

Tesis de Posgrado

Estudio genético de la resistencia a las colicinas E2, K, 8, V, I y B en *Escherichia coli* K12

Antón, Dora N.

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Antón, Dora N.. (1963). Estudio genético de la resistencia a las colicinas E2, K, 8, V, I y B en *Escherichia coli* K12. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1185_Anton.pdf

Cita tipo Chicago:

Antón, Dora N.. "Estudio genético de la resistencia a las colicinas E2, K, 8, V, I y B 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_1185_Anton.pdf

FCENBA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio genético de la resistencia
a las colicinas E₂, K, 8, V, I y B en Escherichia coli K12

Dora N. Antón

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas

1963

tesis 1155

Este trabajo fué dirigido por el Profesor Juan I. Valencia, y se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.-

Se agradece sinceramente al Profesor Juan I. Valencia el continuo interés puesto en este trabajo y el constante apoyo con que facilitó todas sus etapas.-

Se agradece, además, a la Dra. R. Nagel de Zwaig sus útiles sugerencias acerca del manuscrito, y también, al igual que al Dr. J. Puig, las provechosas discusiones mantenidas sobre el tema.-

Indice

	pág.
I.- Introducción	
a) Bacteriocinas y colicinas	1
b) Naturaleza química de las colicinas	2
c) Producción de colicinas	3
d) Control genético de la síntesis	4
e) Mecanismo de acción	6
f) Resistencia e inmunidad	7
g) Relación entre colicinas y bacteriófagos	9
h) Propósito de este trabajo	10
II.- Materiales y métodos	
a) Medios de cultivo	11
b) Cepas de bacterias y fagos	11
c) Aislamiento de mutantes resistentes	15
d) Cruzamientos	16
e) Análisis genético de los recombinantes	16
III.- Resultados	
A- Características de las mutantes resistentes aisladas	18
B- Localización genética de algunas de las muta- ciones obtenidas	22
a) Resistencia a E_2 , E_1 y fago BF-23	23
b) Resistencia a K, E_2 y E_1	28
c) Resistencia a K	31
d) Resistencia a la colicina 8 y al fago T6	32
e) Resistencia a la colicina I	36
f) Resistencia a la colicina V	37

	pág.
g) Resistencia a las colicinas V e I	39
h) Resistencia a las colicinas V,I,B y 8	41
i) Relación entre los tres loci de resistencia a la colicina V	44
j) Resistencia a la colicina B	45
k) Resistencia a B (menor sensibilidad a I y 8)	48
IV.- Discusión y conclusiones	51
a) Características de las mutantes y su locali- zación genética	51
b) Resistencia a colicinas, resistencia a fagos y relación entre ambas	59
V.- Literatura citada	62

RESUMEN

Se estudió en este trabajo, la resistencia a las colicinas E₂, K, 8, I, V y B. Para ello, se aislaron mutantes resistentes, aparecidas espontáneamente en cultivos de cepas Hfr y F⁻ de E. coli K12.-

De cada una de esas mutantes se estudió la resistencia a colicinas no empleadas en la selección y a los fagos T5, T6 y BF-23, que tienen resistencia cruzada con algunas de ellas.-

Por cruzamientos entre cepas resistentes y sensibles se ubicaron varias de esas mutaciones en el cromosoma de E. coli K12.-

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- 1º) Son muy frecuentes las mutantes, de un solo paso, resistentes a más de una colicina.-
- 2º) Existen varios fenotipos distintos de resistencia a una colicina; se diferencian entre sí, por las otras colicinas o fagos a los que también resisten.-
- 3º) En las cepas aquí estudiadas, a cada uno de esos fenotipos corresponde un genotipo distinto, pues las mutaciones correspondientes mapean en loci ubicados en diferentes puntos del cromosoma.-
- 4º) Algunas de las mutantes, entre las cuales hay mutaciones de punto y deficiencias, presentan alteraciones en su crecimiento, y varias se comportan anormalmente en recombinación; aparentemente porque su integración está dificultada.-
- 5º) Se ha confirmado la existencia de resistencia cruzada entre el fago BF-23 y las colicinas del grupo E; pero se ha observado que la presentan las mutantes que mapean entre los marcadores Metionina y Arginina, en tanto que

otras cepas también resistentes a las colicinas E, que mapean en otra región, retienen su sensibilidad al fago.

- 6°) No se han aislado mutantes simultáneamente resistentes a la colicina K y al fago T6, que según la literatura tienen resistencia cruzada; pero sí se ha observado esa relación entre dicho fago y la colicina 8. Como en el caso anterior, esa característica sólo aparece en mutantes de un determinado locus (el ubicado entre Lactosa y Galactosa), pues resistentes a la colicina que mapean en otra zona, no la presentan.-
- 7°) Los tipos de resistencia que se han observado, indican que los receptores sobre los cuales se adsorben las colicinas estudiadas en este trabajo, son específicos para cada una de ellas, y que no hay receptores comunes entre ellas y los fagos con los que pueden tener resistencia cruzada.-

I- INTRODUCCION

a.- BACTERIOCINAS Y COLICINAS

La propiedad de producir antibióticos se presenta con mucha frecuencia en los microorganismos. Con el nombre de bacteriocinas Jacob, Lwoff, Siminovitch y Wollman (1953) han agrupado a los antibióticos de naturaleza proteica cuya síntesis es letal para la bacteria productora. Estas sustancias son activas sólo sobre especies estrechamente relacionadas con aquellas que las producen y requieren para actuar la presencia de receptores específicos.-

Muchas son las bacteriocinas conocidas, así se ha observado la producción de piocinas por cepas de Pseudomonas pyocyanea (Jacob, 1954), de megacinas por Bacillus megaterium (Ivánovics y Alföldi, 1954), pesticinas por Pasteurella pestis (Ben-Gurion y Hertman, 1958). Entre las enterobacterias se han identificado ocho grupos distintos de bacteriocinas (Hamon y Péron, 1963), de ellos el mejor conocido es el de las colicinas.-

Las colicinas son sustancias antibióticas producidas por cepas de Escherichia, Shigella y Salmonella. Forman un grupo de alrededor de veinte sustancias distintas, la primera de las cuales fué descubierta por Gratia en 1925.-

Las colicinas, cada una de las cuales ha sido denominada con una letra, se diferencian entre sí ya sea por su espectro de actividad, la especificidad de las mutantes resistentes, su resistencia al calor o la morfología de las zonas de inhibición que producen.-

Una cepa puede producir más de una colicina, y la misma colicina puede ser producida por cepas pertenecientes a distintos géneros sin cambio en sus propiedades químicas ni antigénicas (Barry, Everhart y Graham, 1963).-

Todas ellas dan las reacciones generales de polipéptidos y su acción letal es destruida en mayor o menor grado por los agentes desnaturalizantes de proteínas.-

b.- Naturaleza química de las colicinas.-

Desde hace varios años Goebel y colaboradores intentan aclarar la naturaleza química de las colicinas. El aislamiento y purificación de la colicina K, demostró que es una sustancia extremadamente compleja, compuesta por polisacáridos, lípidos y proteínas. Se comporta como un poderoso antígeno y salvo por su fuerte actividad bactericida no se diferencia del antígeno somático O propio de la cepa (Goebel y Barry, 1958).-

La imposibilidad de separar, por repetidas cromatografías, la actividad colicínica del antígeno O, ha llevado a Goebel a postular que aquella es una propiedad inherente del antígeno O de la bacteria productora (Goebel, 1962).-

El hallazgo de una mutante que no producía colicina K, permitió a Rude y Goebel (1962) comparar las propiedades del antígeno O de la bacteria no colicinógena con las de la colicina de la correspondiente productora. En los dos casos, los lipocarbohidratos son muy similares químicamente, pero el contenido en proteína de la colicina es significativamente mayor que el del antígeno O. Y aunque no es posible diferenciar a ambos por pruebas antigénicas de difusión en agar, únicamente el antisuero obtenido con la colicina es capaz de neutralizar la actividad letal de ésta.-

Estos hechos confirman la suposición de los autores de que la actividad bactericida de la colicina K no reside en el lipocarbohidrato sino en el componente proteico del antígeno O de la bacteria productora.-

También los estudios de Hutton y Goebel (1961) con la colici-

na V indican que ésta es un lipocarbohidrato-proteína, con propiedades tóxicas tanto para bacterias como para mamíferos. Demostraron además que no existe ninguna relación antigénica entre la colicina K y la V.

A conclusiones similares llegaron Niske, Hösel, Venner y Zimmer, (1957) en cuanto a la naturaleza de la colicina producida por la cepa Escherichia coli SG710 y Barry, Everhart y Graham (1963) trabajando con la colicina A.-

A diferencia de las colicinas, la megacina producida por la cepa de B. megaterium 216 es una proteína simple (Holland, 1961). Este hecho, que establece una diferencia fundamental entre bacteriocinas correspondientes a dos tipos distintos, puede reflejar diferencias también fundamentales en su síntesis, liberación o mecanismo de acción.-

c.- Producción de colicinas.-

Muchos factores ambientales y fisiológicos influyen la producción de colicinas. La composición del medio es de suma importancia en este aspecto, y es bien conocido que la producción en medios sintéticos es muy inferior a la que se obtiene en medios complejos.-

También la naturaleza de la fuente hidrocarbonada, el pH del medio, el tiempo de generación, etc., modifican fuertemente la síntesis de estos antibióticos. (Matsushita, Fox y Goebel, 1960).-

Pero a pesar de manifestarse como un carácter estable de la cepa, la producción de colicina no es una función normal ni habitual de la bacteria colicinógena.-

Ozeki, Stocker y Margerie, (1959) demostraron que aunque todas las bacterias de una cepa colicinógena pueden producir el antibiótico, dicha síntesis se realiza solamente en una pequeña parte

de la población.-

No se conoce qué determina la producción por esas bacterias, pero se sabe que con ciertas colicinas, llamadas inducibles, es posible lograr que la casi totalidad sintetice el antibiótico. Para ello basta con irradiarlas con luz ultravioleta o tratarlas con agentes mutagénicos tales como alquilantes, peróxidos, etc. (Jacob Siminovitch y Wollman, 1952).-

En estas condiciones se produce un aumento progresivo de la colicina en el medio, hasta superar en forma notable los valores normales, y el cultivo, sin lisarse, detiene su crecimiento (Frederick, 1954).-

A la célula, dicha síntesis, tanto si es espontánea como si ha sido inducida, le ocasiona la muerte. Así, la colicinogenia se manifiesta como un carácter potencial cuya realización es letal para la bacteria.-

d.- Control genético de la síntesis.-

La producción de colicina es un carácter estable de la cepa, al igual que las características de la colicina producida. En subcultivos sucesivos ambas características se mantienen inalterables aunque en algunas ocasiones ha sido posible aislar, a partir de cepas colicinógenas, bacterias que han perdido la capacidad productora.-

El caso inverso, es decir la adquisición de la propiedad, no se ha observado nunca en forma espontánea y sólo se logra a través de un proceso de conjugación, o transducción, en el cual la cepa donante posea ya esa propiedad.-

Estas características hicieron suponer la existencia de factores específicos dotados de continuidad genética, y provistos de la información necesaria para la síntesis de la colicina. A estos

factores se los denominó factores colicinógenos.-

Recientemente Silver y Ozeki (1962) empleando un ingenioso método de marcación con ^{14}C y lisis con fago T6, demostraron que la transferencia de la propiedad de producir las colicinas E_1 , E_2 e I de S. typhimurium a E. coli, va asociada a la transferencia de ADN, y determinaron para cada una de esas colicinas el tamaño del trozo de ADN transferido.-

El estudio del estado de estos factores en las bacterias productoras, fué emprendido por Fredericq y Betz-Bareau (1953) empleando el factor colicinógeno E_1 (col E_1).-

Realizando cruzamientos $F + \text{col } E_1 + \times F - \text{col } E_1 -$ observaron alta transferencia del carácter col $E_1 +$ a los recombinantes. En el cruzamiento recíproco, sin embargo, ningún recombinante recibía el carácter col $E_1 -$ de la $F +$.-

De esta asimetría entre ambos cruzamientos y de la falta de ligamiento con marcadores cromosómicos los autores dedujeron que el factor col E_1 está en estado extracromosómico en las bacterias $F +$ y $F -$.-

A estas mismas conclusiones llegaron Zwaig, Antón y Puig (1962), con respecto a los factores E_2 , I y V, pero ampliándolas a cepas Hfr de distintos tipos. El factor colicinógeno B, estudiado por Puig (1963), muestra características semejantes en cuanto a su estado en células de E. coli.-

La condición extracromosómica de los factores colicinógenos en células de cualquier tipo sexual fué extendido al factor E_1 en cepas Hfr. Este factor fué clasificado por Alföldi, Jacob, Wollman y Mazé (1958) en la categoría de episoma, basándose en resultados por ellos obtenidos, que indicaban localización cromosómica en cepas Hfr, y citoplásmica en $F+$ y $F-$. Estos resultados no fueron confirmados por estudios posteriores de otros autores (Zwaig,

1963) (Clowes, 1963) quienes demostraron que se comporta en forma similar a los anteriores tanto en cepas F+, F- o Hfr.-

Parece, pues, indudable que habitualmente los factores genéticos que controlan la síntesis de las distintas colicinas no son episomas sino plásmidos.-

e.- Mecanismo de acción.-

Hace varios años, Jacob, Siminovitch y Wollman (1952) demostraron que la colicina ML provoca la detención de la síntesis de ADN, ARN y proteína de la bacteria sensible. Este efecto parece ser común a todas las colicinas, pues Nomura (1963) lo observó también con las colicinas K, E₂ y E₃, y recientemente Reynolds y Reeves (1963) encontraron que la colicina F inhibe la síntesis de β -galactosidasa cuando ésta se induce en presencia de la colicina.

