

7

TRANSFERENCIA GÉNICA EN BACTERIAS Y SUS VIRUS



Colonias bacterianas en un medio de tinción.

Las colonias Lac^- son blancas. Las colonias Lac^+ se tiñen de rojo.
(Adaptado de J. D. Miller.)

Ideas fundamentales

El factor de fertilidad (F) permite la transferencia de DNA de una célula bacteriana a otra mediante el proceso de conjugación.

El factor F puede hallarse libre en el citoplasma o integrado en el cromosoma bacteriano.

Si F se integra en el cromosoma, pueden transferirse marcadores cromosómicos durante la conjugación.

Los bacteriófagos también pueden transferir DNA de una célula bacteriana a otra.

El proceso de transducción generalizada consiste en la incorporación aleatoria de fragmentos cromosómicos en la cápside de ciertos fagos bacterianos y su transferencia a otras células mediante infección.

Durante la transducción especializada, se produce la incorporación accidental en el genoma del fago de genes específicos de la bacteria cercanos a su sitio de integración y su transferencia a otras células por infección.

Los diferentes métodos de transferencia génica existentes en bacterias permiten a los genetistas elaborar mapas detallados de los genes bacterianos.

Hasta ahora, nos hemos ocupado casi exclusivamente de los genes empaquetados en cromosomas localizados en el interior del núcleo de organismos eucarióticos. Sin embargo, gran parte de la historia de la Genética y del análisis genético actual (en particular, la Genética molecular) está relacionada con organismos procarióticos, que no presentan un núcleo diferenciado, y con los virus. Aunque los **virus** comparten con los organismos vivos algunas de sus propiedades características, muchos biólogos consideran a los virus entidades diferentes que en ciertos sentidos no se parecen a los seres vivos. No son células; no pueden crecer o multiplicarse por sí mismos. Para reproducirse, han de parasitar a células vivas y utilizar su maquinaria metabólica. No obstante, los virus tienen propiedades hereditarias que pueden someterse a análisis genético. El análisis genético de las bacterias y sus virus ha constituido una fuente de descubrimientos que han sido esenciales para comprender la naturaleza y la estructura del material genético, del código genético y de la mutación.

Los **procariotas** son las bacterias y las algas verdeazuladas, ahora clasificadas como *cianobacterias*. Los virus que parasitan a las bacterias se denominan **bacteriófagos** o, simplemente, **fagos**. Los trabajos pioneros realizados con bacteriófagos han aportado mucha de la información actual sobre virus causantes de tumores y otros virus de animales y plantas.

En comparación con los eucariotas, los organismos procarióticos y los virus presentan cromosomas muy sencillos que no están localizados en un compartimiento delineado por la membrana nuclear. Debido a que son monoploides, estos cromosomas no sufren meiosis; aunque pasan por etapas análogas a la meiosis. El enfoque del análisis genético de la recombinación en estos organismos es sorprendentemente similar a la utilizada en eucariotas.

Como trataremos en detalle en este capítulo, existen varios mecanismos diferentes que permiten a las bacterias recombinar. En el primer proceso que estudiaremos, la **conjugación**, una célula bacteriana transfiere fragmentos de DNA a otra mediante contacto directo entre las células. Asimismo, una célula bacteriana puede tomar un fragmento de DNA del medio ambiente e incorporarlo a su propio cromosoma, proceso denominado **transformación**. Además, ciertos virus bacterianos toman ocasionalmente un fragmento de DNA de una bacteria y lo inyectan en otra, que puede incorporarlo en su cromosoma, mediante un proceso conocido como **transducción**.

Aspectos prácticos del trabajo con microorganismos

Las bacterias pueden cultivarse en medio líquido o en una superficie sólida, como el gel de agar, siempre que el medio contenga los ingredientes nutritivos básicos. En un medio líquido, las bacterias se dividen por fisión binaria: se multiplican geométricamente hasta que los nutrientes se agotan en el medio o hasta que se acumulan productos residuales tóxicos que detienen el crecimiento de la población. Con una pipeta, se puede inocular una pequeña cantidad de cultivo líquido en crecimiento en una placa de Petri que contenga medio con agar, y extenderla sobre la superficie con un asa de siembra estéril. Este proceso se conoce como **siembra en placa** (Fig. 7-1). Cada célula se divide enton-

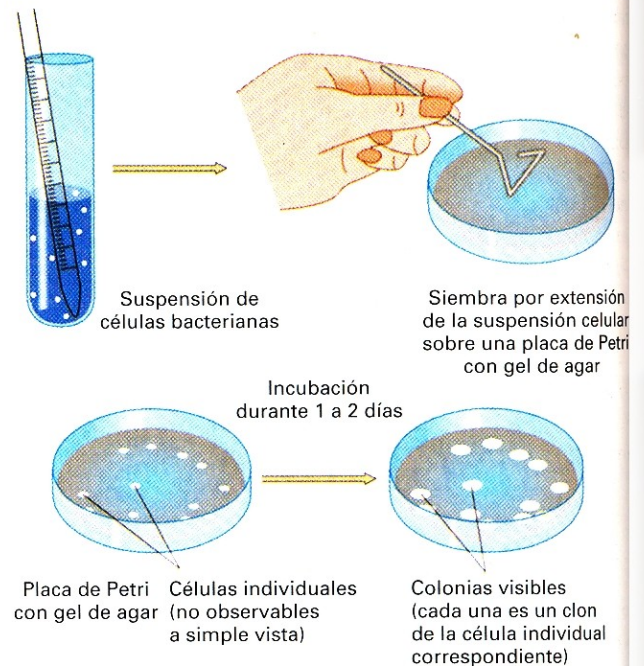


Figura 7-1. Métodos para el cultivo de bacterias en el laboratorio. Unas pocas células bacterianas que han estado creciendo en un medio líquido con nutrientes se extienden sobre un medio con agar que contiene también los nutrientes necesarios. Cada una de estas células originales se divide repetidamente por fisión binaria, dando lugar a una colonia. Todas las células de una colonia, procedentes de una misma célula, tendrán el mismo genotipo y fenotipo.

ces por fisión binaria. Debido a que las células están inmovilizadas en el agar, todas las células hijas permanecen juntas en un grupo. Cuando esta masa celular alcanza más de 10^7 células, se hace visible a simple vista como una **colonia**. Si la muestra sembrada inicialmente contiene muy pocas células, cada colonia individual de la placa procederá de una única célula original. Los miembros de una colonia que derivan de un solo antepasado genético común constituyen un **clon**.

Las bacterias silvestres son **protótrofos**: pueden formar colonias en **medio mínimo** (un sustrato que sólo contiene sales inorgánicas, una fuente de carbono y energía, y agua). Los clones

CUADRO 7-1. Algunos símbolos genotípicos utilizados en genética bacteriana

Símbolo	Carácter o fenotipo asociado al símbolo
<i>bio</i> ⁻	Requiere suplemento de biotina en el medio mínimo.
<i>arg</i> ⁻	Requiere suplemento de arginina en el medio mínimo.
<i>met</i> ⁻	Requiere suplemento de metionina en el medio mínimo.
<i>lac</i> ⁻	Incapaz de utilizar lactosa como fuente de carbono.
<i>gal</i> ⁻	Incapaz de utilizar galactosa como fuente de carbono.
<i>str</i> ^r	Resistente al antibiótico estreptomina.
<i>str</i> ^s	Sensible al antibiótico estreptomina.

Nota: el medio mínimo es el medio sintético básico para el crecimiento bacteriano, sin nutrientes suplementarios.

mutantes se identifican porque son **auxótrofos**: no crecerán a menos que el medio contenga uno o más nutrientes específicos (por ejemplo: adenina, o treonina y biotina). Además, las estirpes silvestres son sensibles a ciertos inhibidores del crecimiento, como la estreptomycin, mientras que los **mutantes resistentes** forman colonias aunque esté presente el inhibidor. Estas propiedades permiten a los genetistas distinguir diferentes fenotipos entre las colonias sembradas.

Para muchos caracteres, el fenotipo de un clon se determina fácilmente mediante reconocimiento visual o pruebas químicas sencillas. El fenotipo de una colonia se corresponde entonces con el de la célula original que dio lugar al clon, determinándose así las frecuencias de los diferentes fenotipos en la muestra sembrada. El Cuadro 7-1 incluye algunos fenotipos bacterianos y sus símbolos genéticos.

Conjugación bacteriana

En este apartado y en los siguientes se describe el descubrimiento de la transferencia de genes entre bacterias, y se explican los

diferentes tipos de transferencia y su empleo en la Genética bacteriana. En primer lugar consideraremos la conjugación, que requiere un contacto directo entre las células. La conjugación fue el primer método de transferencia génica estudiado en detalle.

El descubrimiento de la conjugación

¿Poseen las bacterias algún proceso similar a la reproducción sexual y la recombinación? Esta pregunta fue respondida en 1946, gracias al sencillo y elegante trabajo experimental de Joshua Lederberg y Edward Tatum, quienes estudiaban dos estirpes de *Escherichia coli* con requerimientos nutritivos distintos. La estirpe A crecía en medio mínimo sólo si se añadía metionina y biotina; la estirpe B crecía en medio mínimo sólo si se añadía treonina, leucina y tiamina. Así que la estirpe A puede representarse como $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$ y la estirpe B como $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$. La Figura 7-2a explica de forma simplificada la idea del experimento. En este caso, las estirpes A y B se mezclan, y algunos de los descendientes se muestran ahora silvestres, pues han recuperado la capacidad de crecer sin la adición de suplementos. La Figura 7-2b ilustra el experimento con más detalle.

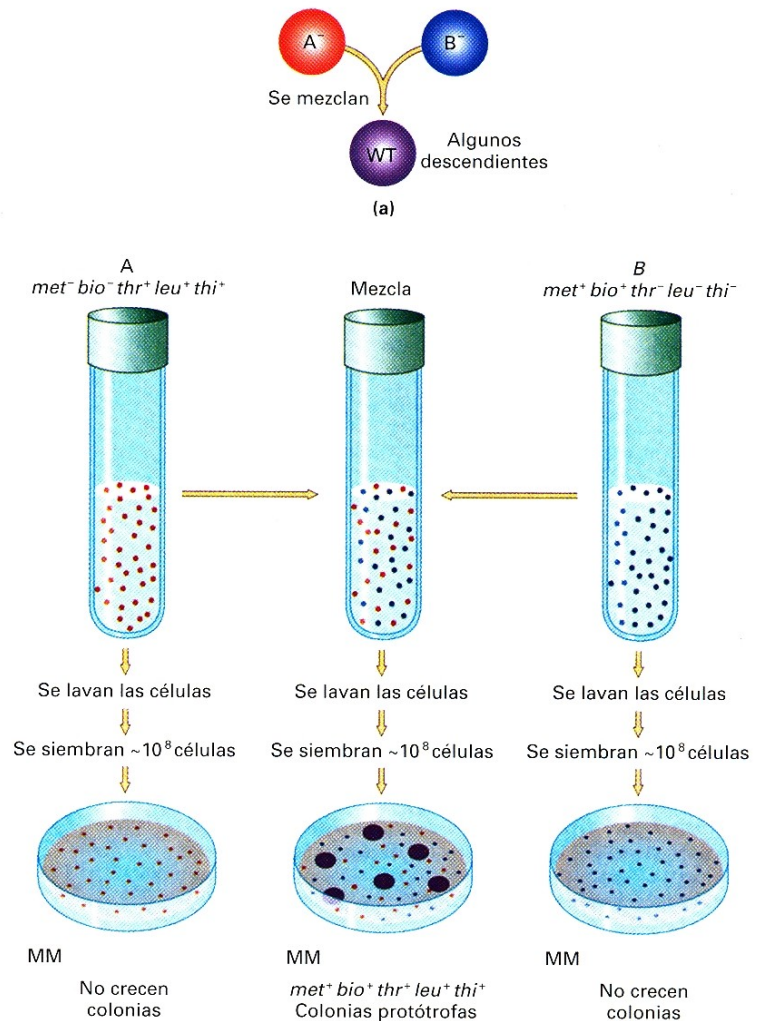


Figura 7-2. Demostración de Lederberg y Tatum de la recombinación genética entre células bacterianas. Las células del tipo A o del tipo B no pueden crecer en un medio mínimo (MM) sin suplementos, puesto que A y B llevan mutaciones que provocan incapacidad de sintetizar los constituyentes necesarios para el crecimiento celular. Sin embargo, si se mezclan las células A con las B durante unas horas y luego se siembran en una placa, aparecen unas pocas colonias en la placa de agar. Cada una de estas colonias deriva de una sola célula en la cual ha habido un intercambio de material genético; por tanto, son capaces de sintetizar todos los constituyentes necesarios del metabolismo.

Lederberg y Tatum sembraron bacterias en placas que contenían medio mínimo sin suplementos. Algunas placas se sembraron sólo con bacterias de la estirpe A, otras sólo con bacterias de la estirpe B, y otras con una mezcla de bacterias de las estirpes A y B que se habían incubado conjuntamente durante varias horas en un medio líquido que contenía todos los suplementos. En las placas donde se sembró sólo la estirpe A o sólo la estirpe B no aparecieron colonias, demostrando que la restauración de la prototrofia (la capacidad de crecer en medio mínimo sin suplementos) no se había producido por mutaciones revertientes. Sin embargo, en las placas que contenían la mezcla de las dos estirpes aparecieron colonias con una frecuencia de 1 cada 10 000 000 de células sembradas (en notación científica, 1×10^{-7}). Esta observación sugería que había ocurrido algún tipo de recombinación entre los genomas de las dos estirpes que había dado lugar a individuos protótrofos.

Necesidad de contacto físico entre las células

Podría pensarse que las células de dos estirpes no intercambian en realidad genes, sino que liberan sustancias que las otras células pueden absorber y utilizar para crecer. Esta posibilidad de «alimentación cruzada» fue descartada por Bernard Davis. Construyó un tubo con forma de «U» en el cual los dos brazos de la U estaban separados por un filtro de tamaño de poro pequeño. Los poros del filtro eran demasiado pequeños para permitir el paso de bacterias, pero suficientemente grandes para permitir el trasvase de medio líquido y de las sustancias disueltas en él (Fig. 7-3). Colocó la estirpe A en un brazo y la estirpe B en el otro. Después de incubar las estirpes durante un tiempo, analizó el contenido

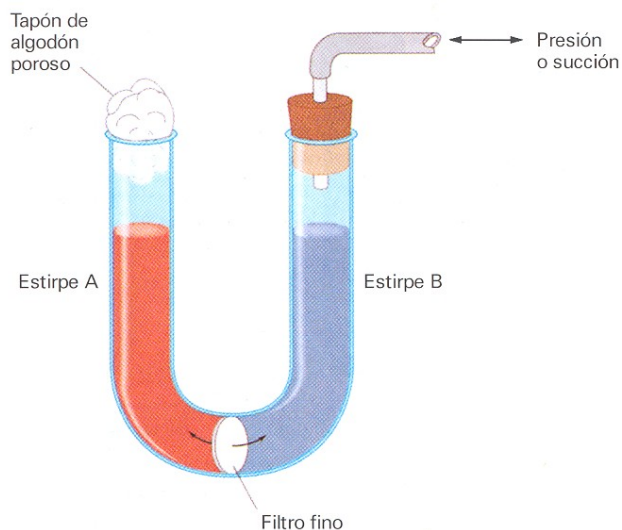


Figura 7-3. Experimento que demuestra la necesidad de contacto físico entre las células bacterianas para que tenga lugar la recombinación genética. Una suspensión de una estirpe bacteriana incapaz de sintetizar ciertos nutrientes se coloca en uno de los brazos del tubo con forma de U. Otra estirpe incapaz genéticamente de sintetizar distintos metabolitos necesarios se coloca en el otro brazo. El líquido se transfiere entre los brazos mediante la aplicación de presión o succión, pero las células no pasan a través del filtro central. Tras varias horas de incubación, se siembran las células, pero no crecen colonias en el medio mínimo.

de cada brazo para averiguar si habían aparecido células capaces de crecer en el medio mínimo y no encontró ninguna. En otras palabras, el *contacto físico* entre las dos estirpes era imprescindible para que se obtuvieran células silvestres. Parecía que se estaba produciendo algún tipo de transferencia génica y que se estaban obteniendo recombinantes genéticos reales.

El descubrimiento del factor de fertilidad (F)

En 1953, William Hayes determinó que la transferencia genética ocurría en una sola dirección en los tipos de cruzamientos que realizaba. Por tanto, la transferencia de material genético en *E. coli* no es recíproca. Una célula actúa como donante y la otra célula como receptora. Al principio, este tipo de transferencia unidireccional de genes se equiparó a la existencia de diferencias sexuales, denominando «macho» al donante y «hembra» a la receptora. No obstante, este tipo de transferencia génica no es una verdadera reproducción sexual. En el caso de la **transferencia genética bacteriana**, un organismo recibe información genética de una célula **donante**, y la célula **receptora** cambia en función de la información recibida. En el caso de la **reproducción sexual**, los dos organismos donantes participan igualmente (o casi igualmente) en la formación de un organismo nuevo y sólo en casos excepcionales cualquiera de los donantes experimenta algún cambio.

COROLARIO

La transferencia de material genético en *E. coli* no es recíproca. Una de las dos células actúa como donante y la otra como receptora.

Pérdida y recuperación de la capacidad de transferir. Hayes descubrió casualmente una variante de su estirpe donante original que cuando se cruzaba con la estirpe receptora no producía recombinantes. Aparentemente, las células del tipo donante habían perdido la capacidad de transferir material genético y se habían convertido en células de tipo receptor. Al analizar esta variante donante «estéril», Hayes se dio cuenta de que *E. coli* podía perder y recuperar su fertilidad (capacidad de actuar como donante) con relativa facilidad. Hayes sugirió que la capacidad para actuar como donante era una propiedad hereditaria conferida por el **factor de fertilidad (F)**. Las estirpes portadoras de F son capaces de donar

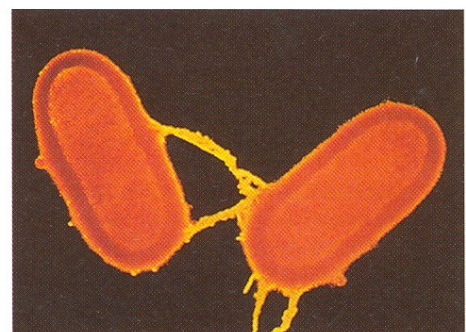


Figura 7-4. Las bacterias transfieren plásmidos (círculos de DNA), mediante conjugación. Una célula donante extiende una o más proyecciones (pili) que se adhieren a la célula receptora y la atraen para unirse a ella. (Oliver Meckes/MPI-Tübingen, Photo Researches.)

