereditary symbiosis .
Physiol. Revs. 32, 403.
- Lederberg, J. 1958. Extranuclear transmission of the F compatibility factor in E. coli. Abstr. Commun. 7th. Intern. Congr. Microbiol. Stockholm. p. 59.
- Lederberg, J., Cavalli, L.L. y Lederberg, E.M. 1952. Sex compatibility in E. coli. Genetics. 37, 720.
- Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P₁. Virology. 1, 190.
- Nagel de Zwaig, R., Antón, D. y Puig, J. 1962. The genetic control of colicinogenic factors E₂, I and V .
J. Gen. Microbiol. 29, 473.
- Nüske, R., Hösel, G., Venner, H. y Zinner, H. 1957. Über ein colicin aus E. coli. SG **710**. Biochem, Z. 329, 346.
- Ozeki, H., Howarth, S. y Clowes, R.C. 1961. Colicine factors as fertility factors in bacteria. Nature. 190, 986.
- Ozeki, H. y Stocker, B.A.D. 1958. Heredity. 12, 525.
- Ozeki, H., Stocker, B.A.D. y De Mangerie, H. Production of colicine by single bacteria. Nature. 184, 337 .
- Ozeki, H., Stocker, B.A.D. y Smith, S. 1962. Transmission of colicinogeny between strains of Salmonella typhimurium grown together. J. gen. Microbiol. 28, 671.

- Puig, J. 1963. Tesis Universidad de Buenos Aires.
- Rude, E. y Goebel, W.F. 1962. Colicine K. V. The somatic antigen of a non colicinogenic variant of E. coli K235. J. Exptl. Med. 116, 73.
- Scaife, J. y Gross, J.D. 1962. Inhibition of multiplication of an F-lac factor in Hfr cells of E. coli K12. Bioch. Bioph. Res. Comm. 7, 403.
- Silver, S. y Ozeki, H. 1962. Transfer of DNA accompanying the transmission of colicinogenic properties by cell mating. Nature. 195, 873.
- Stocker, B.A.D. 1960. Microorganism in genetics. 10th. Symp. Soc. Gen. Microbiol. London. p. 1.
- Stocker, B.A.D., Smith, S.M. y Ozeki, H. 1963. High infectivity of S. typhimurium newly infected by the col I factor. J. gen. Microbiol. 30, 201.
- Sugino, Y. y Hirota, Y. 1962. Conjugal fertility associated with resistance factor R in E. coli. J. Bacteriol. 84, 902.
- Tatum, E.L. y Lederberg, J. 1947. Gene recombination in the Bacterium E. coli. J. Bacteriol. 13, 673.
- Taylor, A.L. y Adelberg, E.A. 1960. Linkage analysis with very high frequency males of E. coli. Genetics. 45, 1233.
- Watanabe, T. y Fukasawa, T. 1962. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IV. Interactions between resistance transfer factors and F- factors in E. coli K12. J. Bacteriol. 83, 727.

- Watanabe, T. 1963a. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. VI. High frequency resistance transfer system in E. coli. J. Bacteriol. 85; 788.
- Watanabe, T. 1963 b. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27, 1.
- Wollman, E.L. 1953. Sur le déterminisme génétique de la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur. 84, 231.
- Wollman, E.L., Jacob, F. y Hayes, W. 1956. Conjugation and genetic recombination in Escherichia coli K12. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 21, 141.



S. L. Rassi