Esta acción de las colicinas está condicionada por la presencia en las células sensibles, de receptores específicos a los cuales se adsorben. La adsorción no es en sí misma letal, pues los efectos de la colicina adsorbida pueden evitarse haciendo actuar tripsina sobre la bacteria tratada (Nomura y Nakamura, 1962).-

El tiempo durante el cual la tripsina ejerce esta acción, varía con la colicina y con el estado del cultivo. En bacterias cuya actividad metabólica ha sido inhibida, dicho lapso, que es en general de unos pocos minutos, se prolonga hasta dos horas después de la adsorción (Reynolds y Reeves, 1963).-

Algunas colicinas ejercen una acción particularmente drástica, la colicina E₂, por ejemplo, no sólo inhibe la síntesis de ADN, sino que provoca su destrucción (Nomura, 1963) y causa en cepas sensibles lisógenas la inducción del profago (Endo, Kamiya y Ishizawa, 1963).-

Interfieren también, en algunos casos, con los fagos virulentes

tos. Jacob, Siminovitch y Wollman (1952) observaron que la reproducción de éstos es inhibida por la colicina ML, durante los siete minutos que siguen a la infección. Similares observaciones hizo Fredericq (1953) con respecto a bacterias infectadas con T2, T6 y BF-23 y tratadas con colicina K.-

Nomura (1963) ha demostrado, sin embargo, que los fagos T4 y T5 son capaces de multiplicarse en células inhibidas con colicina E₂, y esta colicina no es tampoco capaz de impedir el desarrollo de T2 o T6 en bacterias ya infectadas (Fredericq, 1953).-

Hay entonces, entre las diversas colicinas, claras diferencias de comportamiento a pesar de que todas ellas parecen compartir una acción primaria fundamental.-

f.- Resistencia e inmunidad.-

Los extractos de bacterias resistentes a una colicina no son capaces de neutralizarla (Bordet y Beumer, 1948), pues la adquisición de resistencia va ligada a la pérdida de los receptores sobre los cuales se adsorbe.-

Estos receptores son específicos para cada colicina, y su presencia está controlada genéticamente. Las bacterias resistentes que aparecen en cepas sensibles corresponden a mutaciones ocurridas espontáneamente (Fredericq, 1948) y, en general, resisten sólo a la colicina empleada para seleccionarlas.-

Este hecho tiene excepciones. Así se ha observado la existencia de resistencia cruzada entre algunas colicinas, en tal forma que la mutante aislada como resistente a una de ellas es simultáneamente resistente a otras. En algunos casos esto se presenta con frecuencia, por ejemplo entre las colicinas B, I y V (Fredericq y Gratia, 1960).-

En otros, las resistentes a una colicina son siempre resistentes

tes a la acción de otras. Este hecho se ha atribuido a la existencia de receptores comunes a todas ellas (Fredericq, 1957) y se ha empleado para realizar una clasificación primaria de las colicinas. En esta forma se han reunido en grupos todas aquellas colicinas que parecen compartir receptores, aunque en esta forma quedan agrupadas sustancias fácilmente diferenciables por otras de sus características.-

No sólo entre colicinas hay resistencia cruzada, sino también entre éstas y bacteriófagos. Por ejemplo, todas las mutantes resistentes a las colicinas del grupo E (E_1 , E_2 , E_3) son simultáneamente resistentes al fago BF-23 y viceversa (Fredericq, 1949 a). Un caso semejante entre la colicina K y el fago T6 ha sido publicado por Fredericq (1949 b) y este mismo autor ha observado la existencia, en algunos casos, de resistencia cruzada entre la colicina B y los fagos T1 y T5 (Fredericq y Gratia, 1960).-

La resistencia y la sensibilidad a una determinada colicina son caracteres alélicos y en cruzamientos entre cepas de E. coli K-12 se comportan como marcadores clásicos en cuanto a transferencia y ligamiento a marcadores conocidos.-

Mapeos preliminares realizados para ubicarlos sobre el cromosoma de E. coli han indicado que el locus de resistencia a las colicinas del grupo E se encuentra cercano al gene que controla la síntesis de B_1 (Jenkin y Rowley, 1955). Recientemente Fredericq y Gratia (1960) estudiando la resistencia a la colicina B, identificaron tres loci distintos ubicados en diferentes zonas del cromosoma.-

Existe otro tipo de resistencia, llamado inmunidad, que es el que presentan las bacterias sensibles cuando reciben el poder de producir colicina. Estas bacterias no son afectadas por la colicina que pueden sintetizar, aunque retienen todavía los receptores y

son por lo tanto capaces de adsorberla. Son, sin embargo, sensibles a cualquier otra colicina distinta, aun a las que pertenecen a su mismo grupo de resistencia (Fredericq, 1957), siendo esto de utilidad para diferenciarlas.-

En cruzamientos, inmunidad y resistencia se comportan como marcadores no alélicos, ya que la inmunidad, conferida como es por la presencia del factor colicinógeno correspondiente, se manifiesta al igual que éste como extracromosómica.-

g.- Relación entre colicinas y bacteriófagos.-

Las semejanzas existentes en la adsorción y en las modificaciones producidas en la bacteria sensible por fagos y colicinas, señalan un real parecido entre ambos.-

Este parecido se hace más pronunciado cuando se considera no ya al fago en sí sino su cubierta proteica, pues los fagos virulentos inactivados con luz ultravioleta se adsorben sobre bacterias sensibles, inhiben su síntesis de ADN y ARN y las matan sin lisis de la célula ni producción de fago (Cohen y Arbogast, 1950).-

Los fagos atemperados, en estado de profago, confieren a la bacteria, al igual que los factores colicinógenos, la propiedad potencial de una síntesis cuya realización es letal para la célula. Ambos le dan, además la inmunidad que la protege del agente cuya producción controlan.-

Así como existen profagos inducibles, existen factores colicinógenos inducibles y los agentes inductores son los mismos en los dos casos.-

Estas analogías han llevado a postular para bacteriófagos y factores colicinógenos un origen común o un parentesco evolutivo y se ha considerado la resistencia cruzada existente entre determinados fagos y colicinas como indicio de una relación filogénica entre

ellos (Fredericq, 1957, 1963).-

h.- Propósito de este trabajo.-

El propósito del presente trabajo fué estudiar:

- 1°) La resistencia a algunas colicinas.-
- 2°) Las relaciones de resistencia cruzada que ocurren entre ellas.-
- 3°) La extensión de la resistencia cruzada existente entre esas colicinas y algunos bacteriófagos.-
- 4°) La localización genética de las mutantes obtenidas.-

Se eligieron las colicinas B, I, V, E₂ y K para realizarlo, y se agregó luego la colicina producida por una cepa del grupo Alcalescens Dispar, por las relaciones que mostró con algunas de las anteriores.-

II- MATERIALES Y METODOS

a.- Medios de cultivo.-

Los medios empleados fueron caldo (Difco) y agar nutritivo (Difco). Este último se empleó también para determinar los títulos de los cultivos y para las pruebas de resistencia a colicinas.-

Como medio mínimo sintético se usó el de Davis y Mingioli (1950) con una concentración de glucosa de 5 gr. por litro. Para la selección de recombinantes se le adicionaron los aminoácidos necesarios, en una concentración final de 80 $\mu\text{g/ml}$, excepto el triptofano que se usó a 40 $\mu\text{g/ml}$ y la vitamina B₁ a 5 $\mu\text{g/ml}$. La estreptomicina se utilizó a 150 $\mu\text{g/ml}$.-

Las pruebas de fermentación de azúcares se realizaron en cajas con Endo agar (Difco) para lactosa, y para los otros azúcares se empleó ese mismo medio básico reemplazando la lactosa por el azúcar en cuestión.-

Para las siembras en caja se empleó agar blando (caldo o medio mínimo sintético con 7 gr/l de agar).-

b.- Cepas de bacterias y fagos.-

En los cruzamientos se emplearon las cepas Hfr y F- de E. coli K-12 que aparecen en la table 1. A partir de ellas se aislaron las mutantes resistentes estudiadas. Los órdenes de transferencia de las Hfr, que pertenecen a distintos tipos, se indican en la figura 1.-

Se emplearon varias cepas productoras de colicina, cuyas propiedades y procedencia figuran en la tabla 2. Para cada colicina se empleó siempre la misma productora.-

TABLA I
Cepas de bacterias y fagos

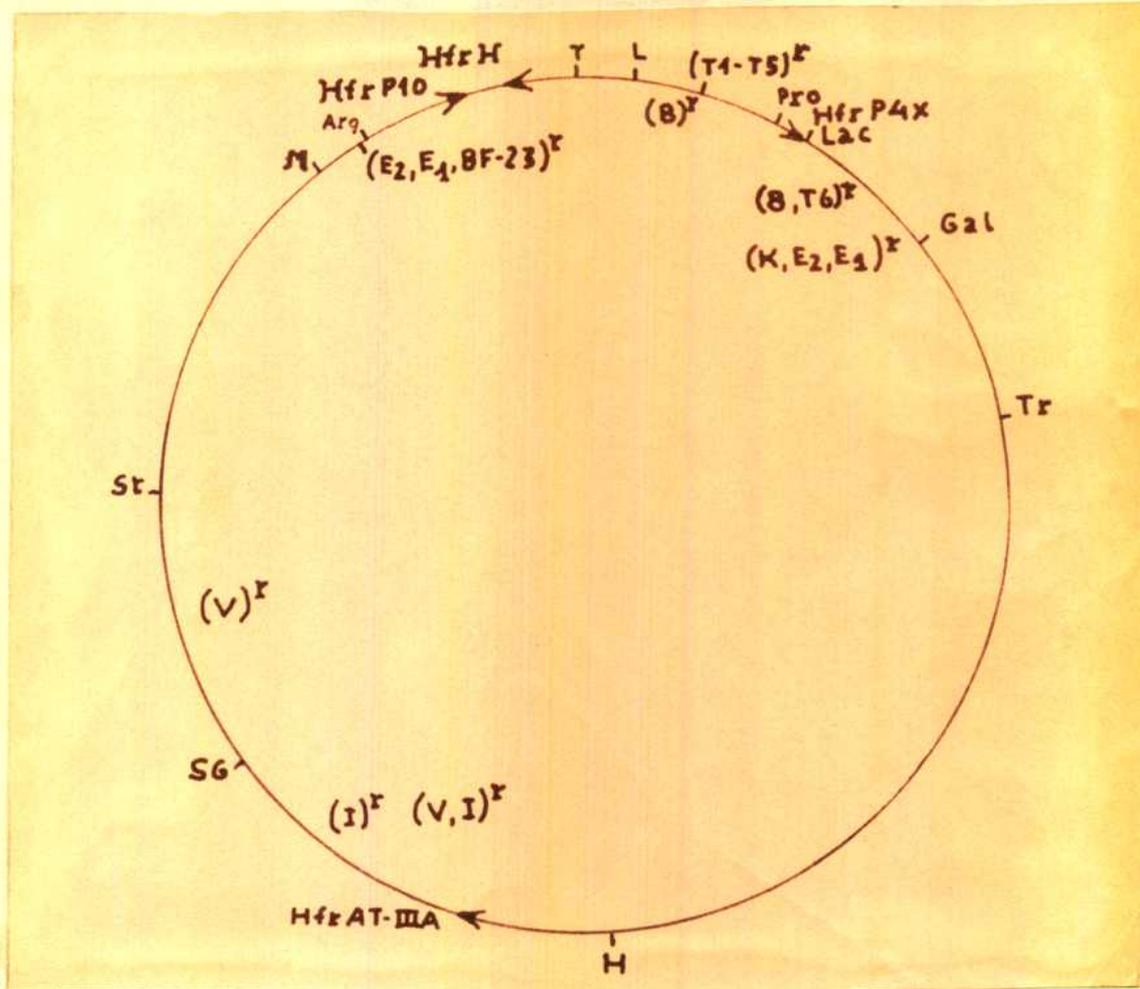
Denominación	Tipo sexual	Características											Respuesta a				
		T	L	B ₁	Pro	Tr	H	SG	M	Arg	Lac	Gal	St	T5	T6	BF-23	
<u>E. coli</u> K 12																	
Hfr H	Hfr	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s	s	s
Hfr P10	Hfr	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	r	s	s
Hfr P4x	Hfr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s	s	s
Hfr AT IIIA	Hfr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s	s	s
PA 309	F-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	r	s
PA 360	F-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	r	r	s
PA 303	F-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	s	s
<u>Fagos</u>																	
T5 y T6: Recibidos de la Lic Helga Lorek (Max Plank Institut für Biochimie, Munich)																	
BF-23 : Recibido del Dr. P. Fredericq (Universidad de Lieja, Lieja)																	

Abreviaturas empleadas: T: treonina, L: leucina, B₁: vitamina B₁, Pro: prolina, Tr: triptofano, H: histidina, SG: serina o glicocola, M: metionina
Arg: arginina, C: cisteína, Lac: lactosa, Gal: galactosa, St: estreptomina, -: incapacidad de sintetizar o fermentar, +: capacidad de sintetizar o fermentar, r: resistencia, s: sensibilidad.-

Todas las cepas de bacterias fueron enviadas por el Dr. E.L. Wollpan (Inst.Pasteur, Paris)
Estas cepas son sensibles a todas las colicinas empleadas, las T5^s son menos sensibles a la colicina B que las T5^s .-

FIGURA 1

Mapa genético de Escherichia coli K12



Los símbolos que aparecen en el exterior del círculo representan a los marcadores conocidos empleados en los cruzamientos, las flechas indican el origen y sentido de transferencia de las Hfr utilizadas en ellos (Tabla 1) (Jacob y Wollman, 1961).-

En la parte interna del círculo se ha representado a aquellos loci de resistencia a colicinas para los cuales se obtuvo, por lo menos, una localización aproximada.-