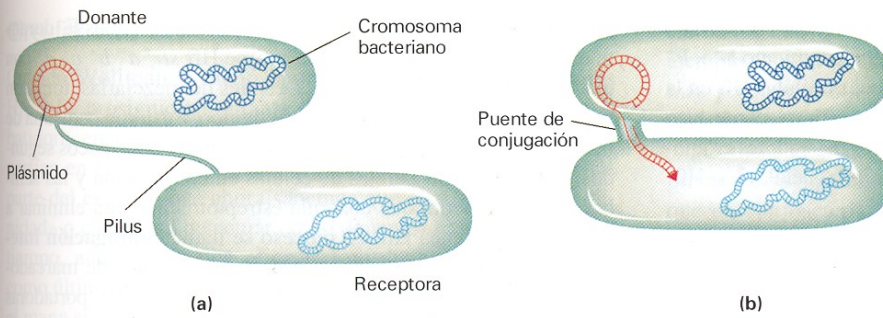


Figura 7-5. (a) Un pilus une a las dos bacterias durante la conjugación. (b) Después se forma un puente (básicamente un poro) entre las dos células. A continuación, una cadena de DNA del plásmido pasa a la bacteria receptora, y a partir de cada cadena sencilla se forma una doble.

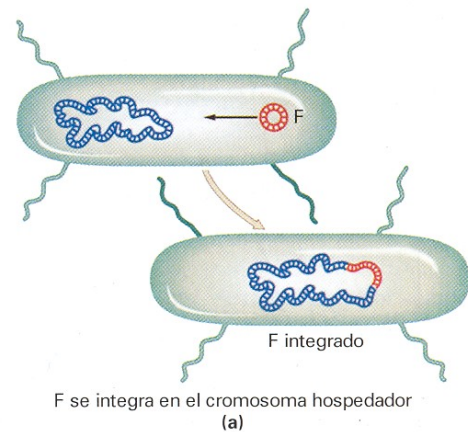
alelos y se designan F^+ . Las estirpes carentes de F no pueden donar alelos, siendo las receptoras. Tales estirpes se designan F^- .

Transferencia del factor F durante la conjugación. Hayes observó que los genotipos recombinantes para los genes marcadores aparecían con una frecuencia relativamente baja en los cruzamientos bacterianos, si bien el factor F parecía transmitirse muy eficazmente durante el contacto físico o **conjugación**. Parecía haber algún tipo de «transferencia infecciosa» del factor F. Ahora sabemos mucho más sobre el proceso de conjugación y sobre el factor F, que es un tipo de plásmido que se puede replicar en el citoplasma de modo independiente del cromosoma hospedador. Las Figuras 7-4 y 7-5 muestran cómo las bacterias transfieren plásmidos del tipo del factor F. El plásmido F dirige la síntesis de pili, unas proyecciones que inician el contacto con la célula receptora (Fig. 7-4), adhiriéndose a ella y permitiendo al DNA de F pasar a la célula receptora a través de un poro. Se transfiere una de las cadenas de DNA de F y luego la replicación del DNA restaura la cadena complementaria tanto en el donante como en el receptor. Esta replicación tiene como resultado que permanezca una copia de F en el donante y aparezca otra en el receptor, como muestra la Figura 7-5.

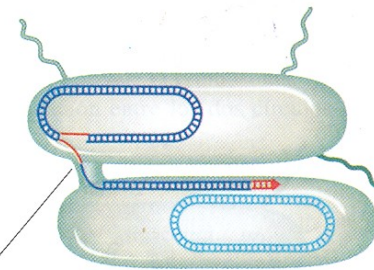
Las estirpes Hfr

Las investigaciones dieron un giro muy importante cuando Luca Cavalli-Sforza obtuvo una nueva clase de células a partir de una estirpe F^+ . Al cruzarla con células F^- , esta nueva estirpe producía recombinantes para marcadores genéticos con una frecuencia 1000 veces superior a la observada en una estirpe F^+ normal. Cavalli-Sforza la denominó estirpe Hfr (del inglés, *high frequency of recombination*) para indicar una alta frecuencia de recombinación. En los cruzamientos $Hfr \times F^-$, prácticamente ninguno de los parentales F^- se convertía en F^+ o en Hfr. Esto contrasta con los cruzamientos $F^+ \times F^-$, en los cuales una gran proporción de parentales F^- se convierten en F^+ por la transferencia del factor F. La Figura 7-6 ilustra este concepto. Resultó aparente que una estirpe Hfr es el resultado de la integración del factor F en el cromosoma, como indica la Figura 7-6a.

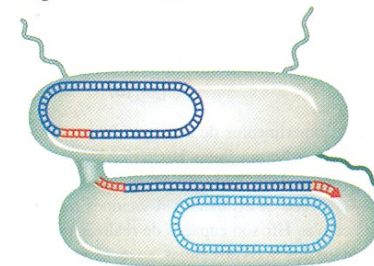
Ahora bien, durante la conjugación entre una célula Hfr y una F^- , una parte del cromosoma de la Hfr se transfiere junto con F. La rotura aleatoria del fragmento cromosómico interrumpe la transferencia antes de que se haya transferido el cromosoma completo. El fragmento cromosómico transferido puede entonces recombinar con el cromosoma de la célula receptora. Claramente,



F se integra en el cromosoma hospedador (a)



Se transfiere una sola cadena de F, junto con una copia de parte del cromosoma hospedador, a una célula receptora, en la cual se sintetiza la segunda cadena de DNA.



Una copia del cromosoma hospedador con F integrado (generada por replicación) permanece en la célula donante tras la replicación de la otra cadena sencilla. (b)

Figura 7-6. Transferencia de marcadores cromosómicos de *E. coli* mediada por F. (a) En ocasiones, el factor F libre se integra en el cromosoma de *E. coli*. (b) Cuando el factor F integrado se transfiere a otra célula de *E. coli* durante la conjugación, se lleva junto a él cualquier segmento de DNA de *E. coli* adyacente, transfiriendo así marcadores cromosómicos del hospedador a una nueva célula.

el bajo nivel de transferencia de marcadores genéticos observado por Lederberg y Tatum (véase Fig. 7-2) en el cruzamiento $F^+ \times F^-$ se puede explicar por la presencia de unas pocas células Hfr en la población. Cuando estas células se aíslan y purifican, como hizo Cavalli por primera vez, se transfieren entonces marcadores cromosómicos con alta frecuencia, debido a que todas las células son Hfr.

Determinación del ligamiento mediante conjugación interrumpida

La naturaleza exacta de las estirpes Hfr quedó establecida en el año 1957, cuando Elie Wollman y François Jacob estudiaban el

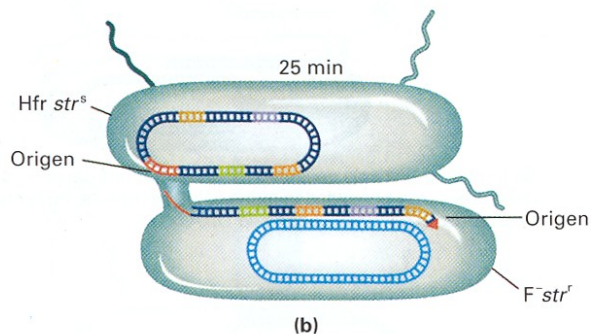
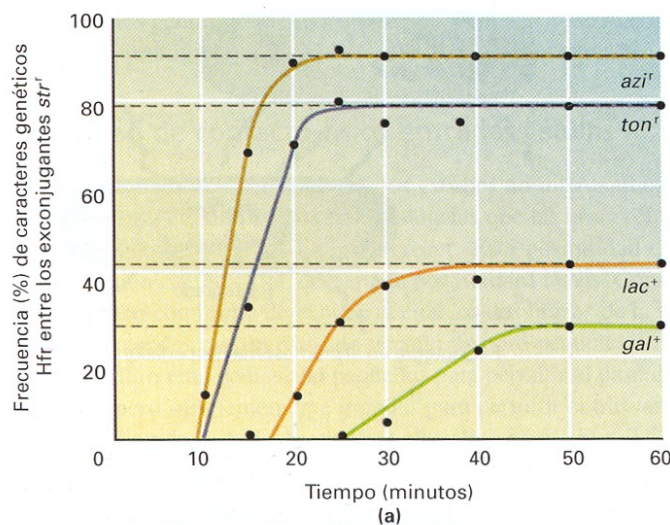


Figura 7-7. Experimentos de conjugación interrumpida con *E. coli*. Se cruzan células $F^- str^r$ con células $Hfr str^s$. Las células F^- tienen una serie de mutaciones (indicadas por los marcadores genéticos *azi*, *ton*, *lac* y *gal*) que les impiden llevar a cabo determinadas reacciones metabólicas. Por el contrario, las células Hfr son capaces de realizar todas estas reacciones. Tras la mezcla de los dos tipos de células, se recogen muestras a distintos tiempos, se disgregan las células en una batidora, para interrumpir la conjugación entre ellas, y se siembran en un medio con estreptomycin. El antibiótico elimina las células Hfr, pero permite el crecimiento de las células F^- , que son analizadas para comprobar si son capaces de llevar a cabo los cuatro pasos metabólicos. (a) Gráfica que muestra la frecuencia de recombinantes para cada marcador metabólico con respecto al tiempo transcurrido de apareamiento antes de la interrupción. La transferencia del alelo donante para cada paso metabólico depende del tiempo que se deja transcurrir la conjugación. (b) Representación esquemática de la transferencia de marcadores a lo largo del tiempo (Parte a modificada de E. L. Wollman, F. Jacob y W. Hayes, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 21, 1956, 141.)

patrón de transmisión de genes de células Hfr a células F^- durante un cruzamiento. Cruzaron una estirpe $Hfr str^s a^+ b^+ c^+ d^+$ con una estirpe $F^- str^r a^- b^- c^- d^-$. Después de mezclarlas, tomaron muestras a intervalos específicos de tiempo. Pusieron cada una de las muestras en una batidora de cocina durante unos pocos segundos para separar las parejas de células en conjugación y las sembraron en un medio que contenía estreptomycin para eliminar a las células donantes Hfr. El proceso se llama **conjugación interrumpida**. A continuación, analizaron la presencia de marcadores del donante en las células str^r . Aquellas células str^r portadoras de marcadores del donante han debido participar en el proceso de conjugación y se denominan **exconjugantes**. La Figura 7-7a muestra una gráfica de los resultados; *azi^r*, *ton^r*, *lac⁺* y *gal⁺* corresponden a $a^+ b^+ c^+$ y d^+ en nuestra descripción general del experimento. La Figura 7-7b ilustra la transferencia de los marcadores.

Lo más sorprendente de estos resultados es que cada uno de los alelos del donante apareció por primera vez en los receptores F^- en un momento concreto tras el comienzo de la conjugación, y en un orden característico. Además, el porcentaje máximo de células portadoras de un alelo donante determinado era menor para aquellos marcadores del donante que entraban más tarde. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, Wollman y Jacob concluyeron que la transferencia de los genes comienza en un punto fijo del cromosoma donante, denominado **origen (O)**, y continúa de manera lineal.

COROLARIO

El cromosoma de la estirpe Hfr, que originalmente es circular, se desenrolla y se transfiere a la célula F^- de modo lineal. La apertura del cromosoma y su transferencia comienzan en un punto concreto situado en un extremo del factor F integrado, denominado origen (O). Cuanto mayor es la distancia entre un gen y O, más tarde se transfiere a la célula F^- ; es muy probable que el proceso de transferencia cromosómica se interrumpa antes de que se transfieran los genes más alejados.

Wollman y Jacob se dieron cuenta de que sería fácil construir mapas de ligamiento a partir de los experimentos de conjugación interrumpida utilizando como medida de «distancia» el tiempo que tarda en entrar un alelo del donante después de que se haya iniciado la conjugación. La unidad de distancia en este caso es el minuto. De modo que, si un alelo donante b^+ entra en la célula F^- 10 minutos después que a^+ , entonces a^+ y b^+ están separados por 10 unidades (Fig. 7-8). Como en el caso de los mapas basados en frecuencias de recombinación, estos mapas de ligamiento son puramente interpretaciones genéticas, pues en aquellos tiempos no se conocía la base física del proceso.

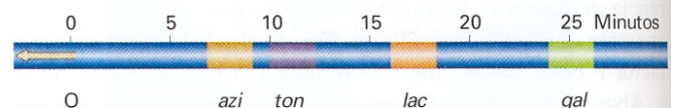
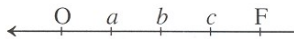


Figura 7-8. Mapa cromosómico basado en los datos de la Figura 7-7. Puede construirse un mapa de ligamiento del cromosoma de *E. coli* a partir de experimentos de conjugación interrumpida, utilizando el tiempo en que empieza a aparecer cada alelo donante tras el inicio de la conjugación. La unidad de distancia es el minuto. La flecha hacia la izquierda indica la dirección de la transferencia de los alelos del donante.

Circularidad del cromosoma e integración de F

Cuando Wollman y Jacob permitieron que los cruzamientos Hfr x F⁻ prosiguieran durante dos horas antes de tratar con la batidora, encontraron que algunos de los exconjugantes se convertían en Hfr. En otras palabras, una parte importante de F (la parte del extremo que ahora sabemos que confiere la «masculinidad» o capacidad de actuar como donante) se transmite con el tiempo, aunque con una eficacia muy baja y, aparentemente, como último elemento del «cromosoma» lineal. Ahora, tenemos el mapa siguiente, en el que la flecha indica el proceso de transferencia, que empieza en O:



Sin embargo, cuando se construyeron mapas de ligamiento por conjugación interrumpida y análisis de los tiempos de entrada a partir de estirpes Hfr aisladas independientemente, se observaron diferencias de una estirpe a otra.

Estirpe Hfr

H	O thr pro lac pur gal his gly thi F
1	O thr thi gly his gal pur lac pro F
2	O pro thr thi gly his gal pur lac F
3	O pur lac pro thr thi gly his gal F
AB 312	O thi thr pro lac pur gal his gly F

A simple vista, parece haber una reorganización al azar de los genes. Sin embargo, existe un patrón; los genes no ocupan posiciones aleatorias en cada estirpe. Por ejemplo, observe que en todos los casos el gen *his* está situado entre *gal* y *gly*. Esto es aplicable a cualquiera de los genes, a menos que aparezca en uno de los extremos del mapa de ligamiento. El orden de transferen-

cia de los marcadores no es constante. En dos estirpes Hfr, por ejemplo, el gen *his* se transfiere antes que el gen *gly* (*his* está más próximo a O), pero en tres de las estirpes, el gen *gly* se transfiere antes que *his*.

¿Cómo podemos explicar estos resultados? Allan Campbell propuso una hipótesis sorprendente para la época: supongamos que en una bacteria masculina F⁺, el factor F es un elemento citoplásmico pequeño (y, por tanto, se transfiere fácilmente a una célula F⁻ durante la conjugación). Si el cromosoma de la bacteria F⁺ fuera circular, cualquiera de los cromosomas lineales Hfr podrían generarse simplemente por inserción de F en el círculo, en la posición y la orientación adecuadas (Fig. 7-9).

De esta hipótesis se derivan varias conclusiones (confirmadas posteriormente)

1. La orientación en la que se integra F determina la polaridad del cromosoma Hfr, como se indica en la Figura 7-9a.
2. Un extremo del factor F integrado es el **origen**, donde comienza la transferencia del cromosoma Hfr; el **término**, en el otro extremo de F, no se transfiere, a menos que todo el cromosoma lo hubiera hecho antes. Como el cromosoma se rompe con frecuencia antes de transferirse por completo, y como lo que confiere la masculinidad es el término de F, sólo una pequeña proporción de las células receptoras se convierten en células masculinas.

¿Cómo puede explicarse entonces la integración de F? Wollman y Jacob propusieron que algún tipo de recombinación entre F y el cromosoma de la célula F⁺ generaría el cromosoma Hfr. Campbell contribuyó con una brillante aportación a esta idea. Propuso que si F, como el cromosoma, fuera circular, un hecho de recombinación entre los dos círculos produciría un

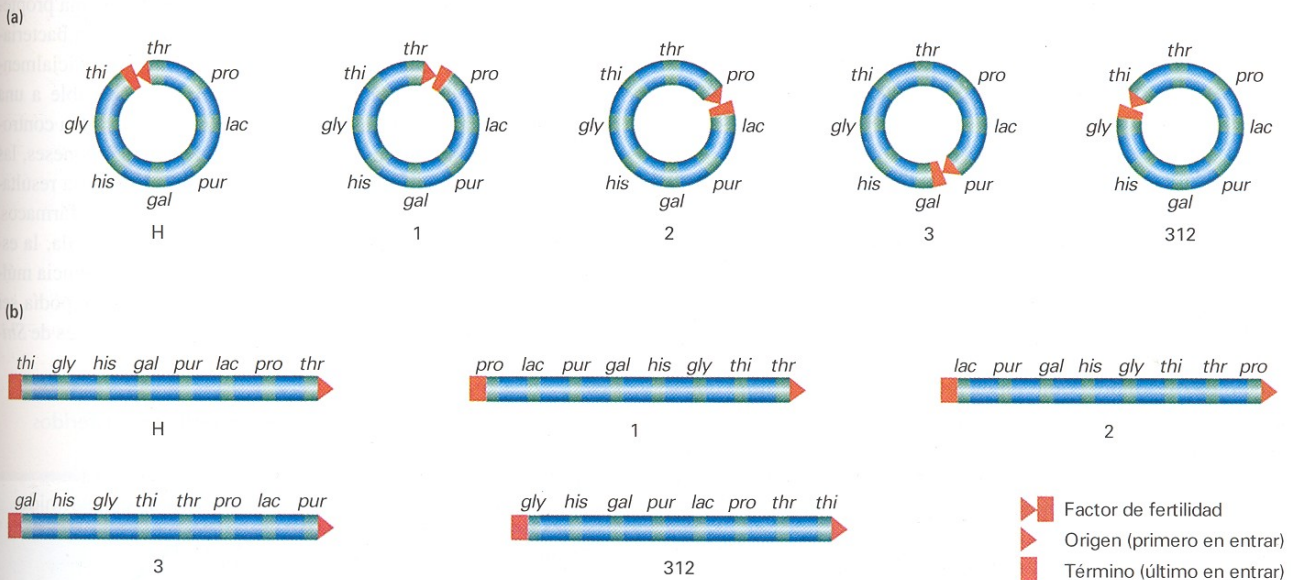


Figura 7-9. Circularidad del cromosoma de *E. coli*. (a) Mediante el uso de diferentes estirpes Hfr (H, 1, 2, 3, 312) que contienen el factor de fertilidad integrado en diferentes sitios del cromosoma y en distinta orientación, los experimentos de conjugación interrumpida indican que el cromosoma es circular. Se muestra el punto de movilización (origen) de cada estirpe. (b) Orden lineal de transferencia de marcadores de cada estirpe Hfr; las puntas de flecha indican el origen y la dirección de la transferencia.