(El significado de las abreviaturas empleadas aparece en la Tabla 1).-

TABLA 2

Cepas de bacterias productoras de colicina

Denominación	Características	Colicina producida	Remitidas por
<u>E. coli</u>			
12-98	M-, St ^r	B	Dr. Balbinder (1)
CA-52	Prototrofica, St ^s	I	Dr. Fredericq
12-94	M-, St ^r	V + I	Dr. Balbinder (1)
58-161 colE ₁ +	M-, St ^s	E ₁	Dr. Wollman
112JW colE ₂ +	C-, H-, St ^s	E ₂	(2)
112 colK+	C-, H-, St ^r	K	Dr. Wollman (1)
<u>Shigella</u> ADO3-8	Prototrófica, St ^s (3)	8 (4)	Dr. Monteverde

El significado de las abreviaturas figura en la tabla 1.-

(1) Estas cepas pertenecían al Dr. Fredericq.-

(2) Ver Zwaig et al. (1962).-

(3) A pesar de ser prototrófica, su crecimiento es inhibido por cisteína o histidina, y en medio mínimo con cualquiera de esos dos aminoácidos crece recién a las 48 horas.-

(4) Además de la colicina 8 produce otra de halo muy pequeño, que parece ser la E₁ .-

c.- Aislamiento de mutantes resistentes.-

A partir de las cepas detalladas en la tabla 1 se aislaron mutantes resistentes a las distintas colicinas, para ello se emplearon dos métodos:

1º) La cepa productora de colicina se sembró en estrias sobre cajas de agar nutritivo, se incubó durante 48 horas, se mataron las bacterias con vapores de cloroformo y se cubrió la caja con una capa de la cepa que se quería obtener resistente, en agar blando. A las 48 horas de incubación se picaron las colonias resistentes aparecidas en el halo (Fredericq, 1957.).-

2º) La cepa productora se sembró en toda la caja, por medio de una capa de agar blando. Se incubó 48 horas, se mató con cloroformo, se retiró la capa de agar blando con una varilla estéril, y tras esterilizar nuevamente con cloroformo se sembró la cepa sensible igual que en el método anterior. Las colonias resistentes comienzan a aparecer a las 48 horas.-

Para asegurar el origen independiente de las mutantes, se usó para cada caja un cultivo distinto de la cepa sensible, iniciado con un pequeño número de células, y se picó sólo una resistente de cada caja.-

Las colonias aisladas por cualquiera de los dos métodos, se purificaron por aislamientos sucesivos, se comprobaron sus requerimientos nutritivos y, en los casos necesarios, su calidad de Hfr. Se controló, además, su resistencia a la colicina empleada para aislarla y a todas las otras empleadas en el trabajo, al igual que a los fagos HF-23, T5 y T6.-

Para probar la resistencia a esos fagos se colocaron gotas de lisados de alto título sobre cajas de agar nutritivo, se dejaron secar y se las cubrió cuidadosamente con la cepa a probar en agar blando. Las cepas sensibles dan un círculo completamente claro

rodeado de crecimiento normal, en tanto que las resistentes crecen uniformemente. Este método es más sensible que el de las estrías cruzadas.-

d.- Cruzamientos.-

Las cepas utilizadas en los cruzamientos se hicieron crecer con aereación hasta llegar a un título aproximado de 2×10^8 bacterias por ml. Se mezclaron, en erlenmeyers de 125 ml, en proporción 1 Hfr a 20 F-, en un volumen total de 4 ml. Se incubaron a 37° en baño maría. A los 120 minutos se tomaron muestras que, tras ser diluidas convenientemente, se sembraron en cajas con el medio mínimo necesario para la selección del recombinante buscado.

Los cruzamientos con interrupción se realizaron por el método de Wollman y Jacob (1955), en algunos casos se empleó con buenos resultados el de Nomura et al. (1962).-

La frecuencia de recombinación para cada recombinante es el porcentaje de Hfr en la mezcla que dan recombinantes de ese tipo.-

e.- Análisis genético de los recombinantes.-

Los recombinantes seleccionados en los cruzamientos se purificaron por pasaje al mismo medio empleado en la selección. Sus características nutritivas se probaron por réplica (Lederberg y Lederberg, 1952) en los medios convenientes.-

Se intentó probar también su resistencia a las colicinas por réplica. Para ello se ensayaron varios procedimientos, tales como cajas con agar más sobrenadantes de cepas productoras de colicinas en distintas concentraciones, cajas con colicinas, similares a las descritas en el aislamiento de resistentes; en ningún caso se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo cual fué necesario probar individualmente cada uno de los recombinantes resuspendiéndolo-

los, después de purificados, en agar blando y vertiendo éste sobre una colonia (muerta) productora de la colicina.-

La resistencia de los recombinantes, a los fagos empleados, se probó por réplica sobre cajas de agar nutritivo, cubiertas con una suspensión de fago de alto título.-

III - RESULTADOS

A.- Características de las mutantes resistentes aisladas.-

Se aislaron mutantes resistentes a las distintas colicinas, de cepas Hfr de distintos tipos y F-. Todas estas mutantes, de origen espontáneo e independiente, se estudiaron en cuanto a su resistencia a las colicinas no empleadas en su selección y a fagos que presentan resistencia cruzada con algunas de ellas.-

Como con mucha frecuencia se presenta resistencia cruzada, las mutantes se designaron siguiendo el criterio empleado por Demerec y Fano (1945), en sus estudios de resistencia a fagos. Es decir que una cepa aislada por su resistencia a la colicina V y simultáneamente resistente a I figura como --/V,I. Y una cepa aislada por su resistencia a I que resulta resistente también a V es denominada --/I,V.

a.- Selección con colicina E₂.

Se aislaron 74 colonias resistentes a partir de distintas Hfr y F-. Todas ellas, además de ser resistentes a la colicina E₂, resisten a la E₁ y al fago BF-23. No se obtuvo ninguna colonia de otro tipo. Todas crecen normalmente, las que provienen de Hfr se comportan tan eficientemente como las originales y son muy estables con respecto a sus características de resistencia.

b.- Selección con colicina K.-

Tanto en los halos como en las cajas con colicina, las mutantes resistentes a esta colicina aparecen en muy pequeño número. Se obtuvieron 50 colonias, separables en tres tipos:

27 colonias resistentes a K

14 colonias resistentes a K y E_2 (en 9 no se probó resistencia a E_1)

9 colonias resistentes a K, E_2 y E_1

Todas estas colonias son sensibles a T6 y BF-23.-

Las cepas K^R son normales en crecimiento y eficiencia como Hfr. Las $(K, E_2)^R$ y $(K, E_2, E_1)^R$, por el contrario, crecen muy mal y deben ser reaisladas con frecuencia pues después de algunos repiques son sobrepasadas por bacterias sensibles que crecen normalmente. Las Hfr de estos tipos se comportan, además, como malas donantes, aunque las F- correspondientes son buenas receptoras.-

c.- Selección con colicina 8.-

Entre las cepas productoras de colicina con que se cuenta en este laboratorio, hay una gentilmente proporcionada por el Dr. J. J. Monteverde, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria. Esta cepa, perteneciente al grupo *Alcalescens-Dispar* (ADO3), lleva el número 8 de nuestra colección. A pesar de no habersela incluido primitivamente entre las cepas a estudiar, se la empleó sistemáticamente en las pruebas de las mutantes resistentes aisladas, para comparación.-

Se observó así que produce una colicina que en agar nutritivo da un halo muy neto y claro, sin mutantes casi, de 1 a 1,5 cm. de diámetro tras 24 horas de incubación. Aunque no se la ha identificado, es distinta a las que se estudian aquí: B, I, V, E_1 , E_2 y K.

A esta colicina se la denominó provisoriamente 8, y se la incluyó en este trabajo porque se observó que la mayoría de las mutantes resistentes a ella, lo son simultáneamente al fago T6.-

Se aislaron 25 cepas resistentes, de las cuales:

23 son resistentes a la colicina 8 y al fago T6

2 son resistentes a las colicinas 8 y E_1 , y sensibles a la colicina E_2 y a los fagos T6 y BF-23.-

Las 23 cepas $(8, T6)^R$ dan con la productora un halo muy pequeño que como se indicó en la tabla 2, se atribuye a que la cepa produce otra colicina. Esa colicina podría ser la E_1 , pues las cepas $(8, E_1)^R$ no lo presentan.-

La resistencia cruzada entre 8 y T6, se observa también en las colonias aisladas por su resistencia a T6. De 10 cepas de éstas, aisladas por la Dra. Nagel de Zwaig, todas son resistentes a 8.-

Ambos tipos de resistentes son estables y de crecimiento normal.-

d.- Selección con colicina V.-

En el curso de este trabajo se observó que la cepa empleada como productora de colicina V, producía un pequeño halo sobre algunas de las mutantes aisladas como resistentes a V. Se advirtió luego que las cepas que se comportaban así eran sensibles a la colicina I, en tanto que aquellas que además de resistir a V, resistían a I, no lo presentaban.-

Esto sugería que la cepa colicinógena era productora de ambas colicinas, quedando la I enmascarada por el halo mucho mayor de la V. ri

Para comprobarlo se aprovechó el hecho de que la colicina I es termosensible, siendo, a diferencia de la V, destruida por media hora de calentamiento a 60°.-

Se sometieron a este tratamiento cajas sembradas con la productora e incubadas 48 horas, y se observó que en estas condiciones el halo pequeño desaparecía y ambas indicadoras se mostraban completamente resistentes. Sometida la cepa a la acción de la luz ultra-

violeta, también era el comportamiento de dicho halo semejante al debido a la colicina I, pues como el de ésta, que es inducible, aumentaba mucho de tamaño.-

Es evidente, por lo tanto, que la cepa E. coli 12-94 produce además de la colicina V, una colicina cuyas características son tan semejantes a las de I, que puede identificársela con ésta.-

Se obtuvieron con facilidad 81 colonias resistentes, pues las mutantes aparecen con frecuencia.-

De ellas, 44 son resistentes sólo a V, 34 resisten simultáneamente a V e I y 3 lo hacen a V, I y B.-

En varias de estas cepas no se probó la resistencia a 8, y las que se probaron eran sensibles, pero de las tres resistentes a V, I y B, la que se conservó para su estudio genético resultó ser, cuando se probó, resistente también a 8 y al fago T1. Ninguna de las mutantes presentaba relación con los otros fagos probados.-

Todas crecían y se comportaban normalmente, excepto las (V,I,B)^r que aunque crecían con bastante dificultad, eran muy buenas Hfr y extremadamente estables en sus características de resistencia.-

e.- Selección con colicina I.-

Se aislaron 17 cepas resistentes, 14 de las cuales son resistentes a I y V, y las otras 3 lo son únicamente a I, pero producen con V un halo menor y de bordes poco netos.-

Las características de todas son completamente normales.-

f.- Selección con la colicina B.-

Las resistentes a la colicina B aparecen con relativa frecuencia; se han aislado 68 que corresponden por lo menos a tres tipos diferentes:

33 resisten sólo a B

28 resisten a B y parcialmente a I y 8

7 resisten a B,I y V (No se probaron con 8)

No se advirtió relación con ninguno de los fagos probados, pero es necesario destacar que la mayor parte de las colonias fueron aisladas de cepas que eran resistentes a T5 (Tabla 1).-

B.- Localización genética de algunas de las mutaciones obtenidas.-

De las mutantes descritas en el punto anterior se seleccionaron algunas correspondientes a los distintos tipos, para intentar su localización genética.-

Como la localización de un marcador se ve enormemente facilitada cuando puede seleccionárselo directamente, se trató de hacerlo con estos. Se tomó en cuenta el hecho de que son caracteres que se manifiestan como recesivos (Gratia, 1963), razón por la cual no puede hacerse actuar la colicina hasta no completarse la segregación.-

Se probó la eficiencia selectiva de sobrenadantes de las cepas colicinógenas, irradiadas o no, mezclados, en variadas concentraciones con agar. Sin embargo, no se obtuvo una buena selección pues en la mayoría de los casos se observó un marcado crecimiento residual de la cepa sensible. Esto impidió el empleo del método en forma general y sólo se empleó en algunos casos para confirmar localizaciones ya realizadas.-

Por lo tanto, se recurrió a cruzamientos entre Hfr resistentes y F- sensibles o el recíproco. Se seleccionaron por separado todos los recombinantes posibles y se estudió en ellos el ligamiento de marcadores no seleccionados, inclusive el de resistencia. En muchos casos esto permite una localización preliminar del mar-

cador, que puede ser mejorada utilizando cepas Hfr que transfieran la región en que está situado, en los primeros minutos de la conjugación. (Jacob y Wollman, 1961).-

Disponiendo de la Hfr apropiada, se trató de determinar el momento de entrada del locus de resistencia, refiriéndolo al de un marcador seleccionable, de entrada previa y cercana a la del estudiado.-

Cuando no se contó con cepas convenientes, se realizaron "cruzamientos de tres puntos", seleccionando un recombinante correspondiente a un marcador de la Hfr transferido después de la mutación de resistencia. Evitadas así las distorsiones debidas al gradiente de transferencia, se estudiaron en estos recombinantes las combinaciones producidas entre la mutación y otros dos marcadores cercanos a ella y estrechamente ligados entre sí. La clase minoritaria, correspondiente a los dobles cross-over, permite determinar el orden relativo de los tres genes considerados (Alföldi, Stent y Clowes, 1962).-

Con los mismos datos puede estimarse en valores numéricos las distancias entre ellos, pero debido a la existencia de alta interferencia negativa (Cavalli-Sforza y Jinks, 1956), estos valores carecen de precisión y deben tomarse sólo como aproximaciones.-

Siempre que se trabajó con cepas que presentaban resistencia simultánea a más de una colicina o a colicinas y fagos, la resistencia de los recombinantes se probó a todos ellos, para detectar posibles segregaciones y descartar, además, la posibilidad de que la mutante no sea de un solo paso.-

a.- Resistencia a E_2, E_1 y fago BF-23.-

Contando con cepas Hfr y F- resistentes, se realizaron varios cruzamientos, seleccionando recombinantes y estudiando en ellos la

aparición de los otros marcadores de la Hfr, no empleados en la selección, incluido el de resistencia.-