Factor de fertilidad
 Origen (primero en entrar)
 Término (último en entrar)

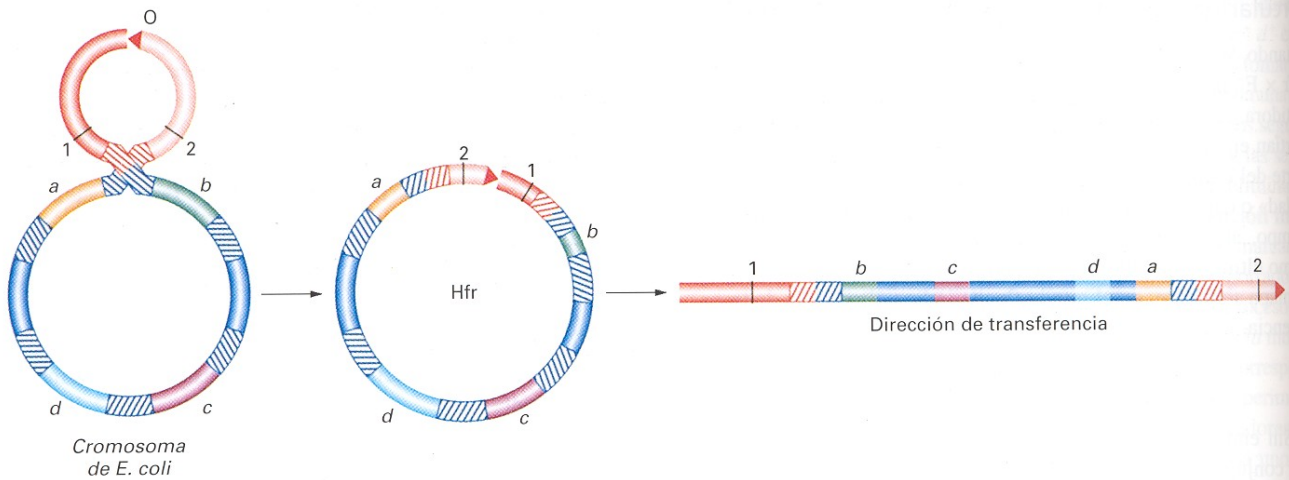


Figura 7-10. Integración del factor F en el cromosoma de *E. coli* mediante recombinación. Se muestran los marcadores hipotéticos de F 1 y 2 para indicar la dirección de la inserción. El origen (O) es el punto de movilización en el cual comienza la integración; la región de apareamiento es homóloga a una región del cromosoma de *E. coli*; *a-d* son los genes que representan el cromosoma de *E. coli*. Los genes sexuales de F son responsables del fenotipo F⁺. Las regiones de apareamiento (rayadas) son idénticas en el plásmido y el cromosoma, y derivan de unos elementos móviles denominados secuencias de inserción (véase Cap. 20). En este ejemplo, la célula Hfr generada por la inserción de F transferiría sus genes en el orden *a, d, c, b*. ¿Cuál sería el orden de transferencia si F se insertara en los demás sitios homólogos?

único círculo de mayor tamaño en el que F quedaría integrado (Fig. 7-10).

Suponga ahora que F está constituido por tres regiones diferentes, como se indica en la Figura 7-10. Si el cromosoma bacteriano tuviera varias regiones homólogas que pudieran emparejarse con la región de apareamiento de F, podrían generarse fácilmente distintos cromosomas Hfr por recombinación en esos sitios.

La circularidad del cromosoma y del factor F parecían inicialmente conceptos bastante inverosímiles, inferidos únicamente a partir de datos genéticos; la confirmación de su realidad física llegó sólo algunos años más tarde. El modelo de integración de recombinación directa también fue confirmado posteriormente.

El factor de fertilidad existe por tanto en dos estados: (1) en estado de plásmido, como elemento citoplásmico F libre que se transfiere con facilidad a las células receptoras F⁻, y (2) en estado integrado, como parte de un cromosoma circular que únicamente se transfiere en momentos tardíos de la conjugación. El término **episoma** (literalmente, «cuerpo adicional») fue acuñado para designar a una partícula genética que presenta esos dos estados característicos. Una célula portadora de F en estado libre se denomina F⁺, una célula con F en estado integrado se denomina Hfr, y una célula sin F se denomina F⁻. En la actualidad, el término **plásmido** se emplea para cualquier elemento circular en el citoplasma con capacidad de replicación autónoma, y el término «episoma» se usa en raras ocasiones.

Factores R

En los años 50 se descubrió en hospitales japoneses una propiedad espantosa de las bacterias patógenas. La disentería bacteriana está causada por una bacteria del género *Shigella*. Inicialmente, se había comprobado que esta bacteria era sensible a una amplia gama de antibióticos, que fueron empleados para controlar la enfermedad. Sin embargo, en los hospitales japoneses, las estirpes de *Shigella* aisladas de enfermos con disentería resultaron ser resistentes simultáneamente a muchos de estos fármacos, incluyendo la penicilina, la tetraciclina, la sulfanilamida, la estreptomycinina y el cloranfenicol. Este fenotipo de resistencia múltiple se heredaba como un paquete genético único, y podía ser transmitido de manera infecciosa, no sólo a otras estirpes de *Shi-*

CUADRO 7-2. Determinantes genéticos transferidos por varios plásmidos

Característica	Ejemplos de plásmido
Fertilidad	F, R1, Col
Producción de bacteriocinas	Col E1
Resistencia a metales pesados	R6
Producción de enterotoxinas	Ent
Metabolismo del alcanfor	Cam
Generación de tumores en plantas	T1 (en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)

gella sensibles, sino también a otras especies de bacterias relacionadas. Esta propiedad es extraordinariamente provechosa para la bacteria patógena, y sus consecuencias en la ciencia médica fueron terribles. En cambio, desde el punto de vista del genetista, esta situación es muy interesante. El vector que transportaba estas resistencias de una célula a otra resultó ser un elemento con capacidad de replicación autónoma, similar al factor F. Estos **factores R** (de «resistencia») se transfieren rápidamente por conjugación, tal como ocurre con la partícula F de *E. coli*.

De hecho, estos factores R fueron los primeros de muchos otros factores semejantes a F que se descubrieron más tarde. Se ha comprobado que estos elementos, que existen en el citoplasma en forma de plásmidos, llevan diferentes tipos de genes bacterianos. El Cuadro 7-2 muestra tan sólo algunas de las características que pueden ser transportadas por los plásmidos.

Mecanismos de transferencia

¿Muere una célula Hfr después de donar su cromosoma a una célula F⁻? La respuesta es no (salvo que el cultivo se trate con estreptomycin). El cromosoma Hfr se replica mientras se transfiere una cadena sencilla a la célula F⁻; esto garantiza que quede un cromosoma completo en la célula donante después de la conjugación. La cadena transferida se replica en la célula receptora, y los genes de la célula donante pueden incorporarse por recombinación al cromosoma de la célula receptora, generando una célula recombinante. Si esto no ocurre, los fragmentos de DNA transferidos se pierden en la célula receptora durante la división celular.

Suponemos que el cromosoma de la F⁻ es también circular, porque la célula receptora F⁻, cuando recibe el factor F de una

célula F⁺, se convierte inmediatamente en una célula F⁺, de la cual puede derivarse luego una célula Hfr.

Surge la imagen de un cromosoma circular desenrollando una copia de sí mismo, que es luego transferida de forma lineal a la célula F⁻. ¿Cómo se consigue la transferencia? Los estudios de microscopía electrónica muestran que las células Hfr y F⁺ poseen unas estructuras fibrosas, los **pili F**, que sobresalen de su pared celular, como muestra la Figura 7-4. Los pili F facilitan el contacto entre las células, durante el que ocurre la transferencia del DNA a través de poros de la célula F⁻.

El proceso de conjugación de *E. coli*

Revisemos ahora los distintos aspectos del proceso de conjugación de *E. coli* (Fig. 7-11) en cuanto a las diferencias entre las células F⁻, F⁺ y Hfr, ya que estas diferencias representan un resumen del ciclo.

Las estirpes F⁻ carecen del factor F y no pueden transferir DNA por conjugación. Sin embargo, actúan como receptoras del DNA transferido por las células F⁺ o Hfr durante la conjugación.

Las células F⁺ contienen el factor F en su citoplasma y, por tanto, pueden transferirlo de modo eficaz a las células F⁻ durante la conjugación.

Las células Hfr contienen el factor F integrado en el cromosoma bacteriano y no en el citoplasma.

Una estirpe F⁺ transfiere marcadores cromosómicos porque, en cualquier población de células F⁺, una pequeña proporción de células (aproximadamente 1 de cada 1000) se ha convertido en Hfr por integración de F en el cromosoma bacteriano. Como los

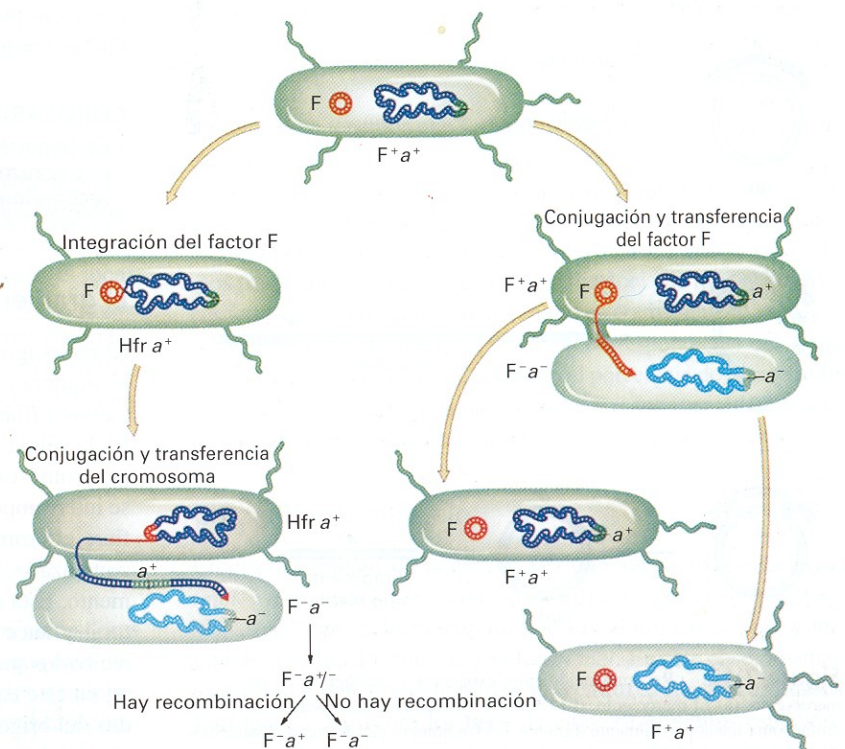


Figura 7-11. Resumen de los distintos acontecimientos que tienen lugar en el ciclo de conjugación de *E. coli*.

experimentos de conjugación suelen realizarse mezclando 10^7 - 10^8 células del donante y del receptor, la población contendrá varias células Hfr diferentes, derivadas de integraciones independientes de F en varios sitios distintos del cromosoma. Por tanto, cuando distintas células de la población transfieren marcadores cromosómicos, la transferencia comienza en distintos puntos del cromosoma. El resultado es la transferencia casi por igual de cualquier marcador cromosómico, aunque con baja frecuencia. Este tipo de transferencia mediada por células F^+ es la que Lederberg y Tatum observaron cuando descubrieron la transferencia génica en bacterias.

En una población F^+ , cada una de las células Hfr con un factor F integrado puede dar origen a una nueva estirpe Hfr si se aísla y se utiliza para iniciar un clon.

Las **estirpes Hfr** se originan a partir de un clon de células Hfr en las cuales ha tenido lugar una integración específica del factor F en el cromosoma bacteriano. Por tanto, todas las células de una estirpe Hfr determinada contienen una copia de F integrada exactamente en la misma posición del cromosoma.

En comparación con las células F^+ , en las que sólo una pequeña fracción de las células tiene F integrado en el cromosoma, las poblaciones Hfr transfieren marcadores cromosómicos a las células F^- con una frecuencia elevada. Además, en cualquier estirpe Hfr, los marcadores se transfieren desde un punto fijo y en un orden determinado. Esto también contrasta con lo que ocurre en las poblaciones de células F^+ , donde las células Hfr transfieren marcadores cromosómicos sin ningún orden particular, debido a que el factor F se integra en distintos puntos del cromosoma en diferentes células F^+ .

En un cruzamiento $Hfr \times F^-$, las células F^- no se convierten en Hfr o en F^+ , excepto en raras ocasiones, porque el cromosoma

Hfr casi siempre se rompe antes de que el término de F se transfiera a la célula F^- .

Recombinación entre genes marcadores después de la transferencia

Hasta ahora, sólo hemos estudiado el proceso de transferencia de información genética entre los individuos que participan en un cruzamiento. La existencia de esta transferencia se infiere a partir de la aparición de recombinantes entre los descendientes del cruzamiento. Sin embargo, antes de que se produzca un recombinante estable, los genes transferidos deben integrarse o incorporarse en el genoma del receptor mediante un mecanismo de intercambio. Consideraremos ahora algunas de las propiedades características de este intercambio.

El intercambio genético en procariotas no se produce entre los dos genomas completos (como ocurre en eucariotas); más bien, tiene lugar entre un genoma *completo*, el de la célula F^- , denominado **endogenote**, y otro *incompleto*, del donante, denominado **exogenote**. De hecho, lo que obtenemos es un diploide parcial o **merocigoto**. La genética bacteriana es la genética de la merocigosis. La Figura 7-12a presenta el esquema de un merocigoto.

Un solo hecho de recombinación no sería muy útil para generar recombinantes viables, porque el círculo se rompería y se formaría un cromosoma lineal extraño, parcialmente diploide (Fig. 7-12b). Para mantener intacto el círculo, debe producirse un número par de entrecruzamientos (Fig. 7-12c). El fragmento producido como resultado de este tipo de recombinación es sólo un genoma parcial, que generalmente se pierde durante el crecimiento celular posterior. Por tanto, no sobreviven los dos productos recíprocos de la recombinación (sólo lo hace uno de ellos). Un aspecto único del intercambio genético en bacterias es que en la mayoría de los casos podemos olvidarnos de los productos recíprocos de la recombinación.

COROLARIO

En la genética bacteriana se estudian los dobles entrecruzamientos y no se espera que aparezcan recombinantes recíprocos.

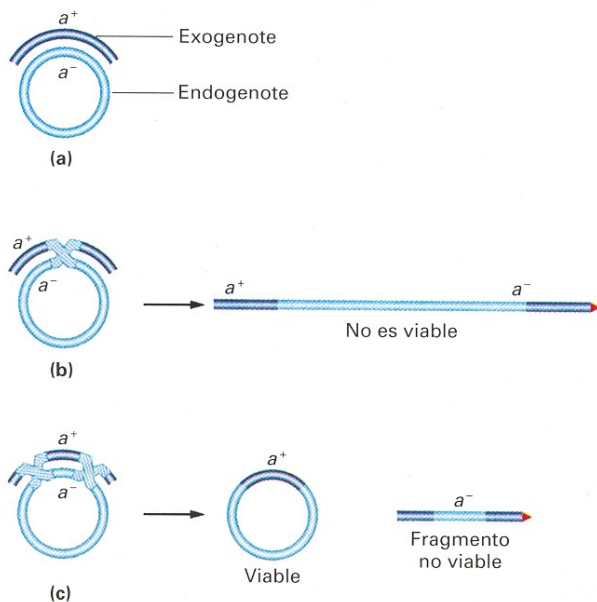
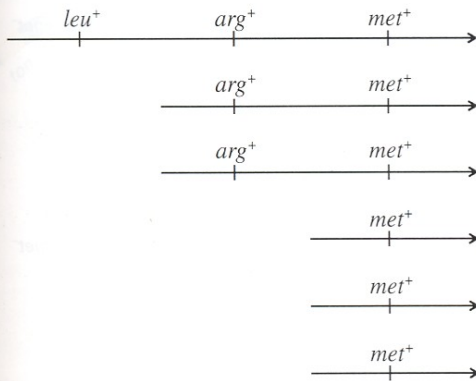


Figura 7-12. Recombinación entre exogenote y endogenote en un merocigoto. (a) El merocigoto. (b) Un único entrecruzamiento genera un cromosoma lineal parcialmente diploide. (c) Un número par de entrecruzamientos conduce a la formación de un círculo más un fragmento lineal.

El gradiente de transferencia

El merocigoto es un diploide parcial y algunos genes no llegan ni siquiera a participar en el proceso. Para apreciarlo mejor, volvamos a fijarnos en las consecuencias de la transferencia génica. En la célula receptora, normalmente, sólo aparece un fragmento del cromosoma donante, debido a que el proceso de conjugación se interrumpe espontáneamente, de manera que rara vez se transfiere el cromosoma completo. Una vez que la transferencia ha comenzado, la rotura espontánea puede ocurrir en cualquier momento. Esta situación genera un **gradiente de transferencia** natural y hace cada vez menos probable que la célula receptora reciba los marcadores genéticos más tardíos («tardíos» se refiere, en este caso, a los marcadores que están cada vez más alejados del origen y se transfieren, por tanto, más tarde). Por ejemplo, en un cruzamiento en el que la estirpe Hfr donante transfiera

los marcadores en el orden *met*, *arg*, *leu*, se espera una distribución de fragmentos como la que se representa a continuación:



Observe que hay muchos más fragmentos que contienen el locus *met* que el locus *arg*, y que el locus *leu* sólo está presente en un fragmento. Es sencillo ver que cuanto más cerca está un marcador del origen, más probable será que se transfiera durante la conjugación.

El concepto de gradiente de transferencia es idéntico al descrito anteriormente para los experimentos de conjugación interrumpida, exceptuando que en este caso estamos permitiendo la interrupción natural del proceso en vez de interrumpirlo mecánicamente.

Determinación del orden de los genes por gradiente de transferencia

Podemos servirnos del gradiente natural de transferencia para ordenar los marcadores genéticos, siempre que seleccionemos un marcador temprano que entre antes que los marcadores que deseamos ordenar. Veamos cómo se lleva a cabo. Supongamos que empleamos una estirpe Hfr que transfiere los siguientes marcadores en el orden *met*, *arg*, *aro*, *his*. En un cruzamiento entre una estirpe Hfr que es *met+* *arg+* *aro+* *his+* *str^s* y una F⁻ que sea *met-* *arg-* *aro-* *his-* *str^r*, se seleccionan recombinantes que crezcan en medio mínimo sin metionina, pero con arginina, aminoácidos aromáticos e histidina, en presencia de estreptomina. En este caso estamos seleccionando recombinantes en las estirpes F⁻ que sean *met+* en un cruzamiento en el cual el locus *met* es el primer marcador que se transfiere. A continuación, podríamos estudiar la herencia de los otros marcadores presentes en la estirpe Hfr, comprobando su crecimiento en medio mínimo con suplementos y en ausencia de cada uno de los nutrientes requeridos. Un resultado típico sería:

- met+* = 100 %
- arg+* = 60 %
- aro+* = 20 %
- his+* = 4 %

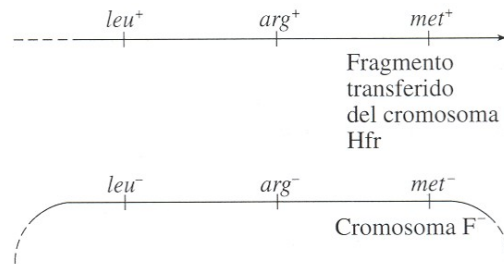
Observe que la frecuencia con la que se heredan los marcadores se corresponde con el orden de transferencia. Para que este método funcione, es crucial que se aplique a marcadores genéticos que entren después del marcador seleccionado, en este caso, después de *met*.

Cartografía de mayor resolución mediante frecuencias de recombinación en cruzamientos bacterianos

Los experimentos de conjugación interrumpida y el gradiente natural de transferencia ofrecen un vasto conjunto de datos de posiciones de los genes a lo largo de todo el mapa, pero se requieren otros métodos para obtener una mayor resolución en la cartografía de marcadores cercanos. En este apartado consideraremos una forma de abordar el problema, empleando las frecuencias de recombinación para medir el ligamiento.

Los primeros intentos de elaborar mapas genéticos a partir de experimentos de conjugación se vieron dificultados por el desconocimiento de que sólo se transfieren fragmentos del cromosoma y de que el gradiente de transferencia produce una tendencia hacia la incorporación de los marcadores más cercanos al origen. Para medir el ligamiento y dar algún significado a los cálculos de las distancias de mapa, es necesario establecer una situación en la que cada marcador tenga la misma oportunidad de ser transferido, de manera que las frecuencias de recombinación dependan sólo de la distancia entre los genes de interés.

Supongamos que tenemos que cartografiar tres marcadores: *met*, *arg* y *leu*. Si el orden es *met*, *arg* y *leu*, y *met* es el primero que se transfiere y *leu* el último, entonces deseáramos obtener una situación como la representada en el diagrama inferior para calcular las distancias de mapa entre estos marcadores:



Simplemente tenemos que seleccionar el último marcador que entra, que en este caso es *leu* ¿Por qué? Porque si seleccionamos el último marcador tendremos la seguridad de que todas las células que recibieron fragmentos con el último marcador también recibieron los marcadores anteriores, es decir, *arg* y *met*, en los mismos fragmentos. Podemos calcular la distancia de mapa del modo clásico, donde la unidad de mapa (u.m.) es equivalente al porcentaje de entrecruzamientos en el intervalo correspondiente del mapa. En la práctica, esto se hace calculando el porcentaje de los recombinantes producidos por recombinación entre dos marcadores, entre el total de recombinantes producidos. Veamos un ejemplo.

Cruzamiento modelo

En el cruzamiento de la estirpe Hfr que acabamos de describir (*met+*, *arg+*, *leu+*, *str^s*) con una estirpe F⁻ de genotipo *met-*, *arg-*, *leu-*, *str^r*, seleccionaríamos los recombinantes *leu+* y luego buscaríamos los marcadores *arg* y *met*. En este caso, los marcadores *arg* y *met* se denominan **marcadores no seleccionados**. La Figura 7-13 ilustra los tipos de entrecruzamientos esperados. Observe que se necesitan dos hechos de recombinación para in-

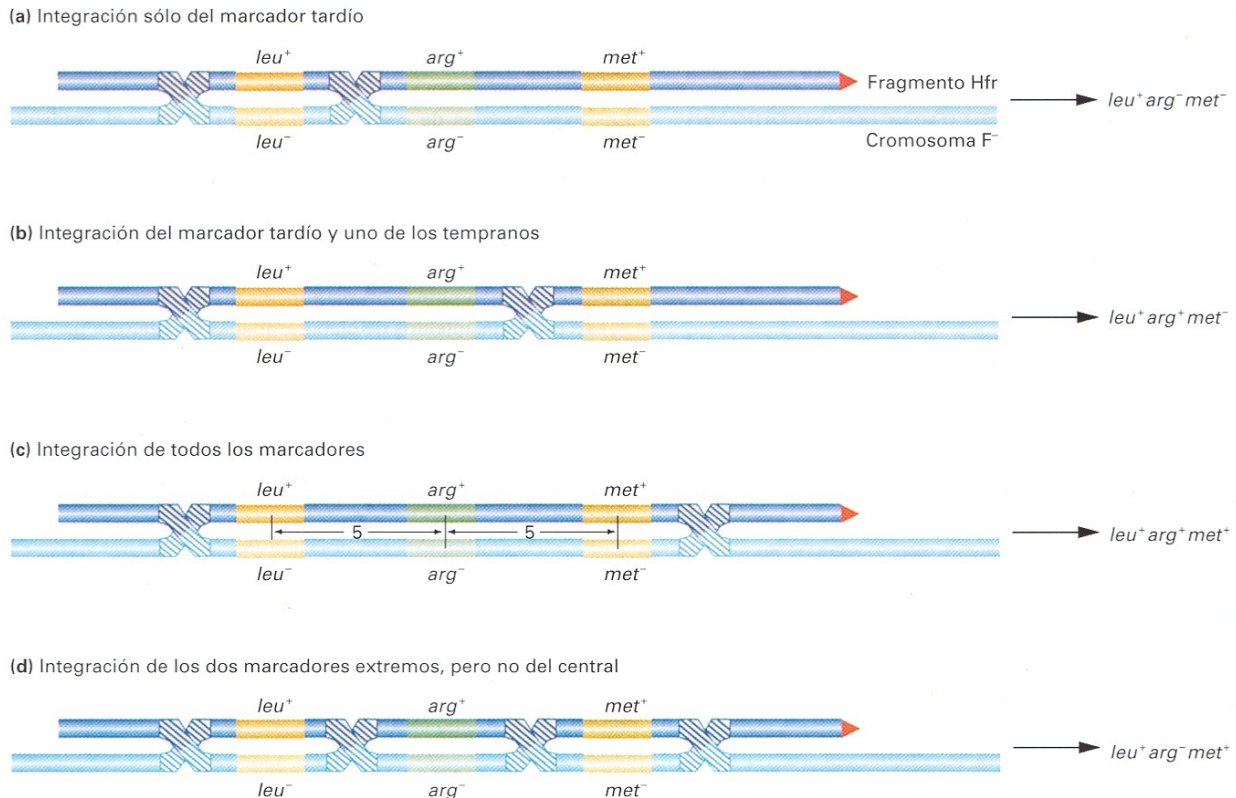


Figura 7-13. Incorporación de un marcador tardío en un cromosoma F^- de *E. coli*. Después del cruzamiento con una cepa Hfr, se selecciona el marcador leu^+ , que se transfiere tardíamente. Los marcadores tempranos (arg^+ y met^+) pueden ser o no incorporados, dependiendo del sitio donde ocurre la recombinación entre el fragmento Hfr y el cromosoma F^- . Como se indica en (c), se producirán entrecruzamientos en alguno de estos intervalos el 5% de las veces, que generarán recombinantes $leu^+ arg^- met^-$ (a) y $leu^+ arg^+ met^-$ (b). Los entrecruzamientos que ocurren fuera de estos intervalos pueden generar el recombinante $leu^+ arg^+ met^+$ (c). El recombinante $leu^+ arg^- met^+$ requiere dos entrecruzamientos adicionales (d).

corporar parte del fragmento entrante en el cromosoma F^- . Debe producirse un hecho de recombinación a cada lado del marcador seleccionado (leu). Así, en la Figura 7-13, un entrecruzamiento debe producirse a la izquierda del marcador leu y el otro a la derecha. Supongamos que la distancia en el mapa entre cada marcador es 5 u.m. (un 5% de recombinación). En un 5% del total de recombinantes leu^+ , el segundo entrecruzamiento ocurrirá entre arg y arg (Fig. 7-13a); en otro 5% de los casos, el segundo entrecruzamiento ocurrirá entre arg y met (Fig. 7-13b). Esperaríamos entonces que el 90% de los recombinantes leu^+ seleccionados fueran $arg^+ met^+$, ya que el segundo entrecruzamiento ocurre fuera del intervalo $leu-arg-met$ (Fig. 7-13c) en un 90% de los casos. También esperaríamos que un 5% de los recombinantes leu^+ fueran $arg^- met^-$, como resultado de un entrecruzamiento entre leu y arg , y que otro 5% de los recombinantes leu^+ fueran $arg^+ met^-$, producidos por recombinación entre arg y met . En realidad, simplemente estamos determinando el porcentaje de veces que el segundo entrecruzamiento ocurre en cada uno de los tres intervalos posibles.

En un cruzamiento como el descrito, hay una clase de recombinantes que requiere dos hechos de recombinación adicionales (Fig. 7-13d). En este caso, los recombinantes $leu^+ arg^- met^+$ necesitarían cuatro entrecruzamientos en lugar de dos. Estos recombinantes raramente se observan, debido a que su frecuencia se ve muy reducida en comparación con las otras dos clases.

Transferencia infecciosa de genes marcadores por episomas

El trabajo de Edward Adelberg llevó al descubrimiento de la transferencia de genes con alta frecuencia mediada por episomas. Cuando en 1959 inició sus estudios sobre recombinación, la estirpe Hfr concreta con la que trabajó producía células F^- , por lo que las frecuencias de recombinación no eran muy altas. Adelberg denominó F' a este factor de fertilidad concreto para distinguirlo del factor F normal, por las siguientes razones:

1. La estirpe F^+ portadora del factor F' volvía a convertirse en estirpe Hfr mucho más frecuentemente que las estirpes típicas F^+ .
2. F' siempre se integraba en la misma posición, dando lugar al cromosoma Hfr original. (Recuerde que las estirpes Hfr derivadas al azar de machos F^+ tienen los orígenes de transferencia en posiciones distintas).

¿Cómo podrían explicarse estas propiedades características de F' ? La respuesta llegó cuando se obtuvo otro factor F' a partir de una estirpe Hfr en la que el locus lac^+ se encontraba cerca del extremo terminal del cromosoma Hfr (se transfería muy tarde).

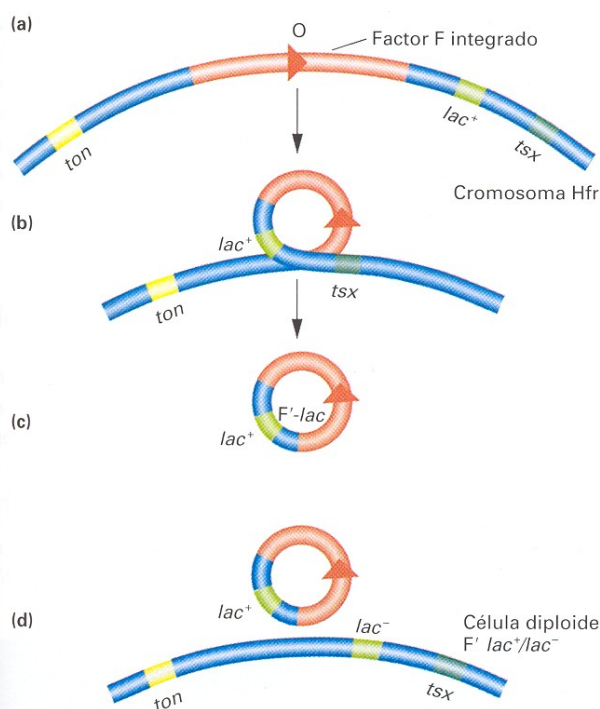


Figura 7-14. Formación y reintegración de un factor F', en este caso F' lac. (a) F aparece integrado entre los alelos ton y lac⁺ de una estirpe Hfr. (b y c) La escisión y separación errónea incluye al locus lac, produciendo una partícula F' lac a una estirpe receptora lac⁻. (d) La transferencia de la partícula F' lac a una estirpe receptora lac⁻ genera un diploide parcial F lac⁺/lac⁻. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

Utilizando esta estirpe Hfr lac⁺, François Jacob y Adelberg encontraron un derivado F⁺ que transfería lac⁺ a estirpes receptoras F⁻ lac⁻ con una frecuencia muy elevada. Además, las células receptoras que se comportaban como F⁺ lac⁺ producían en ocasiones células hijas F⁻ lac⁻ con una frecuencia de 1 × 10⁻³. Por tanto, el genotipo de los receptores parecía ser F lac⁺/lac⁻.

Ahora ya tenemos la pista: F' es un elemento citoplásmico que lleva parte del cromosoma bacteriano. De hecho, no es más que un factor F que ha integrado un fragmento del cromosoma de la célula hospedadora. En la Figura 7-14 se ilustra el proceso por el que se origina y se reintegra. Este factor F' concreto se conoce como F'-lac, porque el fragmento cromosómico incorporado contiene el gen lac. Se han aislado factores F' con muchos genes cromosómicos diferentes y se han denominado de una forma acorde. Por ejemplo, los factores F' portadores de gal o trp se conocen como F'-gal o F'-trp, respectivamente. Puesto que las células F lac⁺/lac⁻ presentan fenotipo Lac⁺, podemos deducir que lac⁺ es dominante sobre lac⁻. Como veremos más adelante, en el Capítulo 11, las relaciones de dominancia-recesividad entre alelos aportan una información muy útil a la hora de interpretar la función de un gen.

La diploidía parcial de segmentos específicos del genoma puede generarse utilizando un conjunto de F' originados a partir de estirpes Hfr. Las células F' se seleccionan determinando si hay transferencia infecciosa de genes normalmente tardíos de

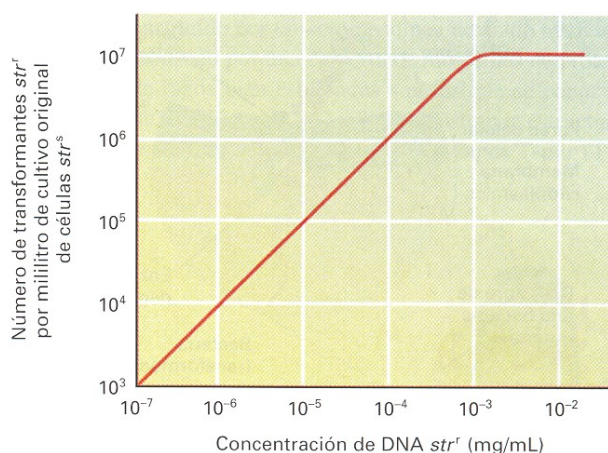


Figura 7-15. Transferencia genética de la resistencia a estreptomicina (str^r) a células de *E. coli* sensibles a estreptomicina (str^s). La obtención de transformantes str^r entre las células str^s depende de la concentración de DNA str^r utilizada. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

una estirpe Hfr específica. Algunas estirpes F' llevan fragmentos muy grandes (hasta una cuarta parte) del cromosoma bacteriano; si se utilizan marcadores adecuados, los merocigotos generados pueden ser utilizados en estudios de recombinación.

COROLARIO

Durante la conjugación entre un donante Hfr y un receptor F⁻, los genes del donante se transfieren linealmente a la célula F⁻ a través del cromosoma bacteriano, siendo el factor de fertilidad el último que se transfiere.

Durante la conjugación entre un donante F⁺ portador de un plásmido F' y un receptor F⁻, puede producirse la transferencia infecciosa de una parte concreta del genoma donante a la célula F⁻, por medio del plásmido. La parte que se transmite se encontraba originalmente al lado del locus F en la estirpe Hfr a partir de la que se originó la estirpe F⁺.