Los resultados figuran en la tabla 3.-

La evidente proximidad entre Arg y $(E_2, E_1, BF-23)^F$, indicada por el cruzamiento en el que se empleó la HfrP4x, es confirmada por las otras dos Hfr utilizadas que, a pesar de tener órdenes de transferencia muy distintos, tienen origen en la zona entre TL y Arg. Con la Hfr H, el marcador de resistencia aparece ligado al último marcador, y con la Hfr P10, con el primero. Luego el locus se encuentra a la izquierda del punto de origen de la Hfr H, sin que pueda precisarse a que lado de Arg.-

El cruzamiento recíproco, realizado entre la Hfr P10 sensible y la F- PA 309/ $E_2, E_1, BF-23$, es absolutamente simétrico, mostrando un ligamiento de $(E_2, E_1, BF-23)^S$ a Arg⁺ del 100 %. También por selección directa del marcador de resistencia, se obtiene igual ligamiento entre ellos.-

Para mejorar la localización de la mutación, se realizaron cruzamientos entre la Hfr P10 resistente por F- sensible, interrumpiendo mecánicamente la conjugación a distintos tiempos y seleccionando los recombinantes Arg⁺T⁺L⁺. En estos recombinantes se siguió la aparición del marcador de resistencia con respecto al tiempo. La entrada de Arg⁺ se produce a los 9 minutos. Se probaron 100 colonias de cada uno de los siguientes tiempos: 9, 11, 13 y 15 minutos, en todos ellos aparece el marcador de resistencia en un porcentaje que varía entre 94 y 100. Con los recombinantes Arg⁺St^F, a los 10, 11 y 15 minutos, ocurre lo mismo.-

En cruzamientos semejantes a los anteriores, con la HfrP4x resistente, y selección, tras la interrupción, de los recombinantes T⁺L⁺St^F pudo constatararse que la aparición de resistencia en ellos, va siempre unida a la de Arg⁺.-

TABLA 3

Porcentaje de marcadores no seleccionados en los recombinantes de cruzamientos entre varias Hfr resistentes a E₂, E₁ y BF-23 y F⁻ sensibles.-

Marcador no seleccionado	Hfr P4x/E ₂ , E ₁ , BF-23			HfrH/E ₂ , E ₁ BF-23		HfrP10/ E ₂ , E ₁ BF-23
	T ⁺ L ⁺ St ⁺	Arg ⁺ St ⁺	H ⁺ St ⁺	Tr ⁺ St ⁺	T ⁺ L ⁺ St ⁺	
T ⁺ L ⁺	--	40	30	50	--	70
Arg ⁺	17,5	--	35	45	0	--
(E ₂ , E ₁ , BF-23) ⁺	20	92,5	32,5	42,5	0	100
H ⁺	0	25	--	42,5	7,5	32,5
Tr ⁺	0	0	15	--	15	40
Frecuencia de recombinación de los recombinantes seleccionados (%)						
12		2,4	0,07	0,07	36	0,05
						27

Se utilizó la misma F⁻ sensible en los tres cruzamientos: PA309. Los órdenes de transferencia de las cepas Hfr se dan en la figura 1. Se analizaron 50 colonias de cada recombinante.-

Es decir que no se advierte una separación entre ambos marcadores producida por la interrupción y si bien no puede descartarse que el locus de resistencia esté situado antes que el de Arg, es indudable que está muy próximo a él.-

Como el marcador M^- de la cepa Hfr4x está estrechamente ligado a Arg, se cruzó esta cepa, resistente, con la F- PA309 y se seleccionaron 312 recombinantes $H^+ S^R$. En ellos se estudió la distribución de los alelos no seleccionados Arg^+ , M^- y $(E_2, E_1, HF-23)^R$ de la Hfr y los correspondientes de la F-, con los resultados que aparecen en la tabla 4.-

TABLA 4

Cruzamiento HfrP4xE₂,E₁,HF-23 por F- PA309

Distribución de los marcadores no seleccionados Arg, (E₂,E₁,HF-23) y M, en los recombinantes H⁺ St^R

Clase	Marcador			Número de colonias	Porcentaje por clase
	Arg	(E ₂ ,E ₁ ,HF-23)	M		
1	+	s	+	2	1,6
	-	r	-	3	
2	+	r	+	34	12,5
	-	s	-	5	
3	+	s	-	-	0,6
	-	r	+	2	
Parentales	+	r	-	72	85,3
	-	s	+	194	

La diferencia en el número de colonias entre ambos recombinantes de una misma clase, se debe probablemente a que uno de ellos necesita fuera de la región considerada, un crossing over más que el otro para ser integrado.-

De estos datos, considerando la clase minoritaria como producto de doble crossing over, el orden de los tres marcadores sería:

Arg (E₂, E₁, BF-23) M

los dos primeros muy cercanos.-

Sin embargo, como el número de recombinantes de los tipos 1 y 3 es muy pequeño, se trató de comprobar ese orden en forma más directa.-

Si en un cruzamiento análogo al anterior, se selecciona Arg⁺M⁺St^R, se están seleccionando recombinantes que han sufrido un crossing over entre Arg y M. Si el marcador de resistencia se encuentra ubicado entre ellos, debe observarse mayor segregación del carácter en este recombinante que en el recombinante Arg⁺M⁻St^R, donde no ha habido crossing over entre ambos. Si, por el contrario, el locus investigado está antes que Arg, no habrá diferencia en el porcentaje de colonias resistentes entre ambos tipos de recombinantes.-

En 165 colonias Arg⁺M⁻St^R se encontraron 3 sensibles (1,8%), en tanto que entre 207 colonias Arg⁺M⁺St^R aparecieron 29 (14%). En la tabla 5 se da la significación estadística de estos datos. (Bancroft, 1960).-

TABLA 5

Significación de la diferencia en el porcentaje de $(E_2, E_1, BF-23)^S$ entre los recombinantes $Arg^+ M^+ St^r$ y $Arg^+ M^- St^r$

Recombinante	$(E_2, E_1, BF-23)^S$	$(E_2, E_1, BF-23)^r$	Total	$(E_2, E_1, BF-23)^S$ %
$Arg^+ M^- St^r$	3	162	165	1,82
$Arg^+ M^+ St^r$	29	178	207	14,01
Totales	32	340	372	Promedio 7,9 8,6

Desviación relativa: $\frac{0,14 - 0,018}{\sqrt{\frac{0,079 \times 0,921}{165} + \frac{0,079 \times 0,921}{207}}} = 4,2$

para esta desviación relativa es P: 0,00006, luego la diferencia es altamente significativa.-

Esto da para los tres marcadores un orden y unas distancias relativas de:

$$Arg \text{ --- } 14\% \text{ --- } (E_2, E_1, BF-23) \text{ --- } 86\% \text{ --- } M$$

En ninguno de los recombinantes probados se observó segregación en el comportamiento frente a E_2, E_1 , y BF-23 .-

b.- Resistencia a K, E_2 y E_1 .-

Como las mutantes de este tipo, obtenidas a partir de cepas Hfr, se comportaban como muy malas donantes, se empleó en los cru- zamientos una cepa F-PA309/K, E_2, E_1 . La constitución genética de

los recombinantes obtenidos al cruzarla con la Hfr H sensible figura en la tabla 6.-

TABLA 6

Porcentaje de marcadores no seleccionados en recombinantes del cruzamiento Hfr H x F- PA309/K, E₂, E₁

Marcador no seleccionado	% de marcadores no seleccionados en los recombinantes			
	T ⁺ L ⁺ St ^R	Tr ⁺ St ^R	H+St ^R	Arg ⁺ St ^R
T ⁺ L ⁺	---	78	68	95
Tr ⁺	20	---	68	84
(K, E ₂ , E ₁) ^S	28	90	70	90
H ⁺	5	10	---	33
Arg ⁺	0	0	0	---
Frecuencia de recombinación de los recomb. selec. (%)				
	41	3,8	0,2	0,03

Se analizaron 50 colonias de cada tipo.-

Estos datos indican una relación entre el locus de Tr y el de resistencia. En un cruzamiento posterior se empleó la Hfr AT IIIA sensible, con la misma F- resistente, y se interrumpió la conjugación a varios tiempos, seleccionándose los recombinantes H⁺St^R y Tr⁺St^R.

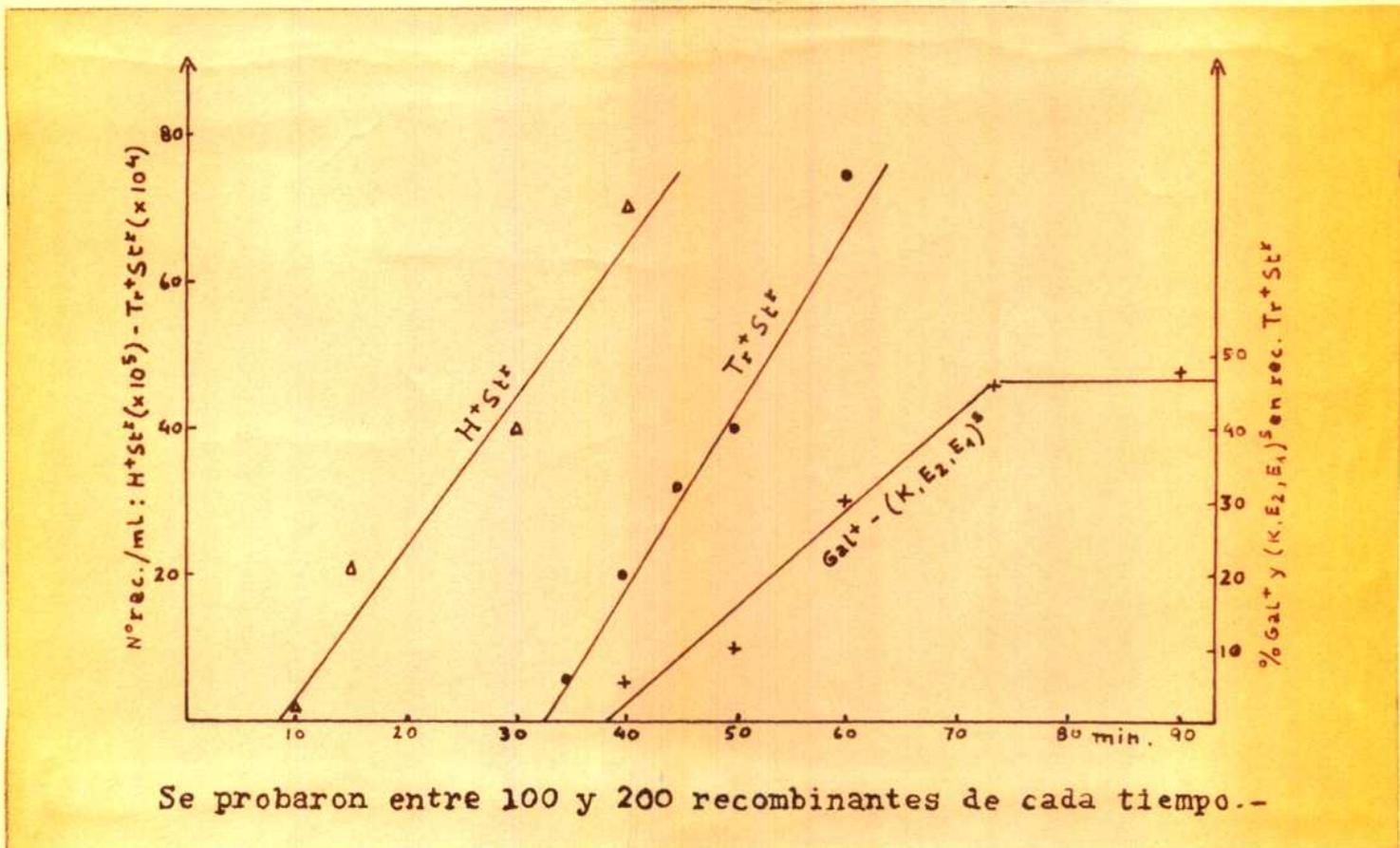
En estos últimos se estudió la aparición de los marcadores Gal⁺, Lac⁺, y (K, E₂, E₁)^S correspondientes a la Hfr. En la figura

2 se ven los resultados de este experimento: H^+ entra a los 9 minutos y Tr^+ a los 33.-

FIGURA 2

Momento de entrada de algunos marcadores, en el cruzamiento

Hfr AT IIIA x PA309/ K, E_2, E_1



En estos recombinantes Tr^+St^R se observó la entrada de Gal^+ a los 38 minutos, que coincide con el de $(K, E_2, E_1)^S$ pues todas las colonias Gal^+ eran sensibles a las tres colicinas.-

Este estrecho ligamiento entre Gal^+ y $(K, E_2, E_1)^S$ se confirmó en cruzamientos entre la Hfr H sensible y la F- resistente en los cuales se probaron 240 recombinantes Gal^+St^R , seleccionados directamente, sin que pudiera observarse segregación entre los dos marcadores.-

c.- Resistencia a K.-

Se cruzó una cepa HfrP4x, resistente únicamente a la colicina K, con diferentes cepas F- sensibles y se seleccionaron los recombinantes que figuran en la tabla 7.-

TABLA 7

Cruzamientos entre HfrP4x/K y las F- PA309 ó PA360 sensibles

Marcador no Seleccionado	% de marcadores no seleccionados en recombinantes de				
	HfrP4x/K x F- PA309				HfrP4x/K x F- PA360
	T ⁺ L ⁺ St ^R	Arg ⁺ St ^R	H ⁺ St ^R	Tr ⁺ St ^R	SG ⁺ St ^R
T ⁺ L ⁺	---	75	55	32,5	39
Arg ⁺	22,5	---	25	22,5	32,5
H ⁺	0	0	---	37,5	32,5
Tr ⁺	0	0	15	---	---
K ^R	0	0	0	2,5	0
Frecuencia de recombinación de los recomb.selec. (%)					
	13	2,6	0,14	0,04	0,06