Transformación bacteriana

Algunas bacterias cuentan con otro método de transferencia de DNA y producción de recombinantes que no requiere conjugación. La conversión de un genotipo en otro por la introducción de DNA exógeno (es decir, fragmentos de DNA de una fuente externa) recibe la denominación de **transformación**. Este proceso fue descubierto en *Streptococcus pneumoniae*, en 1928, por Frederick Griffith. En 1944, Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty demostraron que el «principio transformante» era el DNA. Ambos resultados constituyen hitos históricos en la elucidación de la naturaleza molecular de los genes. Trataremos este trabajo con más detalle en el Capítulo 8.

Tras la demostración de que el DNA era el agente que determinaba el componente polisacárido de *S. pneumoniae*, se demostró la existencia de transformación para otros genes, tales como los que confieren resistencia a antibióticos (Fig. 7-15). El principio transformante, DNA exógeno, se incorpora al cromoso-

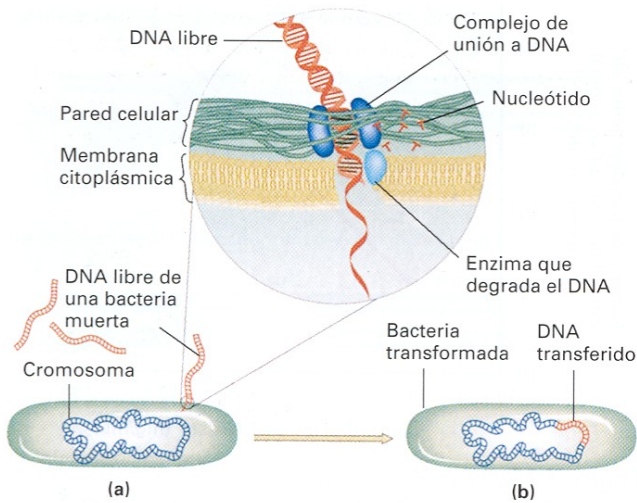


Figura 7-16. Una bacteria en el proceso de transformación (a) recoge DNA libre procedente de una célula bacteriana muerta. Complejos de unión a DNA localizados en la superficie de la bacteria incorporan el DNA (círculo ampliado) y las enzimas degradan una cadena de DNA hasta nucleótidos, mientras que la otra cadena se integra en el cromosoma de la bacteria (b). (Modificado de R. V. Miller, «Bacterial Gene Swapping in Nature.» Copyright © 1998, por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

ma bacteriano mediante un proceso de rotura e inserción análogo al descrito para los cruzamientos $Hfr \times F^-$ de la Figura 7-12. Sin embargo, observe que durante la *conjugación*, el DNA se transfiere desde una célula viva a otra mediante un contacto íntimo, mientras que en la *transformación*, la célula adquiere fragmentos aislados de DNA externo. La Figura 7-16 describe este proceso.

Análisis del ligamiento por transformación

La transformación ha sido un instrumento muy útil en varias áreas de la investigación con bacterias. Más adelante trataremos su aplicación en algunas de las técnicas de Ingeniería genética. En este apartado, examinaremos su utilidad en relación con la obtención de información de las relaciones de ligamiento.

Cuando se extrae DNA (el cromosoma bacteriano) para realizar experimentos de transformación, es inevitable que se produzca la ruptura parcial del DNA en fragmentos más pequeños. Si dos genes donantes están situados muy próximos en el cromosoma, existe una alta probabilidad de que ambos se transfieran en el mismo fragmento de DNA transformante y se produzca, por tanto, una **transformación doble**. Por el contrario, si los genes están muy separados en el cromosoma, lo más probable es que estén contenidos en segmentos transformantes diferentes y la frecuencia de transformantes dobles será igual al producto de las frecuencias de transformación de cada gen por separado. Por tanto, debe ser posible comprobar un estrecho ligamiento entre dos genes mediante el análisis de la desviación de la regla del producto.

Desgraciadamente, hay varios factores que complican la situación, de los cuales el más importante es que no todas las células de una población bacteriana se encuentran en estado de **competencia** para ser transformadas. Debido a que las transformaciones

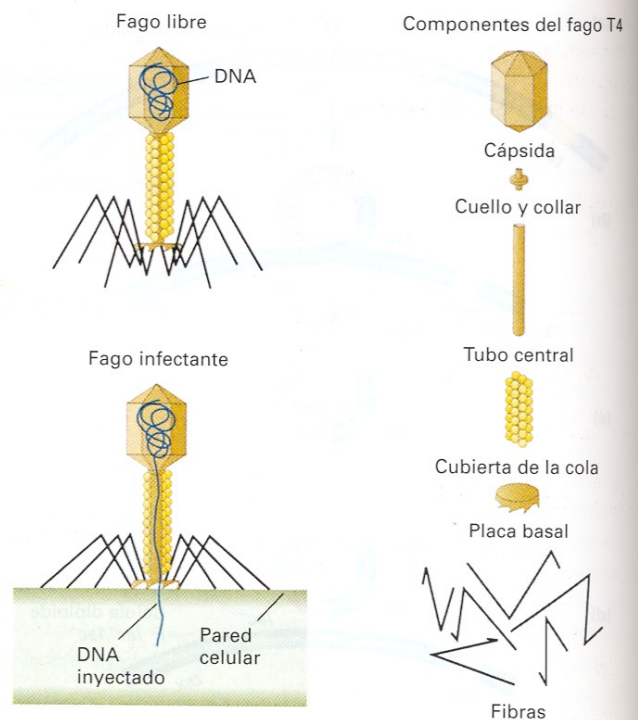


Figura 7-17. El fago T4, representado en su estado libre y en el momento de infectar a una célula de *E. coli*. Durante el proceso de infección, el fago inyecta su DNA dentro de la célula a través del hueco de la cola. En la parte derecha, el fago se ha desensamblado en sus diferentes componentes para mostrar su estructura tridimensional extraordinariamente organizada. (Modificado de R. S. Edgar y R. H. Epstein, «The Genetics of a Bacterial Virus». Copyright © 1965 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

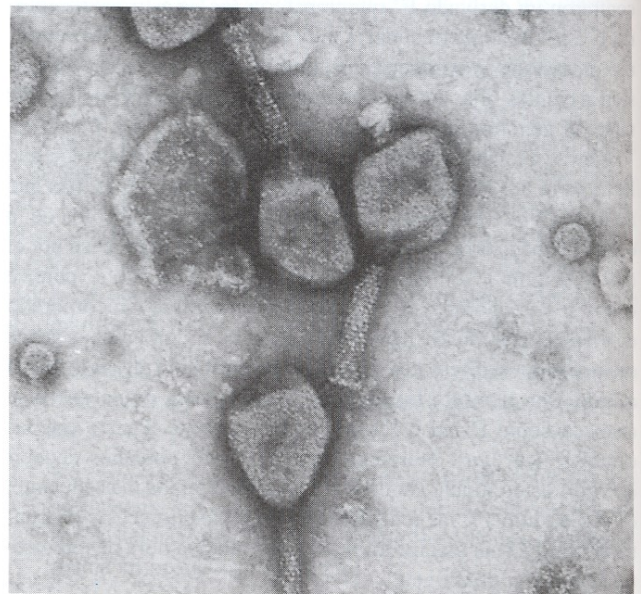


Figura 7-18. Ampliación del fago T4 de *E. coli* que muestra su estructura en detalle: obsérvese la cápsida, la cola y las fibras de la cola. El fago T4 fue empleado por Benzer en sus experimentos sobre la naturaleza del gen *rII* (de lisis rápida). (Fotografía de Jack D. Griffith.)

individuales se expresan como proporciones, el éxito de la regla del producto obviamente depende del tamaño absoluto de estas proporciones. Hay modos de calcular la proporción de células competentes, pero en este momento no es necesario que desviemos nuestra atención a este tema. Puede ampliar sus conocimientos sobre el análisis de ligamiento por transformación, resolviendo uno de los problemas que aparecen al final del capítulo, en el que se supone un 100% de competencia en las células receptoras.

Genética de bacteriófagos

En este apartado, describiremos cómo se realizan los cruzamientos con virus que infectan bacterias (fagos) y los experimentos que analizan minuciosamente la estructura fina del gen.

Infección de bacterias por fagos

La mayoría de las bacterias son susceptibles al ataque por bacteriófagos, que literalmente significa «comedores de bacterias».

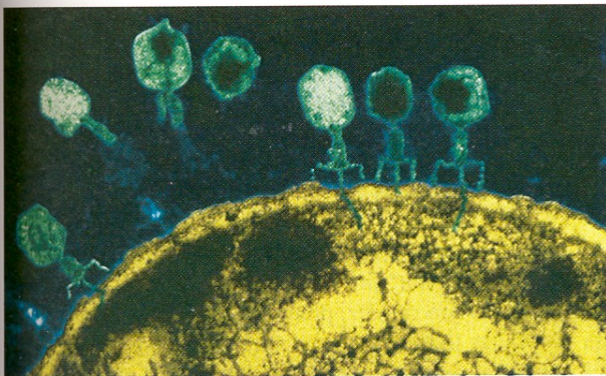


Figura 7-19. Micrografía de un bacteriófago adsorbiéndose a una bacteria e inyectando su DNA. (Dr. L. Caro/Science Photo Library, Photo Researches.)

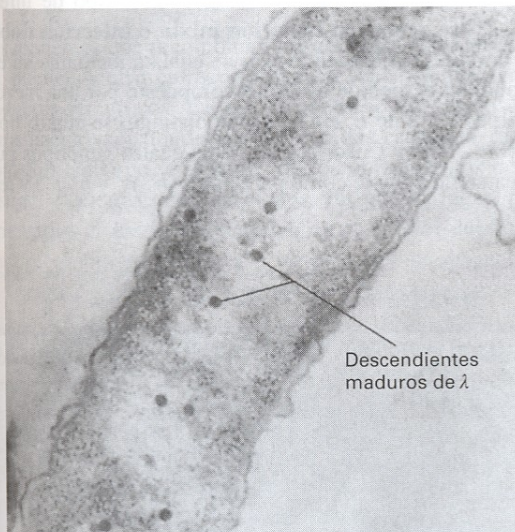


Figura 7-20. Partículas descendientes del fago λ madurando dentro de una célula de *E. coli*. (Jack D. Griffith.)

Un fago está constituido por un «cromosoma» de ácido nucleico (DNA o RNA) rodeado por una cubierta de moléculas de proteína. Una serie de fagos bien estudiados son los que se conocen como T1, T2, etc. Las Figuras 7-17 y 7-18 muestran la estructura de un fago perteneciente a la serie denominada **fagos T-par** (T2, T4, etc.)

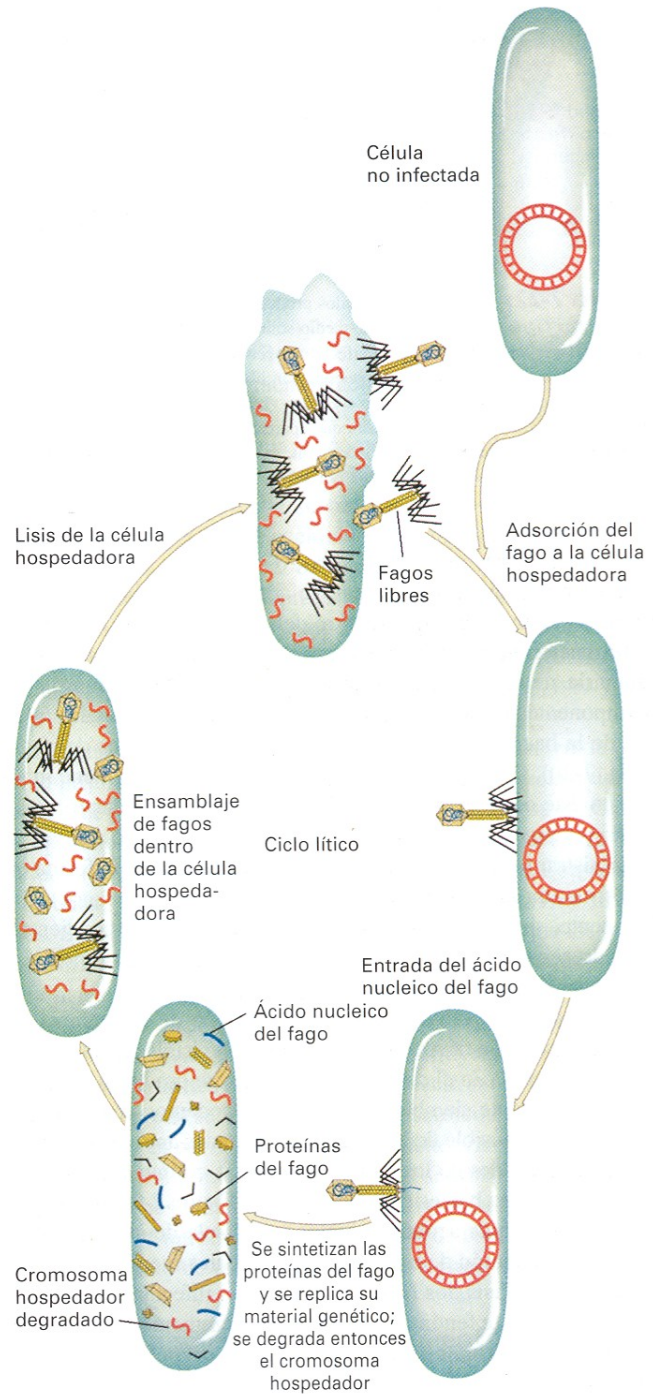


Figura 7-21. Ciclo lítico de un bacteriófago de transducción generalizada. (Modificado de J. Damell, H. Lodish, y D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*. Copyright © 1986 por W. H. Freeman and Company.)

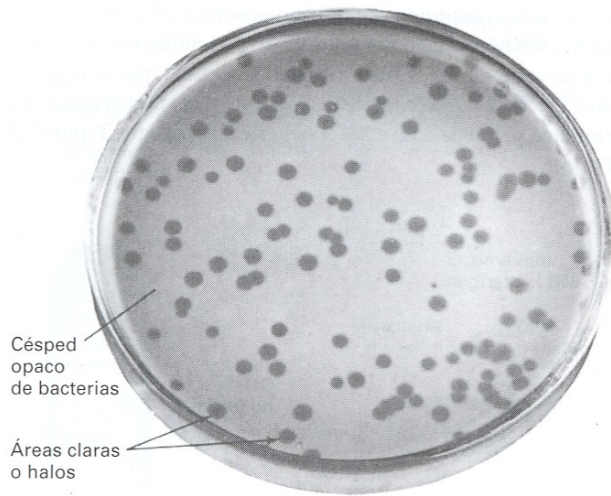
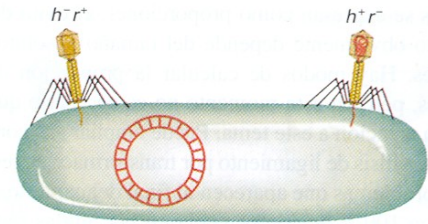


Figura 7-22. Aspecto de los halos producidos por un fago. Se extienden unos pocos fagos sobre una placa de medio sólido que contiene un césped de *E. coli* bien crecido. Cada fago infecta una célula bacteriana, dando lugar a 100 o más fagos descendientes que son liberados por lisis de la célula de *E. coli* y que a su salida infectan a células vecinas. Éstas, a su vez, sufren el mismo proceso, que continúa hasta que aparece una zona clara o halo, sobre el césped de bacterias. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 por W. H. Freeman and Company.)

Durante la infección, el fago se adsorbe a una bacteria e inyecta su material genético dentro del citoplasma (Fig. 7-19). La información genética del fago pasa entonces a controlar la maquinaria de la célula bacteriana, desconectando la síntesis de componentes bacterianos y redirigiendo los materiales de síntesis de la bacteria hacia la fabricación de componentes del fago (Fig. 7-20). (La utilización de la palabra *información* tiene interés en este contexto, ya que significa literalmente «dar forma». Y ése es precisamente el papel del material genético del virus: suministrar órdenes para crear formas. En este caso, la forma es la estructura elegantemente simétrica de los nuevos fagos). Finalmente, se libera un elevado número de fagos descendientes cuando se rompe la pared de la célula bacteriana. Este proceso de rotura se denomina **lisis**.

Pero ¿cómo podemos estudiar el fenómeno de la herencia en fagos, si éstos son tan pequeños que sólo son visibles al microscopio electrónico? En el caso de los fagos, no se producen colonias visibles mediante siembra en placa, pero podemos producir una manifestación visible de las bacterias infectadas aprovechando algunas propiedades de los fagos. Veamos las consecuencias de la infección de una bacteria por un fago. La Figura 7-21 nos muestra la secuencia de acontecimientos en el ciclo de infección que lleva a la liberación de los fagos descendientes fuera de la célula lisada. Tras la lisis, los fagos descendientes infectan a las bacterias vecinas. Este fenómeno produce un incremento exponencial del número de células lisadas. Quince horas después del comienzo de un experimento de este tipo, los efectos son detectables a simple vista, observándose un área clara, **calva** o **halo de lisis**, en el césped opaco de bacterias que crecen sobre la superficie de una placa con medio sólido (Fig. 7-22). Dependiendo del genoti-



Estirpe 1 de *E. coli*

Figura 7-23. Infección mixta de *E. coli* por dos fagos.

po del fago, estos halos pueden ser grandes o pequeños, claros o turbios, etc. Por tanto, la **morfología del halo** es un carácter del fago que puede ser objeto de análisis. Otro carácter fenotípico de los fagos que puede ser analizado genéticamente es el **espectro de hospedadores**, ya que los fagos pueden diferir en las estirpes bacterianas que infectan y lisan. Por ejemplo, algunas estirpes bacterianas son inmunes a la adsorción o a la inyección del material genético de ciertos fagos específicos.

Cruzamientos con fagos

¿Podemos cruzar dos fagos de la misma manera en que cruzamos dos estirpes bacterianas? Podemos ilustrar el proceso utilizando un cruzamiento entre fagos T2, estudiados originalmente por Alfred Hershey. Los genotipos de dos estirpes parentales son $h^- r^+$ y $h^+ r^-$. Los alelos corresponden a los siguientes fenotipos: h^- infecta a dos estirpes diferentes de *E. coli* (que podemos llamar estirpes 1 y 2); h^+ infecta exclusivamente a la estirpe 1; r^- lisa las células con rapidez, produciendo así halos grandes; y r^+ lisa las células lentamente, produciendo halos pequeños.