Se probaron 80 colonias de cada recombinante.-

Se ve también allí el ligamiento de marcadores no seleccionados.-

Es necesario aclarar que como E. coli K-12 tiene un solo cromosoma, la palabra ligamiento no se emplea aquí en el sentido estricto que tiene en otros organismos. Aunque todos los genes

de dicha bacteria pertenecen al mismo grupo de ligamiento, las características de la conjugación sexual, y otros sistemas de recombinación, hacen que se emplee con el sentido de proximidad. Así, se dice que dos genes están estrechamente ligados cuando están muy próximos y se dice que no presentan ligamiento cuando se hallan muy distantes.-

En este caso (Tabla 7) la falta de ligamiento del marcador de resistencia con cualquiera de los seleccionados, podría indicar una localización cercana al locus que controla la resistencia a St, pues en esos recombinantes la región de St siempre proviene de la F-.-

Para investigarlo se seleccionaron 312 recombinantes SG^+M^+ provenientes de un cruzamiento HfrP4x/K por F- PA 360. De ellos 152 eran St^S (48,7%) y de estos 39 eran K^R (26%). Entre las 160 colonias St^R restantes sólo 2 eran K^R (1,3%).-

Muchas de las colonias $St^S K^S$ producían halo turbio con la colicina K, pues contenían bacterias $St^S K^R$, en cantidad no explicable por mutación.-

Parece pues qué, a pesar del bajo ligamiento absoluto existente entre St^S y K^R , hay una cierta proximidad entre ambos.-

d.- Resistencia a la colicina 8 y al fago T6.-

Se trabajó con una cepa Hfr H/8,T6, que se cruzó con la F-PA 309 sensible. En la tabla 8 aparece el análisis genético de los recombinantes .-

TABLA 8

Cruzamiento Hfr H/8,T6 por F- PA309

Marcador no seleccionado	% de marcadores no seleccionados en los recombinantes		
	$T^+L^+St^R$	Tr^+St^R	H^+St^R
T^+L^+	---	58	62
$(8,T6)^R$	6	56	32
Tr^+	2	---	41
H^+	2	12	---
Arg^+	2	4	13
Frecuencia de recombinación de los recombinantes selec.			
	50	1,7	0,37

Se analizaron 50 recombinantes de cada tipo.-

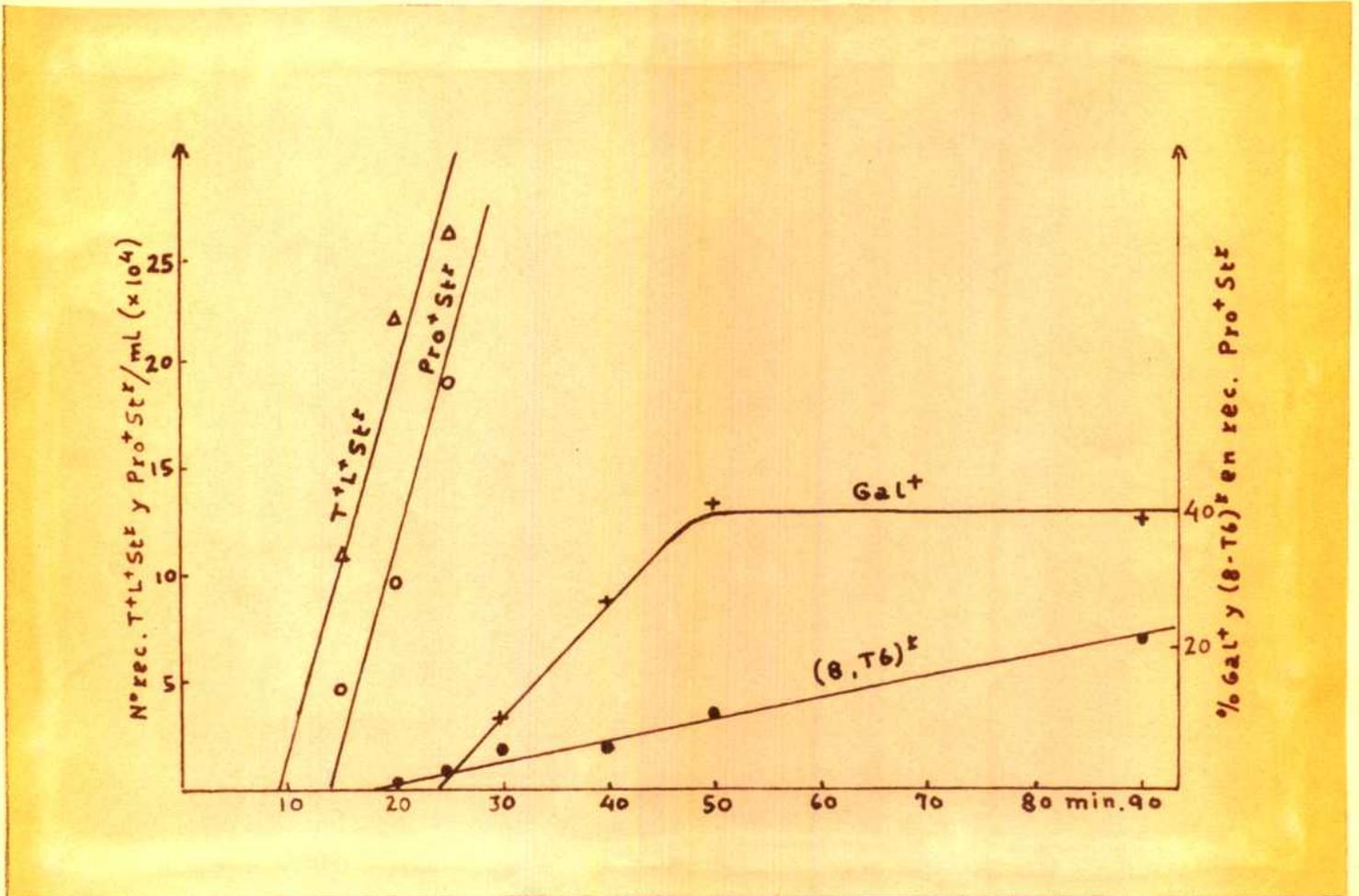
Estos datos dan como ubicación probable la zona entre T L y Tr pero muestran, al mismo tiempo, varias anomalías. La frecuencia de recombinación de Tr^+St^R es desusadamente baja con respecto a la de $T^+L^+St^R$, y en estos últimos recombinantes, el marcador no seleccionado Tr^+ aparece también con valores menores que los normales.-

Se realizó un cruzamiento entre la misma Hfr anterior y la F- PA 303. Se interrumpió la conjugación en momentos determinados y se seleccionaron, en estas muestras, los recombinantes $T^+L^+St^R$ y Pro^+St^R . En estos últimos se estudió la aparición de los marcadores no seleccionados $(8,T6)^R$ y Gal^+ (Figura 3).-

FIGURA 3

Momento de entrada de algunos marcadores, en el cruzamiento

Hfr H/8,T6 x PA 303



Como puede verse en dicha figura entre los 9 y 10 minutos comienzan a aparecer los recombinantes T⁺L⁺St^R y a los 14 minutos los Pro⁺St^R. Entre estos, las primeras colonias (8,T6)^R aparecen a los 18 minutos y las Gal⁺ a los 24 minutos. A pesar de ser transferido más tarde, este marcador aumenta mucho más rápidamente que (8,T6)^R y a los 60 minutos aparece en un porcentaje mayor que el otro, como si hubiera una mala integración del marcador de resistencia.-

Como la cepa F- empleada en el cruzamiento anterior es Lac⁺ no pudo estudiarse su relación con el locus de (8,T6), que debería estar muy próximo a él.-

Para hacerlo, se realizó un cruzamiento entre la Hfr H resistente y la F- PA309, se seleccionaron 312 recombinantes Tr⁺ St^r y se estudió en ellos la distribución de los marcadores no seleccionados Lac, (8,T6) y Gal (Tabla 9).-

TABLA 9

Cruzamiento Hfr H/8,T6 por F- PA 309

Distribución de los marcadores no seleccionados Lac, (8,T6) y Gal en los recombinantes Tr⁺St^r

Clase	Marcador			Número de colonias	Porcentaje por clase
	Lac	(8,T6)	Gal		
1	+	s	-	3	8,7
	-	r	+	24	
2	+	r	-	23	17,3
	-	s	+	31	
3	+	o	+	5	4,3
	-	r	-	9	
Parentales	+	r	+	139	69,7
	-	s	-	78	

Sobre la diferencia en el número de colonias entre ambos recombinantes de la misma clase, ver la nota de la tabla 4.-

Como se ve en la tabla 9, donde aparecen los resultados de ese experimento, la clase minoritaria determina a:

Lac -----(8,F6)-----Gal

como orden relativo de los tres marcadores.-

e.- Resistencia a la colicina I.-

La ubicación del gene que da resistencia únicamente a la colicina I, se estudió cruzando una cepa Hfr H/I con una F- PA309, con los resultados que figuran en la tabla 10.-

Debido a la transferencia ordenada de marcadores que caracteriza a las cepas Hfr, y al coeficiente de integración constante de los marcadores transferidos, un carácter cuya entrada es anterior a la de otro, se encuentra en recombinantes de este último en una proporción cercana al 50%, cualquiera sea la distancia que los separe.-

TABLA 10

Cruzamiento Hfr H/I por F- PA309 ó PA360

Marcador no Seleccionado	% de marcadores no seleccionados en recombinantes de					
	Hfr H/I x PA309				HfrH/1 x PA360	
	T ⁺ L ⁺ St ^R	Tr ⁺ St ^R	H ⁺ St ^R	Arg ⁺ St ^R	SG ⁺ St ^R	
T ⁺ L ⁺	---	78	73	63	65	
Tr ⁺	33	---	68	65	42	
H ⁺	8	23	---	27,5	33	
I ^R	5	13	55	35	38	
Arg ⁺	0	0	0	---	0	
Frecuencia de recombinación de los recon.seleccionados						
	44	12	2,8	0,07	0,8	

Se probaron 80 colonias de cada tipo.-

Por lo tanto, el 55% de ligamiento encontrado (Tabla 10) entre H^+St^R y I^R puede significar simplemente que la resistencia es transferida antes que el locus de H en la Hfr empleada, Pero sí, por el contrario, aquel se encuentra ubicado después de H, ese resultado indica que ambos están próximos.-

Para decidir entre ambas posibilidades, se obtuvo un recombinante $F^- T^- L^- H^- SG^- Arg^+ I^R St^R$, de un cruzamiento entre la Hfr H/I y la F- PA360. Este recombinante se cruzó con la Hfr AT IIIA sensible y se seleccionaron los recombinantes H^+St^R (proximal) y SG^+St^R (distal) en esa Hfr. (Figura 1).-

Ninguno de los recombinantes H^+St^R recibió la I^S de la cepa Hfr, y de los recombinantes SG^+St^R sólo la recibió el 15%. -

El marcador de resistencia a I está situado, entonces, a la izquierda de H, entre el origen de la Hfr AT IIIA y el locus de SG.-

f.- Resistencia a la colicina V.-

Se emplearon dos cepas, Hfr H y Hfr P10, correspondientes a órdenes de transferencia (Figura 1) muy distintos, pero ambas resistentes únicamente a la colicina V. En la tabla 11 aparecen los resultados de su cruzamiento con dos F- sensibles.-

Se advierte en ella que: con la Hfr H, cuyo orden de transferencia es $TL---Tr---H---SG---Arg$, únicamente el marcador SG muestra neto ligamiento con la resistencia a V. En cambio, con la Hfr P10, de orden $Arg---SG---H---Tr$, el marcador de resistencia aparece con altos valores no sólo en SG^+St^R , sino también en H^+St^R y Tr^+St^R , lo cual indica que en esa Hfr el locus V es transferido antes que ellos.-

Además, el ligamiento de 95% entre SG^+ y V^R , observado con esta cepa y el de 63% entre los mismos marcadores, cuando se usa

TABLA 11

Porcentaje de marcadores no seleccionados en recombinantes de cruzamientos entre Hfr resistentes a V por E- sensibles

Marcador no seleccionado	HfrH/V				Hfr P10/V			
	x PA 309		xPA360		x PA 309		x PA 360	
	T ⁺ L ⁺ Tr ⁺ St ^r H ⁺ St ^r Arg ⁺ St ^r	Tr ⁺ St ^r H ⁺ St ^r Arg ⁺ St ^r	SG ⁺ St ^r	xPA360	Arg ⁺ L ⁺ H ⁺ T ⁺ L ⁺ Tr ⁺ T ⁺ L ⁺	H ⁺ St ^r SG ⁺ St ^r	H ⁺ St ^r SG ⁺ St ^r	H ⁺ St ^r SG ⁺ St ^r
T ⁺ L ⁺	---	87	75	60	58	---	---	---
Tr ⁺	33	---	63	30	---	18	25	---
H ⁺	3	18	---	23	41	25	---	33
Arg ⁺	0	0	0	---	0	---	73	47
SG ⁺	---	---	---	---	---	---	---	---
V ^r	0	3	5	5	63	29	65	43
St ^s	---	---	---	---	---	10	33	---

Se probaron entre 50 y 100 colonias de cada recombinante.-

la otra Hfr de sentido contrario, demuestra que ambos están muy ligados y señala como ubicación más probable del locus de V la región entre SG y St.-

g.- Resistencia a las colicinas V e I.-

Los cruzamientos realizados, en los cuales se emplearon varias Hfr de órdenes distintos, dieron los resultados que aparecen en la tabla 12.-

Se observa allí, que tanto con la Hfr H, que transfiere sus marcadores en el orden TL---Tr---H---SG---Arg, como con la Hfr P10, que lo hace Arg---SG---H---Tr, el marcador de resistencia (V,I) aparece en un porcentaje mayor del 50% en los recombinantes H^+St^r .-

Es, además, evidente que cuando el marcador SG es transferido después de H (con la Hfr H), el porcentaje de resistencia en aquel (64%) es mayor que en éste (50%), y a la inversa cuando se transfiere antes (con la Hfr P10, 35% y 77% respectivamente).-

Estos datos indican para el locus (V,I) una ubicación entre SG e H. Para confirmarlo se realizaron cruzamientos con tres cepas Hfr AT IIIA/V,I, pues esa Hfr tiene su origen en esa zona. (Tabla 13).-

En esta cepa el ligamiento entre H^+ y $(V,I)^r$ se ha roto, y sólo se advierte aparición del marcador de resistencia, cuando se selecciona el carácter SG^+ que es distal en esa Hfr. Es evidente entonces, que el locus (V,I) se encuentra entre SG y el final del cromosoma de la Hfr AT IIIA, y probablemente muy próximo a éste, dado el bajo porcentaje con que aparece en los recombinantes SG^+St^r .-

TABLA 12

Porcentaje de marcadores no seleccionados en recombinantes de cruzamientos entre Hfr resistentes a V e I y F⁻ sensibles

Marcador no seleccionado	HfrH/V,I			Hfr P10/V,I		
	x F-PA 309		xPA360	x PA 309		x PA 360
	T ⁺ L ⁺ St ^r Tr ⁺ St ^r H ⁺ St ^r Arg ⁺ St ^r	Tr ⁺ St ^r H ⁺ St ^r Arg ⁺ St ^r	SG ⁺ St ^r	Arg ⁺ T ⁺ L ⁺ H ⁺ T ⁺ L ⁺ Tr ⁺ T ⁺ L ⁺	SG ⁺ St ^r H ⁺ St ^r	
T ⁺ L ⁺	--	75	52	--	--	--
Tr ⁺	33	--	--	20	33	--
H ⁺	18	25	48	28	--	30
Arg ⁺	0	0	0	--	80	52
SG ⁺	--	--	--	--	--	47
St ^s	--	--	--	25	8	--
(V,I) ^r	13	15	64	21	75	35
		50		62		77

Se probaron entre 50 y 80 colonias de cada recombinante

TABLA 13

Cruzamientos Hfr AT IIIA/V,I por F- sensible

Marcador no seleccionado	% de marcadores no seleccionados en recombinantes de				
	x F- PA309				x F- PA360
	H ⁺ St ^r	Tr ⁺ St ^r	T ⁺ L ⁺ St ^r	Arg ⁺ St ^r	SG ⁺ St ^r
H ⁺	---	63	53	55	39
Tr ⁺	20	---	63	50	---
T ⁺ L ⁺	0	7	---	33	51
Arg ⁺	0	0	0	---	48
(V,I) ^r	0	0	2	5	17
Frecuencia de recombinación de los recon.seleccionados					
	20	6,4	0,6	0,03	0,05

Los datos son promedios de los obtenidos en cruzamientos con tres Hfr aisladas independientemente. Se analizaron 40 colonias de cada recombinante en cada cruzamiento.-

h.- Resistencia a las colicinas V,I,B, y 8.-

De las pocas cepas de este tipo que se aislaron, todas correspondientes a la Hfr H, se conservó la de mejor comportamiento como donante. Con ella se realizaron dos cruzamientos preliminares, cuyos resultados figuran en la tabla 14.-

TABLA 14

Cruzamientos Hfr H/V,I,B,8 por F- Sensible

Marcador no seleccionado	% de marcadores no selec.en recomb. de HfrH/V,I,B,8				
	x F-PA309				x F- PA360
	T ⁺ L ⁺ St ^r	Tr ⁺ St ^r	H ⁺ St ^r	Arg ⁺ St ^r	SG ⁺ St ^r
T ⁺ L ⁺	---	68	72	50	52
Tr ⁺	8	---	68	25	---
H ⁺	0	15	---	10	38
Arg ⁺	0	0	0	---	0
(V,I,B,8) ^r	0	0	0	0	0
Frecuencia de recombinación de los recomb.seleccionados					
	38	8,3	2,3	0,02	0,4

Se analizaron 100 recombinantes de cada tipo.-

La falta de ligamiento que se observa, podría deberse a proximidad del carácter de resistencia con el locus de St, pues en todos los recombinantes seleccionados esa zona proviene de la F- (St^r), que es sensible a las colicinas.-

Como la Hfr H es prácticamente prototrófica (Tabla 1), no es posible contraseleccionarla con ninguna deficiencia nutritiva; se utilizó su sensibilidad al efecto inhibitorio de la valina (Mantten y Rowley, 1953).-

Estos autores demostraron que muchas cepas de E. coli, entre las cuales se cuenta K 12, no crecen en presencia del aminoácido valina. Observaron además que hay mutaciones de resistencia a

ese efecto y mapearon una de ellas en la zona de TL.-

Se aisló una mutante espontánea, resistente a valina, de la cepa F- PA309 y se la cruzó con la Hfr H resistente, con los resultados que aparecen en la tabla 15.-

TABLA 15

Cruzamiento Hfr H/V,I,B,8 por F- PA309 Val^R

Marcador no seleccionado	% de marcadores no seleccionados en los recombinantes					
	Tr ⁺ St ^R	Tr ⁺ Val ^R	H ⁺ St ^R	H ⁺ Val ^R	Arg ⁺ St ^R	Arg ⁺ Val ^R
Tr ⁺	---	---	55	23	23	28
H ⁺	13	8	---	---	35	30
St ^S	---	3	---	3	---	30
Val ^S	8	---	30	---	43	---
Arg ⁺	0	0	0	0	---	---
(V,I,B,8) ^R	0	0	0	0	0	0
Frecuencia de recombinación de los recomb.selec.(%)						
	0,5	1,8	0,63	0,33	0,03	0,04

Se probaron 80 colonias de cada recombinante. No se seleccionó el recombinante T⁺L⁺St^R porque la cepa F- empleada es T⁺L⁺.-

Aunque no se observó ningún ligamiento entre St^S y (V,I,B,8)^R pudo advertirse que en algunos recombinantes Arg⁺Val^R aparecían abundantes colonias resistentes en los halos producidos con las colicinas.-

Como esto no ocurría con los recombinantes Arg⁺St^R, se seleccionaron 100 recombinantes Arg⁺Val^R, de un cruzamiento análogo al

anterior. Se observó al probar su resistencia, que aunque todos producían halo con las colicinas, muchos de estos halos (30%) nos traban numerosas colonias resistentes.-

El número de dichas colonias variaba en los distintos recombinantes, pero era constante con las cuatro colicinas para un recombinante dado.-

Se estudiaron esas colonias picándolas de los halos y se observó qué, además de ser resistentes a las cuatro colicinas, en la mayoría de los casos correspondían al genotipo $Tr^+H^+St^S$, que con frecuencia no era el que presentaba el recombinante del que provenían.-

Es probable pues, que el factor que dificulta la localización de este locus, sea una integración deficiente y tardía en el cromosoma de la F-.

Paralelamente, es interesante observar que la mutación Val^R obtenida, no mapea en la región de TL, (Jacob y Wollman, 1961), sino cercana a H, como se deduce de su ligamiento a otros marcadores y de la disminución de los recombinantes H^+Val^R con respecto a los H^+St^R (Tabla 15).-

i.- Relación entre los tres loci de resistencia a la colicina V.-

No pudiendo determinar la ubicación del locus que da resistencia a las colicinas V, I, B, y 8, se decidió estudiar su posible coincidencia con algunos de los otros dos, Vr y $(V,I)^R$ ya ubicados

Para ello se realizaron cruzamientos en los cuales ambas cepas eran resistentes a V, pero de diferente tipo y se seleccionaron los recombinantes apropiados para observar recombinación entre los loci correspondientes.-

Alelismo entre V y (V,I).

Cruzamiento Hfr P10/V x F- PA 360/V, I.-

Se seleccionaron los recombinantes H^+St^R , de 100 de los cuales se probó su resistencia a las colicinas V e I. De ellos:

31 eran resistentes a V e I (locus (V,I))

28 eran resistentes a V y sensibles a I (locus V)

41 eran sensibles a V e I

Siendo ambas cepas resistentes a V, estas 41 colonias provienen de la recombinación entre ambos loci.-

Alelismo entre (V,I,B,8) y (V,I).

Cruzamiento Hfr H/V,I,B,8 por F- PA 360/V,I.-

Se seleccionaron los recombinantes H^+St^R , de 100 de los cuales se probó su resistencia a las colicinas V,I,B y 8. Eran:

50 resistentes a V e I y sensibles a B y 8 (locus (V,I)).

50 sensibles a V,I,B y 8

Estos últimos se deben a recombinación entre ambos loci, lo cual demuestra que las mutaciones (V,I) y (V,I,B,8) no son alélicas.-

Alelismo entre (V,I,B,8) y V.

Cruzamiento Hfr H/V,I,B,8 por F- PA 360/V.

Se seleccionaron los recombinantes SG^+St^R y se probó la resistencia de 100 de ellos a las colicinas V,I,B y 8. Eran:

67 resistentes a V y sensibles a I,B y 8 (locus V)

33 sensibles a V,I,B y 8

La aparición de estos últimos recombinantes demuestra que ambas mutaciones no son alélicas.-

j.- Resistencia a la colicina B.-

Las cepas aisladas de este tipo provenían de la Hfr P10, que es resistente al fago T5 (Tabla 1) pero sensible, aunque en menor

grado, a la colicina B. Se cruzó una, completamente resistente a B, con la F- PA 309 sensible y se seleccionaron los recombinantes Arg^+St^R , H^+St^R y Tr^+St^R . Se probaron 50 colonias de cada uno de ellos sin encontrar ninguna resistencia a B.-

Para eliminar la posibilidad de que el locus se encontrara próximo a St^S y por eso no apareciera, se cambió la F- por una derivada de ella, pero T^+L^+ . Como la Hfr P10 es T^-L^- , se seleccionaron los recombinantes $Arg^+T^+L^+$, $H^+T^+L^+$ y $Tr^+T^+L^+$, sin encontrar, tampoco ninguna colonia resistente a pesar de que muchos de esos recombinantes eran St^S .-

Estos resultados indicarían una localización en el extremo distal del cromosoma de la Hfr P10, es decir en la región de TL. Usando una F- PA309 resistente a B, y cruzándola con la Hfr H sensible, se comprobó esa localización como puede verse en la tabla 16.-

TABLA 16

Cruzamiento Hfr por F- PA 309/B

Marcador no seleccionado	% de marcadores no seleccionados en recombinantes			
	$T^+L^+St^R$	Tr^+St^R	H^+St^R	Arg^+St^R
T^+L^+	---	88	80	78
B^S	78	75	73	83
Tr^+	25	---	80	65
H^+	5	20	---	45
Arg^+	0	0	0	---
Frecuencia de recombinación de los recon.selec.(%)				
	40	8,5	1,9	0,05

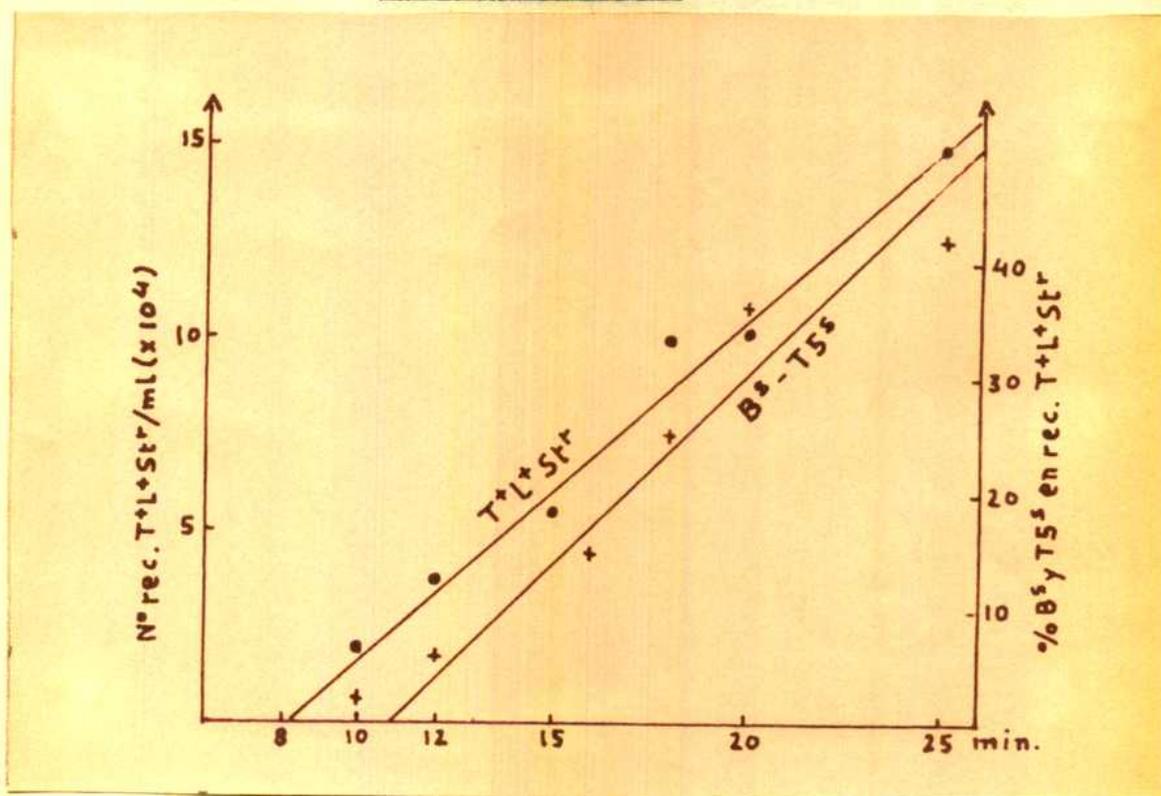
Se probaron 50 colonias de cada tipo.-

El estrecho ligamiento entre TL y B se comprobó interrumpiendo la conjugación a distintos tiempos en un cruzamiento análogo al anterior. Se seleccionaron los recombinantes $T^+L^+St^r$ y se estudió en ellos la aparición de la sensibilidad a B.-

Como ya se indicó anteriormente, Fredericq y Gratia (1960) encontraron que las cepas resistentes a los fagos T1-T5, presentan una sensibilidad disminuida a la colicina B. Aunque todas las mutantes aquí mencionadas son completamente resistentes, la ubicación del locus sugería una posible relación con el que confiere resistencia a dichos fagos, que napea también en esa zona. Por esa razón, se controló en los recombinantes la aparición de la sensibilidad a T5 transferida por la Hfr.