En el cruzamiento, se infecta la estirpe 1 de *E. coli* con los dos fagos parentales T2, en una relación de fagos:bacterias (denominada **multiplicidad de infección**) suficientemente alta para asegurar que una gran proporción de células sean infectadas simultáneamente por ambos tipos de fagos. Este tipo de infección (Fig. 7-23) se denomina **infección mixta** o **infección doble**. El lisado de fagos (la descendencia) se analiza mediante su extensión sobre un césped de bacterias compuesto por una mezcla de las estirpes 1 y 2 de *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro tipos de halos (Fig. 7-24 y Cuadro 7-3). Estos cuatro genotipos pueden clasificarse fácilmente como parentales ($h^- r^+$ y $h^+ r^-$) y recom-

CUADRO 7-3. Tipos de halos producidos por los fagos descendientes del cruzamiento $h^- r^+ \times h^+ r^-$

Fenotipo	Genotipo inferido
Claro y pequeño	$h^- r^+$
Turbio y grande	$h^+ r^-$
Turbio y pequeño	$h^+ r^+$
Claro y grande	$h^- r^-$

Nota: la claridad se debe al alelo h^- , que permite la infección de las dos estirpes bacterianas que constituyen el césped; la turbidez se debe al alelo h^+ , que limita la infección a las células de la estirpe 1.

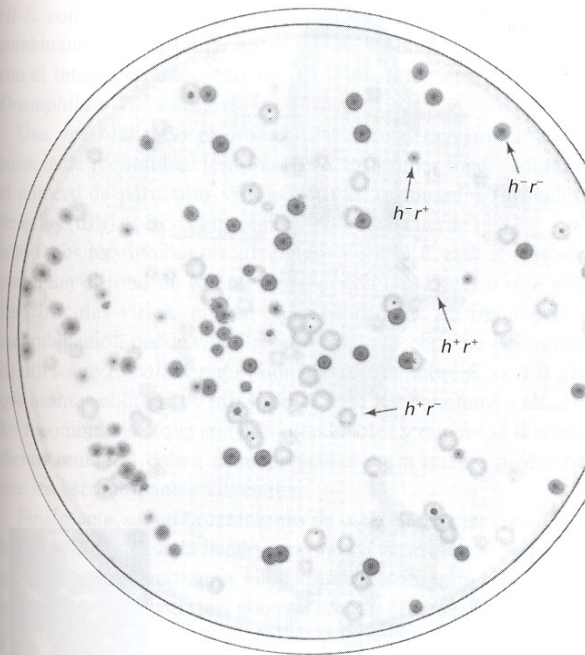


Figura 7-24. Fenotipos de los halos producidos por los descendientes del cruceamiento $h^- r^+ \times h^+ r^-$. Se añaden suficientes fagos de cada genotipo para asegurar que la mayoría de las bacterias será infectada al menos por un fago de cada tipo. Tras la lisis celular, se recogen los fagos descendientes y se añaden a un césped apropiado de *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro fenotipos entre los halos, dos que corresponden a los dos tipos parentales y otros dos a los recombinantes. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 por W. H. Freeman and Company.)

binantes ($h^+ r^+$ y $h^- r^-$), pudiendo calcularse la frecuencia de recombinación del modo siguiente:

$$RF = \frac{(h^+ r^+) + (h^- r^-)}{\text{n.º de halos totales}}$$

Si suponemos que recombinan los genomas completos de los fagos, pueden ocurrir entrecruzamientos sencillos que dan lugar a productos recíprocos viables, al contrario que en los cruzamientos bacterianos donde se requieren dos hechos de recombinación. Sin embargo, el análisis de los cruzamientos de fagos está sujeto a ciertas complicaciones. En primer lugar, pueden ocurrir varios ciclos de intercambio en el interior del hospedador: un recombinante producido inmediatamente después de la infección puede sufrir otros intercambios posteriormente. En segundo lugar, puede producirse la infección doble tanto de fagos genéticamente similares como de fagos diferentes. Por tanto, suponiendo el caso de dos fagos parentales P_1 y P_2 , además del cruzamiento de interés $P_1 \times P_2$, ocurren al mismo tiempo cruzamientos $P_1 \times P_1$ y $P_2 \times P_2$. Por estos dos motivos, los recombinantes obtenidos en los cruzamientos entre fagos son el resultado de un conjunto de hechos, más que de hechos de intercambio individuales bien definidos. No obstante, siempre que el resto de condiciones sean iguales, el cálculo de la RF es un índice válido de las distancias de mapa en fagos.

CUADRO 7-4. Fenotipos de halos producidos mediante diferentes combinaciones de estirpes de *E. coli* y de fagos

Estirpe del fago T4	Estirpe de <i>E. coli</i>	
	B	K
<i>rII</i>	Grande, redondo	No produce halos
<i>rII</i> ⁺	Pequeño, irregular	Pequeño, irregular

COROLARIO

Para estudiar el proceso de recombinación en fagos, se ponen en contacto los cromosomas parentales en una misma célula hospedadora mediante infección mixta. Los fagos descendientes se analizan y su genotipo se clasifica en parental o recombinante.

El sistema *rII*

Los trabajos de Seymour Benzer en los años cincuenta refinaron el análisis de los cruzamientos con fagos hasta tal punto que podían detectarse frecuencias muy pequeñas de recombinación. Su trabajo condujo a una mayor comprensión de la naturaleza de la estructura fina del gen, que consideraremos detalladamente en el Capítulo 9. La clave de su trabajo fue el desarrollo de un sistema que permitía la selección de recombinantes raros. Dicho sistema utiliza los genes *rII* del fago T4.

Un tipo de fago mutante producía halos muy grandes e irregulares, de modo que llamó a estos fagos **mutantes *r*** (de lisis rápida). Benzer analizó genéticamente los mutantes *r* y localizó las mutaciones responsables para el fenotipo *r* en dos loci: *rI* y *rII*. Luego se concentró en los mutantes *rII*.

Fue una propiedad extraordinaria de los mutantes *rII* la que hizo posible el trabajo de Benzer: los mutantes *rII* tienen un espectro de hospedador distinto al de los fagos silvestres. Como hospedadores del fago T4 pueden usarse dos estirpes de *E. coli* diferentes, aunque relacionadas, llamadas B y K(λ). Con ambas bacterias, puede distinguirse entre fagos mutantes *rII* y silvestres. *E. coli* B permite el crecimiento de ambos, aunque los halos que aparecen son de tamaño distinto: los fagos silvestres producen halos pequeños y los mutantes *rII* producen halos grandes. *E. coli* K, abreviación de *E. coli* K(λ), no permite el crecimiento de los mutantes *rII*, pero sí el de los fagos silvestres. Los mutantes *rII* son **mutantes condicionales**, es decir, mutantes que pueden crecer en una serie de condiciones, pero no en otras. Se dice que *E. coli* B es **permissiva** para los mutantes *rII*, porque permite su multiplicación, mientras que *E. coli* K se considera **no permissiva** para dichos mutantes, porque no permite su multiplicación. El Cuadro 7-4 muestra las características de crecimiento y morfología del halo de estos fagos en cada estirpe hospedadora.

Sistemas de selección en cruzamientos genéticos con fagos

Benzer cruzó varios mutantes *rII* del fago T4 y calculó las frecuencias de recombinación, que utilizó posteriormente para localizar las mutaciones en la región del gen *rII*.

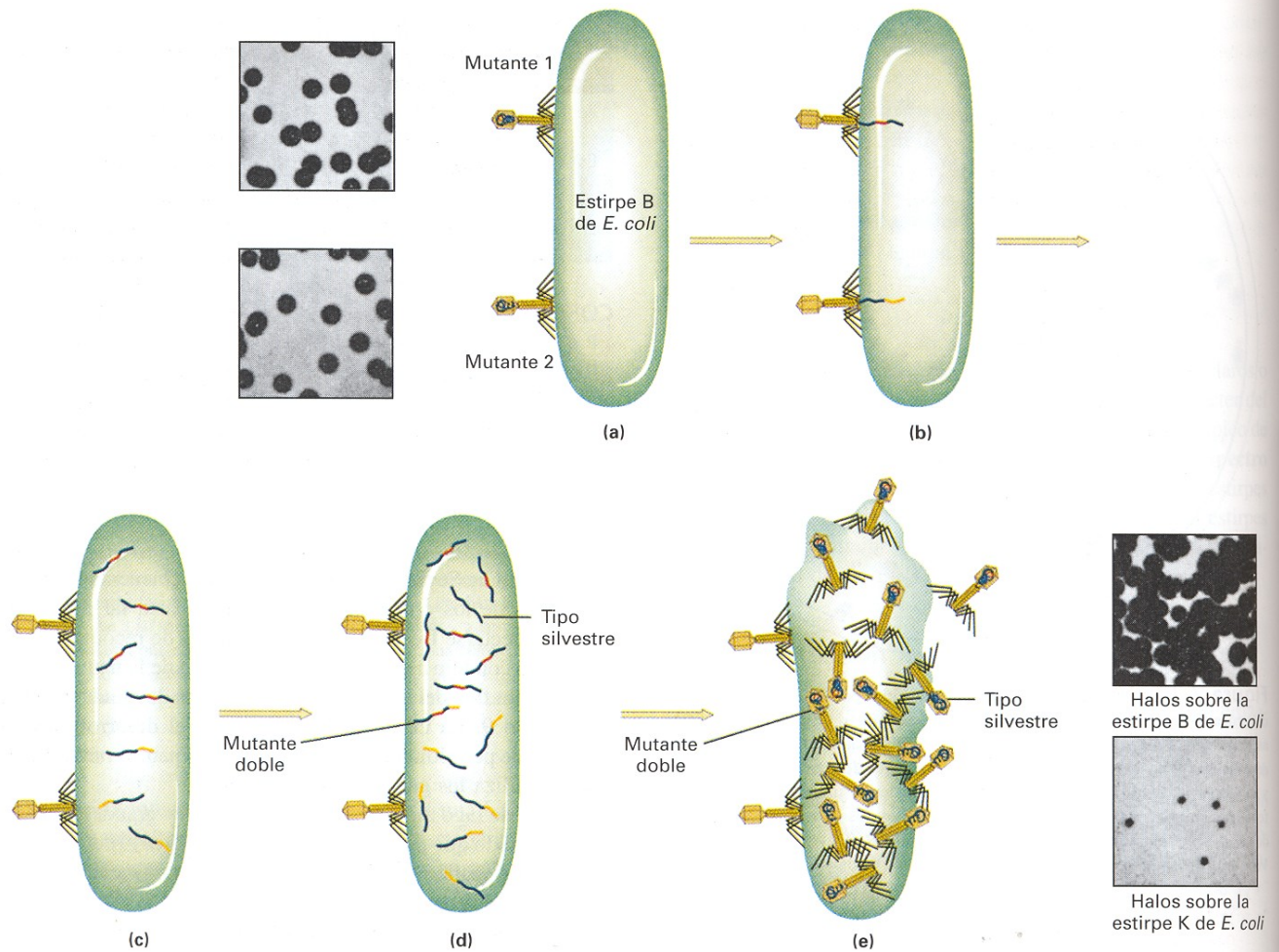


Figura 7-25. El proceso de recombinación permite que fragmentos de DNA de dos mutantes de fagos diferentes se combinen en una nueva molécula de DNA, que puede contener las mutaciones de ambos fagos o ninguna de ellas. Los mutantes obtenidos de los diferentes cultivos se mezclan con un cultivo de la estirpe B de *E. coli*. El cruzamiento ocurre cuando el DNA de cada uno de los fagos mutantes infecta a un solo bacilo. La mayoría de las réplicas de DNA son similares a un tipo de fago o al otro, pero, en ocasiones, la recombinación genera un mutante doble o un recombinante de tipo silvestre, que no contiene ninguna mutación. Al sembrar la descendencia de cada cruzamiento sobre la estirpe B, todos crecen con éxito, produciendo muchos halos. Al sembrar sobre la estirpe K, sólo los recombinantes del tipo silvestre son capaces de crecer. Puede detectarse un solo recombinante silvestre entre unos 100 millones de descendientes. (De S. Benzer, «The Fine Structure of the Gene.» Copyright © 1962. Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

Veamos cómo se realiza esto. Supongamos que deseamos cruzar dos mutantes *rII* y recuperar fagos recombinantes silvestres. Ya que tanto los fagos silvestres como los mutantes *rII* forman halos distinguibles unos de otros, podemos cruzar dos mutantes *rII* distintos en *E. coli* B y examinar su descendencia sobre la propia estirpe *E. coli* B (Fig. 7-25, fotografía superior de la derecha), esperando encontrar algún halo pequeño silvestre entre los halos parentales grandes *rII*. Si la frecuencia de recombinación es suficiente para producir un número de halos silvestres del orden del 2 al 3% o más, este procedimiento bastaría. Sin embargo, si la recombinación fuera menor del 1%, el trabajo necesario para elaborar el mapa de muchas mutaciones *rII* sería abrumador.

No obstante, en vez de sembrar los fagos descendientes del cruzamiento en *E. coli* B, podríamos sembrarlos en *E. coli* K(λ)

(Fig. 7-25, fotografía inferior de la derecha), en la cual sólo crecerían los fagos recombinantes silvestres. Así detectaríamos los fagos recombinantes con toda facilidad, incluso si la frecuencia de recombinación fuera muy baja (digamos, 0.01%) ¿Por qué? Porque un lisado de fagos (mezcla de fagos producida tras la lisis de las bacterias) típico de tales infecciones (esté o no implicado un cruzamiento) contiene más de 10^9 fagos por mililitro. Si mezclamos 0.1 mL de dicho lisado con 0.1 mL de bacterias *E. coli* K, y la frecuencia de recombinación es del 0.01%, tendremos más de 10^5 (100 000) fagos silvestres recombinantes que han infectado a las bacterias. (En la práctica, se emplean diluciones crecientes del lisado de fagos hasta que se produzca un número de halos fácilmente cuantificable). De esta manera, podemos darnos perfecta cuenta del poder de resolución del sistema

rII-E. coli B/K. En un solo mililitro podemos encontrar un recombinante o revertiente entre 10^9 individuos. ¡Compare esto con el intento de encontrar un recombinante entre 10^9 moscas *Drosophila* o 10^9 ratones!

Una vez realizado el cruce, necesitamos determinar la frecuencia de recombinación. Para ello, en primer lugar, contamos el número de partículas víricas activas, o unidades formadoras de halos (**ufh**) que crecen sobre *E. coli* K (recuerde que éstos son sólo fagos recombinantes silvestres) y sobre *E. coli* B (éstos representan el total de los fagos descendientes, puesto que todas las partículas víricas crecen en la estirpe B). La frecuencia de recombinación puede calcularse dividiendo el doble del número de ufh sobre *E. coli* K por el número de ufh sobre *E. coli* B. ¿Por qué usamos el doble de ufh sobre *E. coli* K? Para tener en cuenta los recombinantes que son mutantes dobles y que no se detectan; dichos mutantes deben estar presentes en la misma proporción que los recombinantes silvestres.

Finalmente, en un cruzamiento de este tipo es necesario sembrar por separado cada lisado parental sobre *E. coli* K para determinar cuántos revertientes silvestres había en la población. Las **mutaciones de reversión** ocurren con una frecuencia muy baja, pero real. Es importante calcular esta frecuencia, y compararla con la frecuencia de recombinación calculada, para estar seguro de que tal recombinación ha ocurrido y no se trata simplemente de la reversión de los tipos parentales.

En resumen, el uso que dio Benzer al sistema *rII* y a dos hospedadores bacterianos distintos le proporcionó un método de selección de hechos poco frecuentes, evitando el escrutinio de gran número de halos.

COROLARIO
Benzer rentabilizó el fantástico poder de resolución derivado del empleo de un método de selección para acontecimientos poco frecuentes en fagos que se multiplican rápidamente. Esto le permitió cartografiar un gen con detalle a escala molecular.

Transducción

Algunos fagos son capaces de movilizar genes bacterianos y transferirlos de unas bacterias a otras por medio de un proceso denominado *transducción*. Por tanto, la transducción constituye un mecanismo de transferencia genética entre bacterias, adicional a los que ya hemos considerado: la conjugación, la transferencia infecciosa de episomas y la transformación.

Descubrimiento de la transducción

En 1951, Joshua Lederberg y Norton Zinder estudiaban procesos de recombinación en la bacteria *Salmonella typhimurium*, aplicando las técnicas que ya habían sido utilizadas eficazmente en *E. coli*. Estos investigadores utilizaron dos estirpes diferentes: una de ellas era de genotipo *phe⁻ trp⁻ tyr⁻* y la otra era *met⁻ his⁻* (no nos preocuparemos de momento sobre la naturaleza de estos marcadores, sólo tendremos en cuenta que los alelos mutantes confieren auxotrofia). Cuando cualquiera de las dos estirpes se sembraba en

placas de medio mínimo, no se observaban células silvestres. Sin embargo, tras mezclar las dos estirpes, aparecían células silvestres en una frecuencia aproximada de 1 de cada 10^5 . Hasta ahora, la situación parece similar a la recombinación en *E. coli*.

Sin embargo, en este caso también obtuvieron recombinantes en un experimento con un tubo en U, en el que el filtro impedía el contacto celular (conjugación). Variando el tamaño de poro del filtro que separaba los dos brazos, encontraron que el agente responsable de la recombinación tenía un tamaño parecido al del virus P22, un fago atemperado de *Salmonella*. Estudios adicionales reforzaron la idea de que el vector que permitía la recombinación era efectivamente el fago P22. El agente filtrable y P22 tienen propiedades idénticas en lo que respecta a tamaño, sensibilidad a antisueros e inmunidad a enzimas hidrolíticas. De este modo, Lederberg y Zinder, en lugar de confirmar la conjugación en *Salmonella*, descubrieron un nuevo tipo de transferencia genética mediada por virus que denominaron **transducción**. Durante el ciclo lítico, algunas partículas víricas incorporan genes bacterianos que más tarde son transferidos a otro hospedador, donde el virus introduce su contenido. Posteriormente, se ha demostrado que la transducción es bastante común tanto en los fagos atemperados como en los virulentos.

Hay dos tipos de transducción: generalizada y especializada. Los fagos de transducción *generalizada* pueden transferir cualquier parte del cromosoma de la bacteria que infectan, mientras que los fagos de transducción *especializada* únicamente llevan consigo partes específicas del cromosoma bacteriano.

Transducción con fagos y transducción generalizada

¿Cómo se originan los fagos transductores? En 1956, K. Ikeda y J. Tomizawa clarificaron esta cuestión realizando unos experimentos con el fago P1, un fago atemperado de *E. coli*. Observaron que cuando una célula donante no lisogénica se lisaba como consecuencia de una infección por P1, el cromosoma bacteriano se rompía en fragmentos pequeños. Ocasionalmente, las partículas de fago en formación empaquetaban accidentalmente DNA bacteriano en la cápsida en lugar del DNA del fago, dando origen al fago transductor.

Debido a que las proteínas de la cápsida determinan la capacidad del fago para atacar a una célula, tales fagos transductores pueden adsorberse a la célula bacteriana e inyectar su contenido, que en este caso son genes bacterianos donantes. Cuando se inyecta el contenido de un fago transductor al interior de una célula recipiente, se crea una situación de meroploidía en la cual los genes transducidos pueden incorporarse por recombinación (Fig. 7-26). Puesto que puede transducirse cualquier marcador de la célula hospedadora, este tipo de transducción se denomina **transducción generalizada**.

Los fagos P1 y P22 pertenecen a un grupo que muestra transducción generalizada (es decir, transfieren prácticamente cualquier gen del cromosoma hospedador). Durante su ciclo de vida, P22 probablemente se inserta en el cromosoma hospedador en forma de plásmido, mientras que P1 permanece independiente como un gran plásmido, pero ambos fagos son capaces de transducir marcadores por empaquetamiento erróneo de la cápsida durante la lisis.

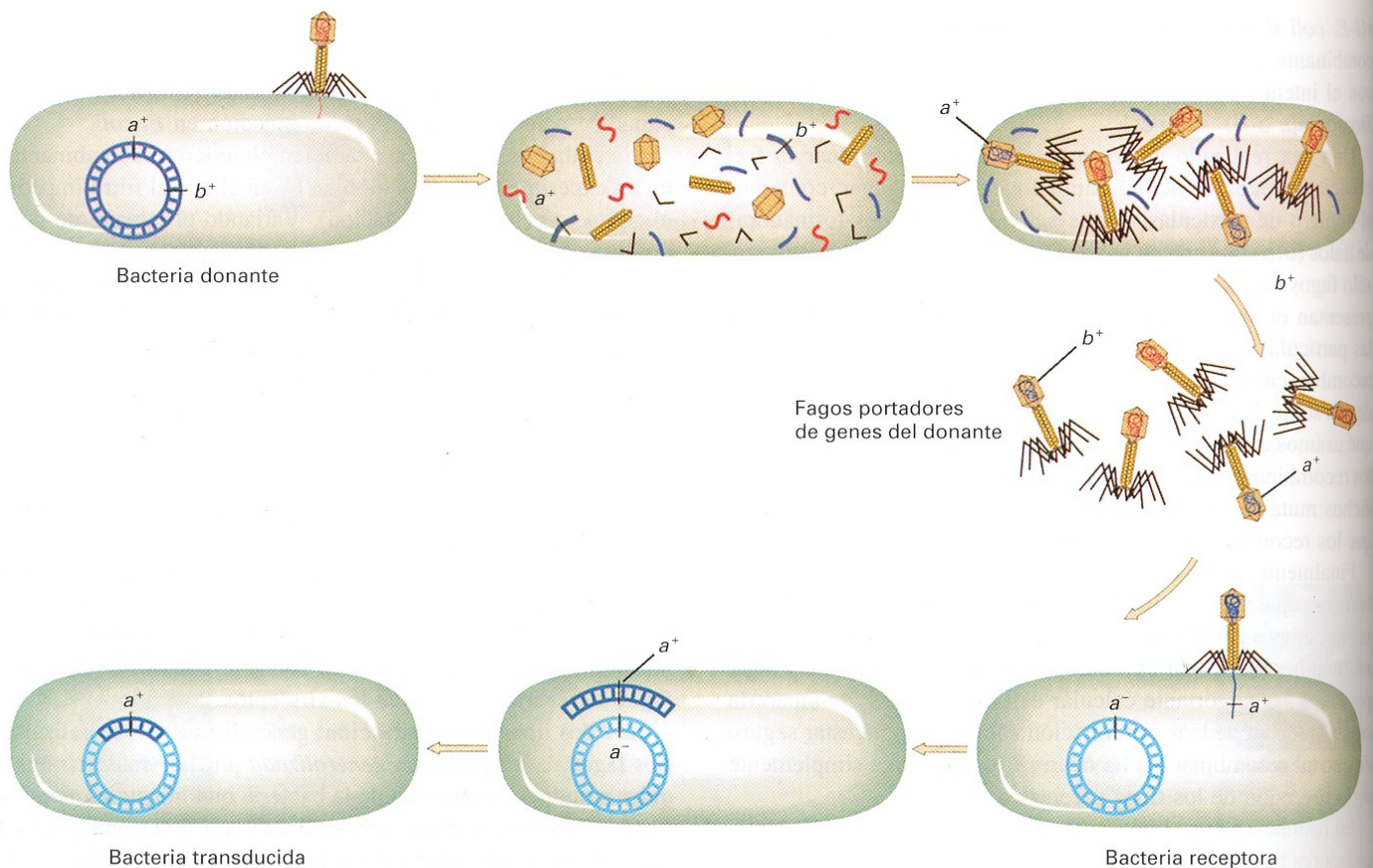


Figura 7-26. Mecanismo de transducción generalizada. En realidad, sólo una pequeña proporción de los fagos descendientes (1 de cada 10 000) contiene genes de la estirpe donante.

Análisis de ligamiento mediante experimentos de transducción

La transducción generalizada puede utilizarse para obtener información del ligamiento entre genes bacterianos si tales genes están suficientemente cercanos para que el fago pueda incorporarlos y transducirlos como un solo fragmento de DNA. Por ejemplo, supongamos que queremos medir el grado de ligamiento entre los loci *met* y *arg* de *E. coli*. Realizamos un cruzamiento entre una estirpe *met*⁺ *arg*⁺, y otra *met*⁻ *arg*⁻. Podemos incubar el fago P1 con la estirpe donante *met*⁺ *arg*⁺, permitir la infección con P1 de la estirpe *met*⁻ *arg*⁻, y seleccionar luego las colonias *met*⁺. Determinaríamos entonces qué porcentaje de las colonias *met*⁺ son también *arg*⁺. Las estirpes que han sido transducidas tanto para *met*⁺ como para *arg*⁺, se denominan **cotransductantes**.

El grado de ligamiento se expresa como frecuencias de cotransducción (Fig. 7-27). Cuanto mayor sea la frecuencia de cotransducción, menor será la distancia entre los dos marcadores genéticos.

En una extensión de este análisis, podemos estimar el tamaño del fragmento cromosómico que es capaz de incorporar un fago, realizando el siguiente tipo de experimento con el fago P1:

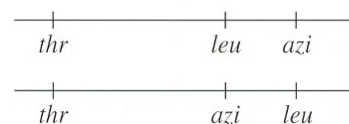


Podemos seleccionar uno o más marcadores del donante en el recipiente y después (siguiendo la metodología de la genética de

CUADRO 7-5. Marcadores asociados en transducciones concretas con P1

Experimento	Marcador seleccionado	Marcadores no seleccionados
1	<i>leu</i> ⁺	50 % son <i>azi</i> ^r ; 2 % son <i>thr</i> ⁺
2	<i>thr</i> ⁺	3 % son <i>leu</i> ⁺ ; 0 % son <i>azi</i> ^r
3	<i>leu</i> ⁺ y <i>thr</i> ⁺	0 % son <i>azi</i> ^r

la merocigosis) buscar la presencia de los otros marcadores no seleccionados, tal como se indica en el Cuadro 7-5. El experimento 1 de el Cuadro 7-5 nos dice que *leu* está relativamente cerca de *azi* y lejos de *thr*, dejándonos con dos alternativas posibles:



El experimento 2 nos dice que *leu* está más cerca de *thr* que *azi*, por lo que el mapa debe ser:



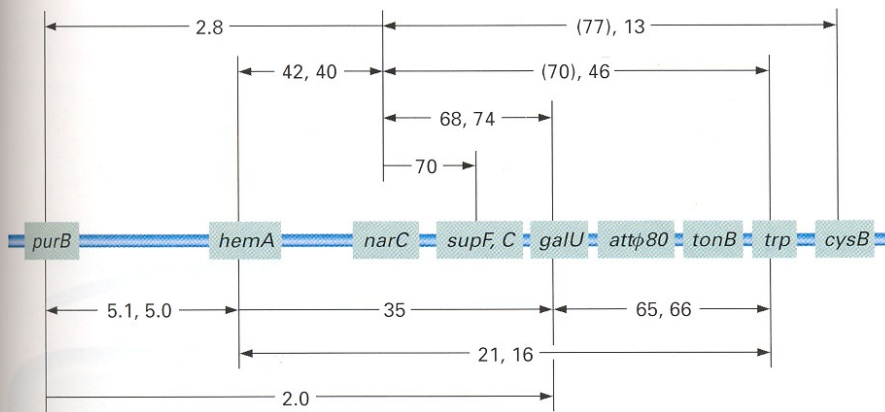


Figura 7-27. Mapa genético de la región *purB-cysB* de *E. coli* determinado por experimentos de cotransducción con P1. Los números son las medias en tanto por ciento de las frecuencias de cotransducción obtenidas en varios experimentos. En los casos en que se realizaron cruzamientos en ambos sentidos, la punta de cada flecha señala el marcador seleccionado con el ligamiento correspondiente más próximo a cada flecha. Los valores entre paréntesis no se consideran fiables debido a la interferencia del marcador no seleccionado. (Modificado de J. R. Guest, *Molecular and General Genetics* 105, 1969, 285.)

El experimento 3, en el que se seleccionaron los marcadores *thr*⁺ y *leu*⁺, indica que el fragmento de material genético transducido no incluye nunca el locus *azi*.

Si estudiáramos un número suficiente de marcadores para producir un mapa de ligamiento más completo, podríamos estimar el tamaño del fragmento transducido. Este tipo de experimentos indica que en P1 la cotransducción es posible para una distancia de aproximadamente 1.5 minutos en el mapa cromosómico de *E. coli* (1 minuto equivale a la longitud de cromosoma transferida por una estirpe Hfr en un minuto a 37 °C).

Lisogenia

En los años veinte, mucho antes de que *E. coli* se convirtiera en el organismo favorito de los genetistas microbianos, se obtuvieron algunos resultados interesantes mediante el estudio de la infección de *E. coli* por fagos. Algunas estirpes bacterianas son resistentes a la infección por ciertos fagos, pero causan la lisis de bacterias no resistentes si las dos estirpes bacterianas se mezclan. Las bacterias resistentes que inducen la lisis de otras células se denominan bacterias lisogénicas o lisógenos. Cuando se infectan bacterias no lisogénicas con fagos derivados de una estirpe lisogénica, una pequeña parte de las células infectadas no se lisa, sino que se convierte en lisogénica.

Aparentemente, las bacterias lisogénicas son de algún modo «portadoras» de fagos aunque ellas mismas son inmunes a su acción lítica. En un principio, se prestó poca atención a este fenómeno, después de que algunos estudios sugirieran que las bacterias lisogénicas estaban simplemente contaminadas con fagos externos que podían eliminarse tras purificación cuidadosa. Sin embargo, a mediados de los años cuarenta, André Lwoff estudió estirpes lisogénicas de *Bacillus megaterium* y siguió el comportamiento de una estirpe lisogénica a lo largo de muchas divisiones celulares. Observando cuidadosamente este cultivo, separó cada par de células hijas inmediatamente después de la división. A una de las células la puso en un cultivo y a la otra la observó hasta que se dividió. De este modo, obtuvo 19 cultivos que representaban 19 generaciones (19 divisiones celulares consecutivas). Los 19 cultivos eran lisogénicos, pero los análisis del medio no revelaron ningún fago libre en ningún momento durante estas divisiones, confirmando así que el comportamiento lisogé-

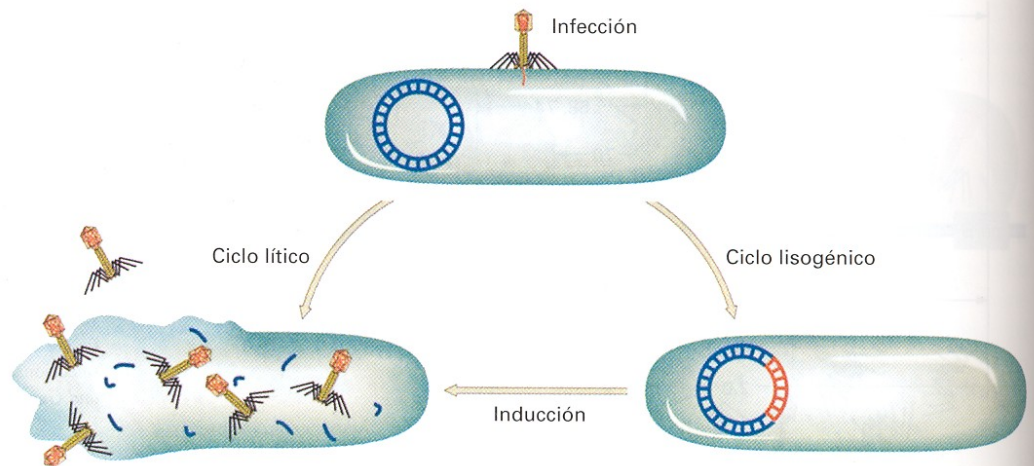
nico era un carácter que persistía tras la reproducción en ausencia de fagos libres.

Con baja frecuencia, Lwoff observó lisis espontánea de alguna de las células de sus cultivos. Si se extendía el medio sobre un césped de células no lisogénicas después de una de estas lisis espontáneas, aparecían halos, indicando que se habían liberado fagos durante la lisis. Lwoff propuso una hipótesis para explicar todas estas observaciones: cada una de las bacterias de la estirpe lisogénica contiene un factor no infeccioso que se transmite de generación en generación, pero ocasionalmente este factor da lugar a la producción de fagos infecciosos (sin la presencia de fagos libres en el medio). Lwoff denominó **profago** a este factor, porque de algún modo parecía ser capaz de *inducir* la formación de una descendencia de fagos infecciosos. Estudios posteriores revelaron que hay varios agentes, tales como la luz ultravioleta o determinados productos químicos, que pueden inducir la lisis de una proporción elevada de células en una población de bacterias lisogénicas.

Ahora estamos en disposición de comprender completamente las observaciones de Lwoff. Una bacteria lisogénica contiene un profago, que de algún modo protege a la célula contra una infección adicional, o **sobreinfección**, por fagos libres y se duplica durante la división, transmitiéndose a las células hijas. En una proporción pequeña de las células lisogénicas, el profago se **induce**, o **activa**, para producir fagos infecciosos. Este proceso termina con la protección de la célula contra el fago, por lo que aquella se lisa y libera fagos infecciosos al medio, infectando así cualquier célula no lisogénica presente en el cultivo.

Los fagos se clasifican en dos grupos. Los **fagos virulentos** presentan un ciclo infeccioso que siempre es **lítico**: no hay bacterias lisogénicas para estos fagos (puede que existan mutantes bacterianos resistentes a los fagos virulentos, pero la resistencia no se debe a la lisogenia). Los **fagos atemperados** siguen un ciclo lítico en determinadas circunstancias, pero normalmente inician un **ciclo lisogénico**, en el cual el fago se mantiene en la célula bacteriana como un profago. En este caso, la bacteria lisogénica se hace resistente a una nueva infección, «inmunidad» que es conferida por la presencia del profago y que se transmite durante muchas generaciones bacterianas. Los fagos atemperados también producen lisis cuando el profago es inducido, o activado. La Figura 7-28 representa los ciclos lítico y lisogénico de un fago atemperado típico.

Figura 7-28. Ciclos de vida alternativos de un fago atemperado y su célula hospedadora. (De A. Lwoff, *Bacteriological Reviews* 17, 1953, 269.)



COROLARIO

Los fagos virulentos no pueden convertirse en profagos; son siempre líticos. Los fagos atemperados pueden permanecer en la célula bacteriana en forma de profagos, permitiendo a las células hospedadoras sobrevivir como bacterias lisogénicas, aunque también son capaces de provocar la lisis bacteriana.

Base genética de la lisogenia

¿Cuál es la naturaleza del profago? Tras la inducción, el profago es capaz de dirigir la producción de fagos maduros completos, de modo que todo el genoma del fago debe estar presente en el fago. Pero, ¿es el fago una partícula pequeña que se encuentra libre en el citoplasma bacteriano, o está de algún modo asociado al genoma bacteriano? Casualmente, la estirpe original de *E. coli* utilizada por Lederberg y Tatum (pág. 209) resultó ser lisogéni-

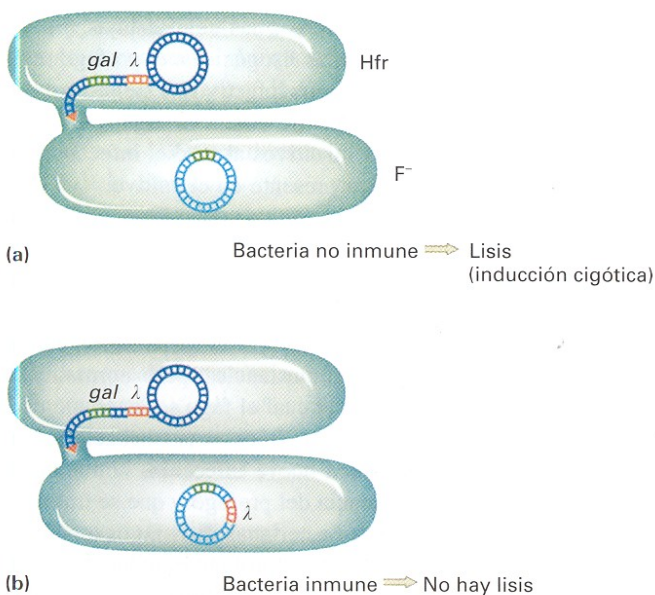


Figura 7-29. Inducción cigótica.

ca para un fago atemperado denominado **lambda** (λ). El fago λ se ha convertido en el fago más estudiado y mejor caracterizado. Los cruzamientos entre células F^+ y F^- han proporcionado resultados interesantes. El cruzamiento $F^+ \times F^-(\lambda)$ produce recombinantes lisogénicos, mientras que el cruzamiento recíproco $F^+(\lambda) \times F^-$, casi nunca produce recombinantes lisogénicos.