FIGURA 4

Momento de entrada de algunos marcadores, en el cruzamiento
Hfr H x PA309/B



Se probaron entre 100 y 200 recombinantes de cada tiempo.-

Como puede observarse en la figura 4, los recombinantes $T^+L^+St^R$ aparecen a los 8-9 minutos y los marcadores B^S y $T5^S$ aparecen entre los 10 y 11 minutos.-

En la casi totalidad de las colonias probadas, a la resistencia o sensibilidad a la colicina B corresponde la misma respuesta frente al fago T5, pero se aislaron cuatro recombinantes que a pesar de ser resistentes a T5 se muestran sensibles, aunque en menor grado que la Hfr, a la colicina B. Estos recombinantes han recobrado el fenotipo que tenía la cepa F- antes de mutar a completa resistencia a B.-

k.- Resistencia a B (menor sensibilidad a I y 8).-

Se realizó sólo un mapeo preliminar de esta mutación, que fenotípicamente se diferencia de la anterior únicamente porque las cepas que la llevan dan halos menores con las productoras de colicina I y 8.-

Se emplearon cepas resistentes Hfr H y Hfr P10 y con ambas se obtuvieron resultados concordantes que indican para este locus una ubicación completamente diferente a la del anterior, como puede verse en la tabla 17.-

Efectivamente el cruzamiento con la Hfr H demuestra que el locus de resistencia no está ligado a T^+L^+ ni a ninguno de los otros marcadores seleccionados, en tanto que el cruzamiento con la Hfr P10, indicaría una localización en la zona de St.-

TABLA 17

Porcentaje de marcadores no seleccionados en cruizamientos entre Hfr resistente a B^(x) y F- sensible

Marcador no seleccionado	Hfr H/B ^(x) x FA 309			Hfr P10/ B ^(x) x PA 309		
	T ⁺ L ⁺ St ^r	Tr ⁺ St ^r	H ⁺ St ^r	Arg ⁺ T ⁺ L ⁺	H ⁺ T ⁺ L ⁺	Tr ⁺ T ⁺ L ⁺
T ⁺ L ⁺	--	79	75	--	--	--
Tr ⁺	27	--	50	33	40	--
H ⁺	7	12	--	33	--	90
Arg ⁺	0	0	0	--	68	97
St ⁸	--	--	--	10	15	5
B ^r	0	0	0	0	40	30

Se probaron entre 50 y 80 colonias de cada recombinante
(x) Menor sensibilidad a I y 8

TABLA 18

Tipos de mutantes seleccionadas

Selección con colicina	Resistente a		Ubicación genética	Características
	colicina	fago		
E ₂	E ₂ , E ₁	BF-23	entre Arg-M	
K	K		cerca de St	mala integración
	K, E ₂ , E ₁		cerca de Gal	mal crecimiento, revierte
	K, E ₂		---	mal crecimiento, revierte
8	8	T6	entre Lac-Gal	integración deficiente
	8, E ₁		(1)	
V	V		entre SG-St	
	V, I		entre SG-H	
	V, I, B, 8	T1	?	mal crecimiento e integración, no revierte
I	I		entre SG-H	
	I, V		---	
B	B		may cerca de (T1-T5) ^r	
	B (2)		cerca de St	
	B, V, I(3)		---	

- (1) Según mapeos preliminares estaría entre H y St
 (2) Menor sensibilidad a I y 8
 (3) No se probó su resistencia a 8

IV.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

a.- Características de las mutantes y su localización genética.-

Resistencia a E_2 , E_1 y HF-23.-

Las características de estas mutantes, único tipo aislado por acción de la colicina E_2 , concuerdan con las descritas por Fredericq (1949a). Su localización entre los marcadores M y Arg, está de acuerdo también con la encontrada por Jenkin y Rowley (1955), quienes lo ubicaron entre M y B_1 . Dada la distancia existente entre Arg y M (1-2 minutos) (Jacob y Wollman, 1961) y la proximidad del marcador de resistencia al primero, es fácilmente explicable la imposibilidad de separar a ambos por interrupción de la conjugación, pues la distancia entre ellos debe ser menor que un minuto.-

La frecuencia con que aparecen mutantes de este fenotipo y la falta de segregación entre la resistencia a los tres agentes, sugieren que ésta es una mutación de punto que afecta un paso común de la sensibilidad a las colicinas E_2 , E_1 y al fago HF-23.-

Resistencia a K, E_2 y E_1 .-

Esta clase de mutantes, que aparecen con frecuencia entre las resistentes a la colicina K, demuestra la existencia de un tipo de resistencia cruzada no conocido hasta el momento.-

Pone, al mismo tiempo en evidencia, diferencias de comportamiento entre colicinas del grupo E y el fago HF-23, pues a pesar de ser, las cepas de este tipo, resistentes a E_2 y E_1 , mantienen su sensibilidad a ese fago. Esas diferencias aparecen también en otro tipo de mutantes resistentes a K: las $(K, E_2)^R$. (Tabla 13).-

Las cepas con la mutación $(K, E_2, E_1)^R$, que mapea muy estrechamente ligada a Gal, crecen con manifiesta dificultad, Es muy

posible que esta característica esté íntimamente relacionada con las modificaciones de la pared de la bacteria o que ambas sean efectos de una misma causa, pues las bacterias que revierten, recobran, junto con la sensibilidad a las colicinas, la normalidad de crecimiento.-

No es de extrañar, pues, que esas reversiones se acumulen en los cultivos, ya que deben ser favorablemente seleccionadas, y que las cepas resistentes se manifiesten como poco estables. Su capacidad de reversión, indica, por otra parte, que la resistencia se debe a una mutación de punto que interfiere con la sensibilidad a las tres colicinas.-

Es destacable, además, que cepas de este tipo sólo se aislan por acción de la colicina K y no de la E_2 .-

Es probable que ello se deba a la existencia de grandes diferencias entre las frecuencias de mutación a $(K, E_2, E_1)^r$ y a $(E_2, E_1, HF-23)^r$.-

De ser este el caso, es de esperar que estas últimas mutantes, que aparecen con gran frecuencia cuando se emplea la colicina E_2 en la selección, enmascaren la presencia de las otras que son escasas y crecen con dificultad.-

Resistencia a K.-

Las mutantes aisladas, resistentes a esta colicina, no presentan las características mencionadas por Fredericq (1949b).-

Este autor encontró una estrecha relación entre esta colicina y el fago T6, pues todas las mutantes aisladas por su resistencia a dicho fago, eran resistentes a la colicina, y lo mismo ocurría con la mayoría de las que se aislaban como resistentes a la colicina, con respecto al fago.-

En cruzamientos entre cepas resistentes y sensibles, el mar-

gador fué ubicado a la derecha de Lac (Fredericq y Betz-Bareau, 1952).-

Ese tipo de mutante no ha aparecido entre las aisladas aquí pues las resistentes a K, aun correspondiendo a distintos tipos (Tabla 18), son todas sensibles al fago T6.-

Se ha descartado la posibilidad de que esto se deba a diferencia en la colicina, pues empleando la cepa E. coli K-235, frecuentemente utilizada por Fredericq como productora de colicina K, se obtienen los mismos resultados.-

La identidad del fago recibido con T6, parece cierta, pues concuerda con éste en sus características de plaqueo y en la ubicación genética del locus de resistencia al mismo.-

Parece, pues, inexplicable la diferencia encontrada, que podría, quizás, atribuirse a peculiaridades de las cepas empleadas para la obtención de resistentes, que fueron, en el caso de Fredericq, varias cepas de Shigella y E. coli, y en el presente, cepas derivadas de E. coli K-12.-

A este respecto, debe mencionarse, que una cepa de K12 resistente a K, proveniente del Dr. Fredericq, es no sólo resistente a la colicina K y al fago T6 sino también a la colicina 8. Esta cepa, que corrobora la relación establecida aquí entre 8 y T6, podría explicar también la resistencia cruzada encontrada entre K y T6, por la existencia de un tipo de mutante $(K,8,T6)^r$. Este tipo no estaría entre los de aparición más frecuente con las cepas de E. coli K12 empleadas, pues no se aisló ningún representante de él, en este trabajo.-

No ha sido posible mapear con exactitud la mutación que da resistencia, únicamente, a la colicina K, y solamente se tienen indicios de que podría estar cercana al locus de St. Las dificultades en su mapeo parecen provenir de una deficiente integración

del marcador dada la heterogeneidad que, en cuanto a resistencia, presentan algunos de los recombinantes aislados.

Tales alteraciones en la integración parecen ser frecuentes con las deleciones (~~gratia~~, 1962). Podría, pues, esperarse que ésta fuera la naturaleza de esta mutación, que es además muy estable en sus características.-

Resistencia a 8 y fago T6.-

Esta colicina, aun no identificada, pero indudablemente distinta a las otras empleadas aquí, muestra evidente resistencia cruzada con el fago T6. Esta no es, sin embargo, absoluta, pues se aislaron mutantes de otros dos tipos distintos (Tabla 18) que siendo resistentes a 8, conservan su sensibilidad a T6.-

El mapeo de esta mutación la ubica entre Lac y Gal, lo que coincide con el locus conocido de resistencia a T6. Coincide además, con el mapeo, realizado por Fredericq y Betz-Bareau (1952), del locus de resistencia a K-T6.-

Pero, como se explicó al tratar la colicina K, la única relación hallada entre ésta y la 8 se presenta en una mutante, obtenida por Fredericq, que no se estudió aquí genéticamente y de la que no se conoce si proviene de una mutación de un solo paso.-

Aunque en menor grado que con algunos de los otros loci, parece haber también con estas mutantes inconvenientes en la integración.-

En los cruzamientos en los que se interrumpió la conjugación (Figura 3) ese hecho se hace evidente, pues el marcador Gal⁺, que entra después que el de resistencia, aumenta con pendiente más pronunciada y prontamente lo sobrepasa en porcentaje entre los recombinantes Pro⁺St^r.-

Si esta es o no, una manifestación que acompaña siempre a

este tipo de mutación, deberá decidirse con el estudio de más cepas de este genotipo.-

Resistencia a I.-

Además de los loci en que la resistencia a esta colicina se presenta acompañada por resistencia a otras, existe otro, situado entre H y SG, que confiere sólo resistencia a I.-

No se ha investigado el posible alelismo de esta mutación con la que da resistencia a V e I que napea en la misma zona (Tabla 18), pero el hecho de que este tipo de resistencia a I, vaya acompañado de una evidente disminución en la sensibilidad a V, tiende a indicar que podrían corresponder al mismo locus.-

Resistencia a V.-

Este locus que da resistencia únicamente a V, está situado entre los marcadores St y SG.-

Genéticamente se ha comprobado, que no es alélico con las otras mutantes aisladas, que presentan distinto tipo de resistencia a V.-

Resistencia a V e I.-

Es, junto con el anterior, el tipo más frecuente de resistencia a la colicina V, Su napeo indica que está ubicado entre los marcadores H y Sg.-

Aunque no se determinó su relación con la mutación I^R , se demostró que no es alélico con los otros tipos de resistencia a V.-

Resistencia a V, I, B y 8.-

Las características de esta mutación son análogas a las del grupo estudiado por Gratia (1962). Este autor encontró 4 tipos de mutantes: 1° $(B,I)^R$, 2° $(T_1,V,B,I)^R$, 3° $Tr^2(T_1,V,B,I)^R$

y 4° $Tr1^-$, $Tr2^-$, $(T_1, V, B, I)^R$ de las cuales consideró las tres últimas deleciones de extensión variable en la misma región cromosómica.-

En cruzamientos, y también en transducción, cepas con estas características mostraban marcadas anomalías en su comportamiento. Los recombinantes Tr^+St^R , por ejemplo, aparecían con frecuencia menor a la normal y su número aumentaba progresivamente tras incubación de varios días, debido a integraciones y segregación tardía de heterocigotas persistentes.-

La cepa estudiada aquí, presenta características que la identifican con el tipo 2 de Gratia. Es Tr^+ y resiste a las colicinas V, I, B y al fago T1, y además a la colicina 8 que probablemente no fué probada por ese autor.-

En cruzamientos, la resistencia no presenta ligamento con ninguno de los marcadores seleccionados (TL, Tr, H, SG, St y Arg) aunque estos comprenden prácticamente todo el cromosoma de E. coli K-12.

No se ha observado disminución de los recombinantes Tr^+St^R , pero recombinantes distales, contraseleccionados con Val, muestra marcada heterogeneidad con respecto a marcadores no seleccionados incluyendo el de resistencia, lo que indica un estado heterocigota de larga duración.-

La localización dada por Gratia a estas mutaciones en la zona de Tr, basada principalmente en la presencia simultánea, en alguna de ellas, de resistencia a las colicinas e incapacidad para sintetizar ese aminoácido, no pudo confirmarse en este trabajo.

En los pocos casos en los que se recobró el marcador, estaba acompañado por la mayor parte de los correspondientes a la Hfr, como si en realidad se hubiera integrado el marcador de la F-, empleado en la contraselección, en el cromosoma de la Hfr.-

Todos los datos obtenidos sugieren que hay eliminación post cigóticas del carácter de resistencia, probablemente a través de un proceso de integración diferencial.-

La estabilidad de la resistencia en la cepa, a pesar de su crecimiento deficiente, apoya la conclusión de Gratia de que es una deleción.-

No es posible decidir, con los resultados obtenidos, si la resistencia conjunta a las 4 colicinas y al fago, se debe a que la deleción comprende a los distintos genes correspondientes o a que afecta un paso común de la resistencia a todos ellos.-

Dada la gran dispersión encontrada entre los loci de resistencia mapeados, aun entre los correspondientes a una misma colicina, la segunda hipótesis parece más probable.-

Resistencia a B.-

Como ya observaron Fredericq y Gratia (1960) los tipos de resistencia a B son muy variados. Confirmando otra de las observaciones de estos autores, todas las cepas originales empleadas (Tabla 1) resistentes a los fagos T1 - T5, presentaban una sensibilidad netamente disminuída a B.-

Las cepas completamente resistentes que se aislaron a partir de ellas corresponden, sin embargo, a dos tipos.

El locus correspondiente a uno de ellos mapea entre TL y Lac y muestra estrecho ligamiento al marcador (T1-T5)^r. Se observó segregación entre la resistencia completa a B y la resistencia a T5, pero no entre ésta y la semiresistencia a B.-

Esto podría indicar la existencia de un grupo de loci muy ligados, cada uno de los cuales daría resistencia a un determinado nivel de colicina; alguno de ellos tendría además el efecto conocido sobre la sensibilidad a los fagos T1-T5

Las mutantes del segundo tipo se diferencian de las anteriores porque presentan menor sensibilidad a las colicinas I y 8.-

Genéticamente las diferencias son más netas, pues el locus correspondiente no muestra ninguna relación con (T1-T5)^r y los datos preliminares obtenidos tienden a ubicarlo en la cercanía de St.-

Por algunas de sus características estas mutantes se parecen a las que Fredericq y Grati~~e~~ (1960) localizaron entre los marcadores C y St. Efectivamente, además de la semejanza en la ubicación, ambos tipos tienen menor sensibilidad a I. Se diferencian, sin embargo, en que las obtenidas por esos autores adquieren junto con la resistencia la incapacidad de sintetizar metionina, en tanto que éstas la sintetizan normalmente.-

b.- Resistencia a colicinas, resistencia a fagos y relación entre ambas.-

Las mutantes aisladas en este trabajo indican la existencia de gran diversidad en los tipos de resistencia a colicinas.

Su estudio genético demuestra, por otra parte, que cada uno de esos tipos corresponde a un locus diferente, y que los distintos loci que controlan la sensibilidad a una colicina determinada, se encuentran distribuidos en diferentes regiones del cromosoma.-

Aunque todas las cepas de igual fenotipo que se probaron, parecían corresponder a un mismo locus, no se hizo un estudio sistemático que pusiera en evidencia las indudables diferencias de genotipo que debe haber entre ellas. Debe considerarse que los distintos fenotipos se determinaron por el comportamiento frente a fagos y colicinas no empleadas en la selección, y para ello se usaron solamente tres fagos y siete de las veinte colicinas conocidas. Es, pues, presunible que el uso de más de estos agentes, subdividiría los grupos que se determinaron con aquellos y pondría en evidencia diferencias posiblemente genotípicas.-

La frecuente presencia, en las mutantes, de resistencia múltiple a varias colicinas, o a colicinas y fagos, lleva ineludiblemente a considerar la relación que puede existir entre ellos.-

Fredericq (1957) interpretó la existencia de resistencia cruzada entre colicinas y fagos como demostración de que la adsorción de éstos se realizaba sobre los mismos receptores utilizados por la colicina con la cual presentaban esa relación.-

Dada la semejanza de propiedades entre los fagos atemper-

dos y los factores colicinógenos, y entre las colicinas y los fagos virulentos, vió en la resistencia cruzada entre el fago T6 y la colicina K, una prueba de parentesco entre ambos agentes y postuló una presunta identidad entre la colicina y la proteína de la cola del fago, la actividad letal de las cuales (Latarjet y Fredericq, 1955) tendrían iguales curvas de inactivación con rayos X.-

Sin embargo, ese parentesco fué descartado por Goebel et al. (1955), quienes aunque observaron resistencia cruzada entre T6 y K en "variantes de fase II de Sh. sonnei", demostraron que entre ambos agentes no existen propiedades químicas ni inmunológicas en común.-

Las mutantes aisladas en este trabajo demuestran, por otra parte, que tampoco los receptores son comunes. Y esta conclusión puede extenderse a todos los casos de resistencia cruzada observados aquí.-

Efectivamente, puesto que varios son los loci que controlan la sensibilidad a una colicina, el hecho de que la mutación en uno solo sea suficiente para proteger a la bacteria indica que todos ellos afectan la síntesis o propiedades de una misma estructura.-

En ese caso, de ser esa estructura, que podemos identificar como el receptor, común a dos o mas agentes, las mutaciones correspondientes tendrían que afectarlos en forma similar.

El hecho de que con ninguna de las colicinas y fagos que se emplearon, el comportamiento de las mutantes aisladas sea idéntico al presentado con otra, (Tabla 18) indicaría que cada uno de esos agentes se adsorbe sobre receptores específicos pa

ra él.-

Es decir que esa especificidad debe ser muy grande, y en esto se asemejan también a los receptores para fagos, en los cuales, por ejemplo con las mutantes (T1-T5)^r, pequeños cambios no detectables por métodos químicos ni inmunológicos, bastan para inactivar el receptor (Weidel, 1958).-

También por analogía con lo que ocurre en la resistencia a fagos, podría esperarse que algunas de las mutantes múltiples dieran indicios sobre la distribución de los receptores de colicinas en las capas de la pared de E. coli. Como es sabido las mutantes de un solo paso resistentes a los fagos T3, T4 y T7 carecen de una heptosa que forma parte de la capa en la que se hallan los receptores específicos para cada uno de ellos (Weidel, 1958).-

La distribución de resistencia entre la mutante de un solo paso, resistente a K, E₂ y E₁ y la mutante, por delección resistente a V, I, B y 8, podría tener significado en ese sentido.-

Es llamativo también que mostrando las resistentes a colicinas tales complicadas combinaciones, no sea más frecuente la resistencia cruzada con fagos. Este hecho podría ser, justamente, indicio de falta de parentesco entre ellos.-

Finalmente, es necesario remarcar que a pesar de lo poco específicas que son las mutantes resistentes, el uso de apropiadas combinaciones de ellas parece ser, por el momento, el método más eficaz para diferenciar e identificar colicinas.-

LITERATURA CITADA

- Alföldi, L., Jacob, F., Wollman, E. L. y Mazé, R. (1958). -Sur le déterminisme génétique de la colicinogénie. C.R. Acad. Sci., 246, 3531.
- Alföldi, L., Stent, G. S. y Clowes, R.C. (1962). The chromosomal site of the RNA control (RC) locus in Escherichia coli. J. Mol. Biol., 5, 348.
- Bancroft, H. (1960). Introducción a la bioestadística. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Buenos Aires.
- Barry, G.T., Everhart, D.L. y Graham, M. (1963). Colicine A. Nature, 198, 211.
- Ben-Gurion, R. y Hertman, J. (1958). Bacteriocin-like material produced by Pasteurella pestis. J. gen. Microbiol., 19, 289-
- Bordet, P y Beumer, J. (1948). Inhibition de l'action d'antibiotiques par des extraits des bactéries sensibles. C.R. Soc. Biol., 142, 259.
- Cavalli-Sforza, L. L. y Jinks, J. L. (1955). Studies on the genetic system of E. coli K12. J. Genetics, 54, 87.
- Clowes, R. C. (1963). Colicin factors and episomes. Genet. Res., Camb., 4, 162.
- Cohen, S. y Arbogast, R. (1950). Chemical studies in host-virus interactions. VIII. The mutual reactivation of T2 r+ virus inactivated by ultraviolet light and the synthesis of DNA. J. Exptl. Med., 91, 637.
- Davis, B. D. y Mingioli, E. S. (1950). Mutants of E. coli requiring methionine or vitamin B₁₂. J. Bacteriol., 60, 17.
- Demerec, M. y Fano, U. (1945). Bacteriophage-resistant mutants in E. coli. Genetics, 30, 119.

- Endo, H., Kaniya, T. y Ishizawa, M. (1963). λ -phage induction by colicin E₂. Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 477.
- Fredericq, P. (1948). Apparition spontanée de mutants resistant aux colicines. C. R. Soc. Biol., 142, 853.
- Fredericq, P. (1949a). Sur la résistance croisée entre colicine E et bactériophage II. C. R. Soc. Biol., 143, 1011.
- Fredericq, P. (1949b). sur la résistance croisée entre colicine K et bactériophage III. C. R. Soc. Biol., 143, 1014.
- Fredericq, P. (1953). Action des colicines E et K sur la Multiplication de divers bactériophages. C. R. Soc. Biol., 147, 533.
- Fredericq, P. (1954). Induction de la production de colicine par irradiation ultraviolette de souches colicinogènes de E. coli. C.R. Soc. Biol., 148, 1276.
- Fredericq, P. (1957). Genetics of two different mechanisms of resistance to colicins. En CIBA Found. Symp. on Drug Resistance in Micro-organisms. Little, Brown & Co. Boston.
- Fredericq, P. (1963). On the nature of colicinogenic factors: a review. J. Theoret. Biol., 4, 159-165.
- Fredericq, P. y Betz-Bareau, M. (1952). Recombinants génétiques de souches marquées par résistance aux colicines et aux bactériophages Ann. Inst. Pasteur, 83, 283.
- Fredericq, P. y Betz-Bareau, M. (1953). Transfert génétique de la propriété colicinogène en rapport avec la polarité F des parents. C. R. Soc. Biol. 147, 2043.
- Fredericq, P. y Gratia, J. P. (1960). Recherches génétiques sur la résistance croisée au phage T1 et à la colicine B chez Escherichia coli. C. R. Soc. Biol., 154, 2150
- Goebel, W. (1962). The chromatographic fractionation of colicine K. Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 214.

- Goebel, W. y Barry, G. T. (1958). Colicine K: II: The preparation and properties of a substance having colicine K activity. *J. Exptl. Med.*, 107, 185.
- Goebel, W., Barry, G., Jesaitis, M. y Miller, E. (1955). Colicine K., *Nature*, 176, 700.
- Gratia, J. P. (1962). Effect of multisite mutation to colicine resistance on recombination and segregation in Escherichia coli. *Nature*, 196, 1337.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. *C. R. Soc. Biol.*, 93, 1040.
- Hanon, Y. y Péron, Y. (1963). Individualisation de quelques nouvelles familles d'entérobactériocines. *C.R. Acad. Sci.*, 257, 309.
- Holland, I. B. (1961). The purification and properties of negacin, a bacteriocin from Bacillus negaterium. *Biochem. J.*, 78, 641.
- Hutton, J. J. y Goebel, W. (1961). Colicine V. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47, 1498.
- Ivánovics, G. y Alföldi, L. (1954). A new antibacterial principle: Megacine. *Nature*, 174, 465.
- Jacob, F. (1954). Biosynthese induit et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de Pseudomonas pyocyanea. *Ann. Inst. Pasteur*, 86, 149,
- Jacob, F., Iwoff, A., Siminovitch, L. y Wollman, E. L. (1953). Définitions de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 222.
- Jacob, F., Siminovitch, L. y Wollman, E. L. (1952). Sur la biosynthese d'une colicine et sur son mode d'action. *Ann. Inst.*

- Pasteur, 83, 295.
- Jacob, F. y Wollman, E. L. (1961). Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press. Nueva York.
- Jenkin, C. R. y Rowley, D. (1955). Resistance to colicin E as a genetic marker in E. coli K12. Nature, 175, 779.
- Latarjet, R. y Frederioq, P. (1955). An X-rays study on a colicin and its relation to the bacteriophage T6, Virology, 1, 100.
- Lederberg, J. y Lederberg, E. M. (1952). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol., 63, 399.
- Manten, A. y Rowley, D. (1953). Genetic analysis of valine inhibition in the K12 strain of Bact. coli. J. gen. Microbiol. 9, 226.
- Matsushita, H., Fox, M. y Goebel, W. (1960). Colicine K: IV: The effect of metabolites upon colicine synthesis. J. Exptl. Med., 112, 1055.
- Nomura, M. (1963). Mode of action of colicins. Resúmenes de Cold Spring Harbor Symp.
- Nomura, M., Matsubara, K., Okamoto, K. y Fujimura, R. (1962). Inhibition of host nucleic acid and protein synthesis by bacteriophage T4: Its relation to the physical and functional integrity of host chromosome, J. Mol. Biol., 5, 535.
- Nomura, M. y Nakamura, M. (1962). - Reversibility of inhibition of nucleic acids and protein synthesis by colicin K. Biochen. Biopuy. Res. Comm. 7, 306.
- Nüske, R., Hösel, G., Venner, H. y Zinner, H. (1957). - Uber ein colicin aus E. coli SG 710. Biochen. Z., 329, 346.

- Ozeki, H., Stocker, B.A. D. y Margerie, H. de. (1959).- Production of colicine by single bacteria. Nature, 184, 337.
- Puig, J. (1963).- Estudio genético del factor colicinógeno B y de su relación con la fertilidad. Tesis, Universidad de Buenos Aires.
- Reynolds, B. L. y Reeves, P. R. (1963).- Some observations on the mode of action of colicin F. Biochen. Biophys. Res. Comm. 11, 140.
- Rüde, E. y Goebel, W. (1962).- Colicine K. V. The sonatic antigen of a non-colicinogenic variant of E. coli K-235. J. Exptl. Med., 116, 73.
- Silver, S. y Ozeki, H. (1962).- Transfer of DNA accompanying the transmission of colicinogenic properties by cell mating. Nature, 195, 873.
- Weidel, W. (1958). Bacterial viruses (With particular reference to adsorption/penetration). Ann. Rev. Microbiol., 12, 27.
- Wollman, E. L. y Jacob, F. (1955). Sur le mécanisme du transfert de matériel génétique au cours de la recombinaison chez E. coli K-12. C. R. Acad. Sci., 240, 2449.
- Zwaig, R. N. de (1963) Comportamiento genético de los factores colicinógenos E_1 y V-I en E. coli K12. Tesis, Universidad de Buenos Aires.
- Zwaig, R. N. de, Antón, D. y Puig, J. (1962).- The genetic control of colicinogenic factors E_2 , I and V. J. gen. Microbiol., 29, 473.

R. N. de Zwaig