Estos resultados se hicieron más comprensibles cuando se descubrieron las estirpes Hfr. En el cruzamiento $Hfr \times F^-(\lambda)$, se obtienen fácilmente exconjugantes lisogénicos F^- con genes Hfr. Sin embargo, en el cruzamiento recíproco $Hfr(\lambda) \times F^-$, entre los exconjugantes aparecen los primeros genes que se transfieren a partir del cromosoma Hfr, pero no se observan recombinantes para los marcadores tardíos (aquellos que se transfieren después de cierto tiempo de iniciada la conjugación). Además, casi nunca se obtienen exconjugantes lisogénicos en este cruzamiento recíproco. ¿Cómo podrían explicarse estos resultados? Estas observaciones tendrían sentido si el profago λ se comportara como un locus genético bacteriano (es decir, como parte del cromosoma bacteriano). En experimentos de conjugación interrumpida, el profago λ siempre entra en la célula F^- en un momento específico, estrechamente ligado al locus *gal*. Por tanto, podemos situar al profago λ en un locus concreto próximo a la región *gal*.

En el cruzamiento entre una estirpe Hfr lisogénica y una estirpe recipiente F^- no lisogénica (no inmune), la entrada del profago λ a la célula no inmune induce el ciclo lítico de inmediato, proceso denominado **inducción cigótica**. Sin embargo, en el cruzamiento $Hfr(\lambda) \times F^-(\lambda)$, se obtiene fácilmente cualquier tipo de recombinante; es decir, no hay inducción del profago y en consecuencia no se produce lisis (Fig. 7-29). Parece como si el citoplasma de la célula F^- pudiera encontrarse en dos estados diferentes (dependiendo de si la célula contiene o no un profago de λ), de manera que el contacto entre un profago entrante y el citoplasma de una célula no inmune induciría inmediatamente el ciclo lítico. Ahora sabemos que un factor citoplásmico determinado por el profago reprime la multiplicación del virus. La entrada del profago en un ambiente no lisogénico diluye inmediatamente este factor represor y entonces el virus se reproduce. Pero si el virus determina el factor represor, ¿por qué no se reprime a sí mismo? Claramente lo hace, porque una fracción de las

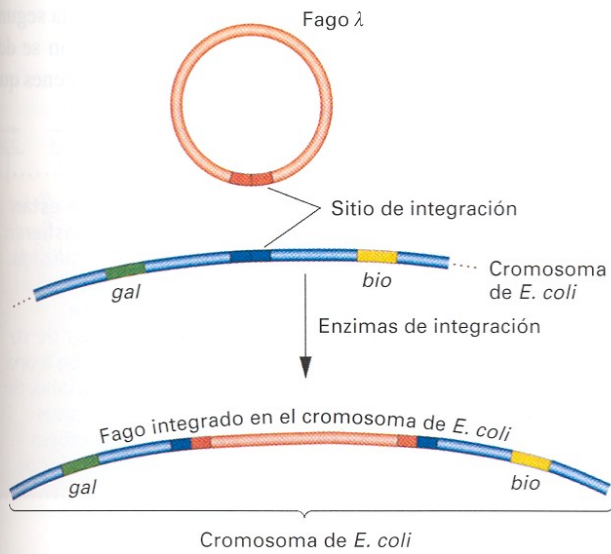


Figura 7-30. Modelo de Campbell de integración del fago λ en el cromosoma de *E. coli*. Se produce un hecho de recombinación recíproca entre un sitio de integración específico presente en el DNA circular de λ y una región concreta del cromosoma de la bacteria situada entre los genes *gal* y *bio*.

células infectadas se convierte en lisogénica. Se produce una competencia entre las señales génicas de λ necesarias para la reproducción y aquellas necesarias para la represión. El modelo de un represor citoplásmico determinado por el fago explica la inmunidad de las bacterias lisogénicas, ya que cualquier fago infectante nuevo encontraría inmediatamente un represor y sería inactivado. En el Capítulo 11 discutiremos con más detalle este modelo.

Integración del profago

¿Cómo se integra el profago en el genoma de una bacteria? Allan Campbell propuso en 1962 que λ lo hace mediante un

hecho de recombinación recíproca entre los cromosomas circulares de λ y de *E. coli*, como se muestra en la Figura 7-30. El entrecruzamiento ocurre entre una región específica de λ , el **sitio de integración de λ** , y una región del cromosoma bacteriano situada entre los genes *gal* y *bio*, ya que λ se integra en esa posición en el cromosoma de *E. coli*.

Un aspecto atractivo del modelo de Campbell es que permite hacer predicciones que pueden ser comprobadas por los genetistas utilizando el fago λ :

1. La integración del profago en el cromosoma de *E. coli* debería provocar un aumento en la distancia genética entre los marcadores bacterianos adyacentes, como se aprecia en la Figura 7-30 para *gal* y *bio*. De hecho, los estudios demuestran que el tiempo de entrada y las distancias de recombinación entre los genes bacterianos *aumentan* como consecuencia de la lisogenia.
2. La delección de fragmentos bacterianos adyacentes al sitio de integración del profago deberían deleccionar genes del fago, al menos algunas veces. Los estudios experimentales también confirman esta predicción.

Transducción especializada

Ahora podemos comprender el proceso de **transducción especializada**, mediante el cual sólo pueden transducirse ciertos marcadores de la célula hospedadora.

El fago lambda es un buen ejemplo de fago transductor especializado. Como profago, λ siempre se integra entre las regiones *gal* y *bio* del cromosoma del hospedador (véase Fig. 7-30). En experimentos de transducción, λ sólo transduce los genes *gal* y *bio*. Visualicemos el mecanismo de transducción de λ .

La recombinación entre regiones de λ y del cromosoma bacteriano está catalizada por un sistema enzimático específico. Dicho sistema normalmente asegura que λ se integre siempre en el

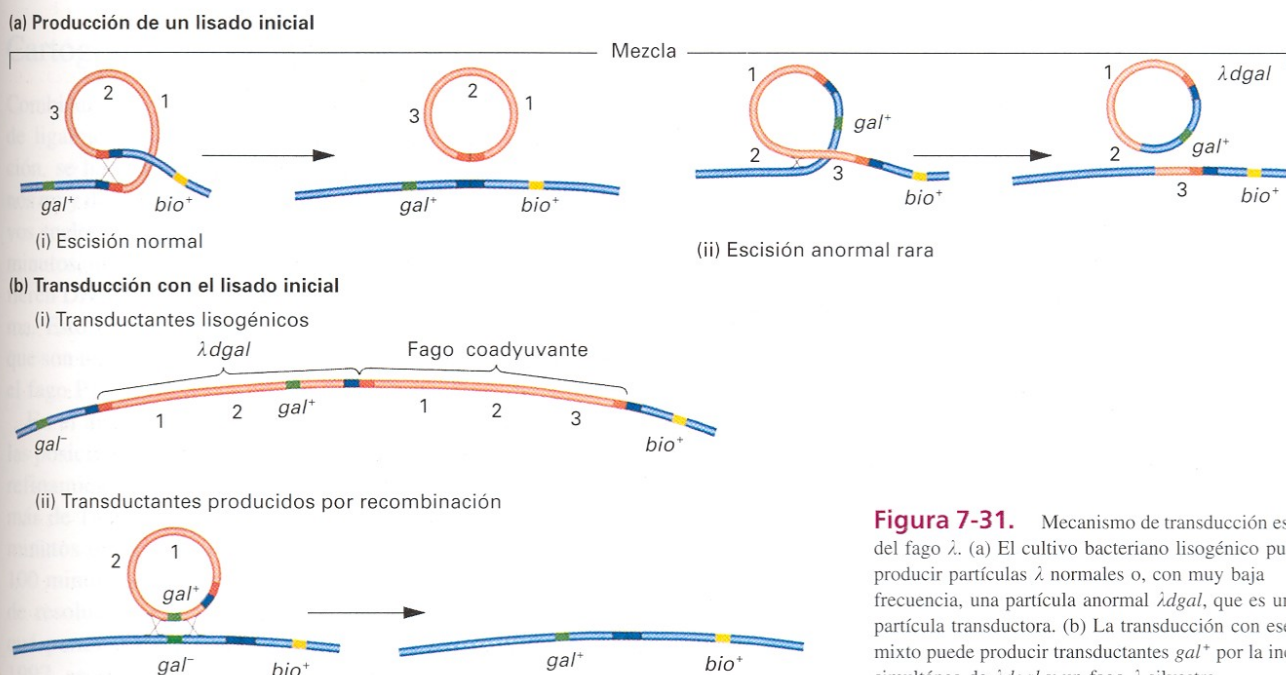


Figura 7-31. Mecanismo de transducción especializada del fago λ . (a) El cultivo bacteriano lisogénico puede producir partículas λ normales o, con muy baja frecuencia, una partícula anormal $\lambda dgal$, que es una partícula transductora. (b) La transducción con ese lisado mixto puede producir transductantes *gal+* por la incorporación simultánea de $\lambda dgal$ y un fago λ silvestre.

mismo sitio del cromosoma y cuando se induce el ciclo lítico (por ejemplo, con luz ultravioleta), asegura que el profago λ se separe de modo preciso en el sitio correcto para dar lugar al cromosoma normal y circular de λ . Con muy baja frecuencia, se produce una escisión anormal del profago, dando lugar a partículas del fago portadoras de un gen próximo al sitio de integración y dejando atrás algunos genes del fago (Fig. 7-31a). Los genes adyacentes en el caso del fago λ , son *gal* a un lado y *bio* al otro. Las partículas resultantes son defectuosas, ya que algunos de sus genes han quedado en el cromosoma del hospedador y, por ello, se denominan λ dg*al* (λ -defectuoso *gal*), o λ db*io*. Estas partículas defectuosas portadoras de genes adyacentes pueden empaquetarse en las cápsidas de los fagos e infectar a otras bacterias. En presencia de una segunda partícula de fago silvestre, mediante una infección doble, la partícula λ dg*al* puede integrarse en el sitio de integración de λ del cromosoma (Fig. 7-31b). De

este modo, los genes *gal* se transducen en este caso a una segunda célula hospedadora. Este mecanismo de transducción se denomina transducción especializada, porque se limita a genes que están muy próximos al profago integrado inicialmente.

COROLARIO

La transducción se produce cuando los fagos que se están formando incorporan genes del hospedador y los transfieren a otras células bacterianas. En la transducción generalizada, el fago puede transferir cualquier gen del hospedador. Ocurre cuando los fagos que están empaquetándose incorporan accidentalmente DNA bacteriano en lugar de su propio DNA vírico. La transducción especializada se debe a una escisión defectuosa del profago del cromosoma bacteriano, de modo que el nuevo fago incluye tanto genes bacterianos como genes del propio fago. Estos fagos transductores sólo pueden transferir genes específicos del hospedador.

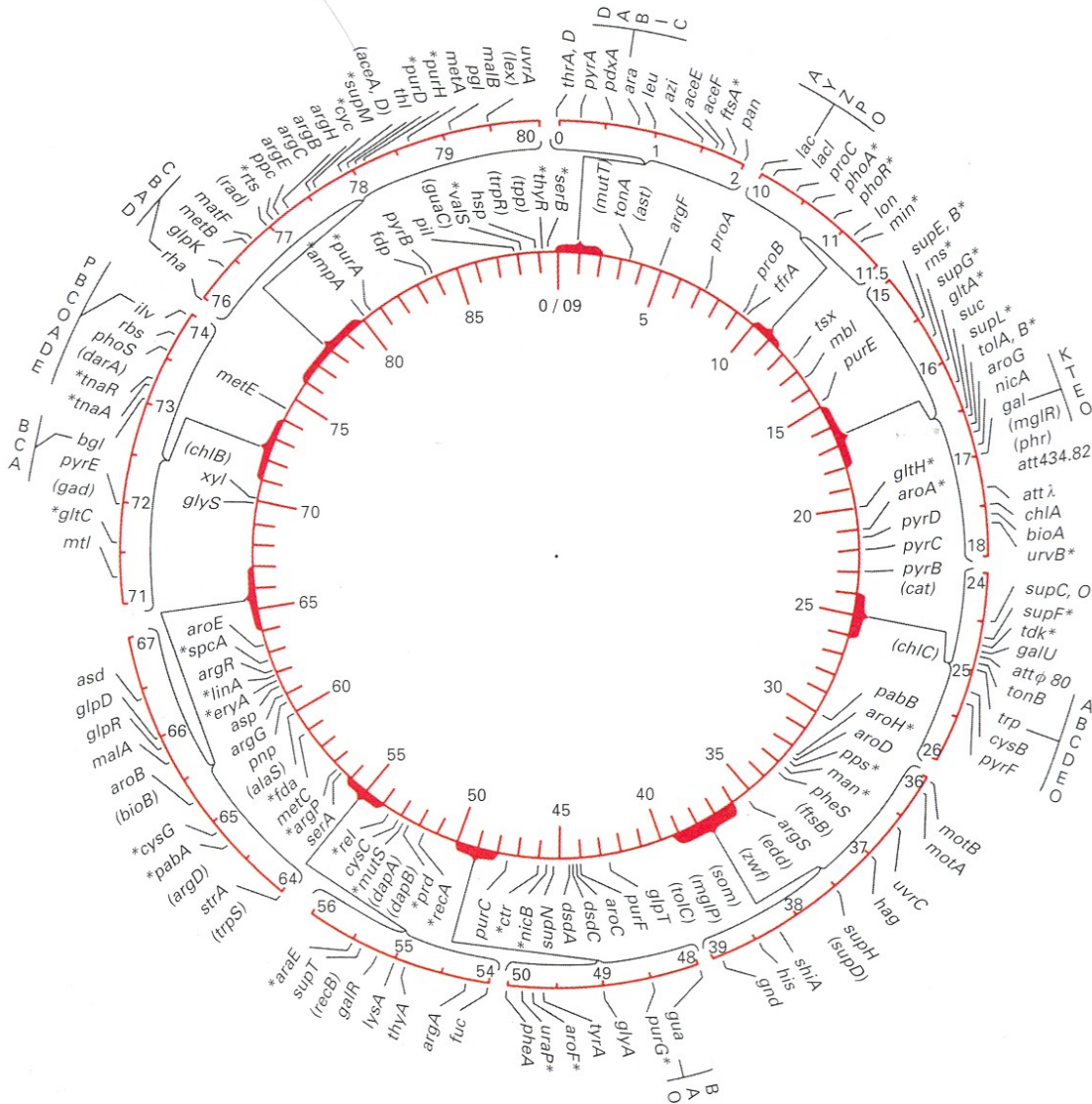


Figura 7-32. El mapa genético de *E. coli* de 1963. Las unidades son los minutos, basadas en experimentos de conjugación interrumpida y medidas a partir de un origen localizado arbitrariamente. Los asteriscos hacen referencia a los marcadores que no han sido localizados en el mapa con tanta precisión como los demás. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963. W. H. Freeman and Company.)

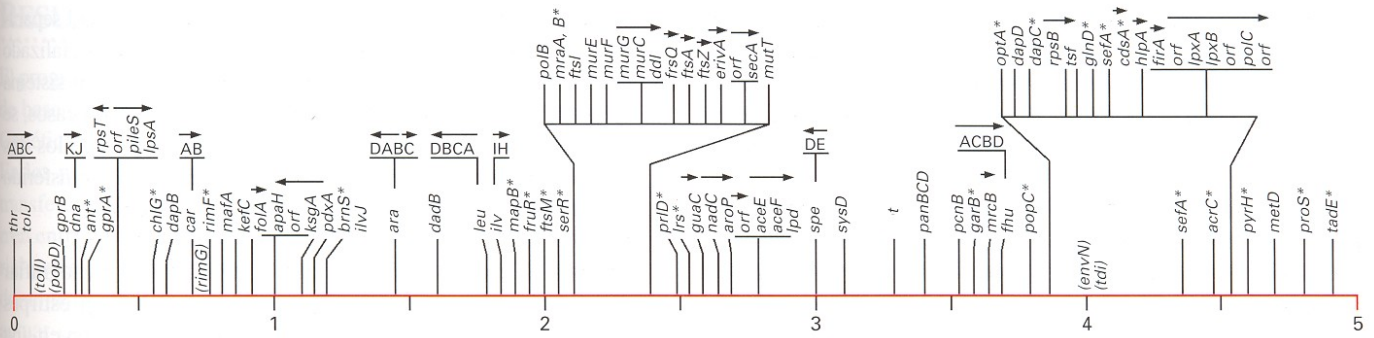


Figura 7-33. Representación lineal de una sección de 5 minutos del mapa de ligamiento de 100 minutos de *E. coli* de 1990. Los marcadores entre paréntesis no están cartografiados de forma precisa; aquellos marcados con asteriscos están cartografiados de forma más precisa que los que están entre paréntesis, pero todavía no se conocen exactamente. Las flechas sobre los genes y agrupaciones de genes indican la dirección de transcripción de esos loci. (De B. J. Bachmann, «Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Ed. 8.» *Microbiological Reviews*, 54, 1990, 130-197).

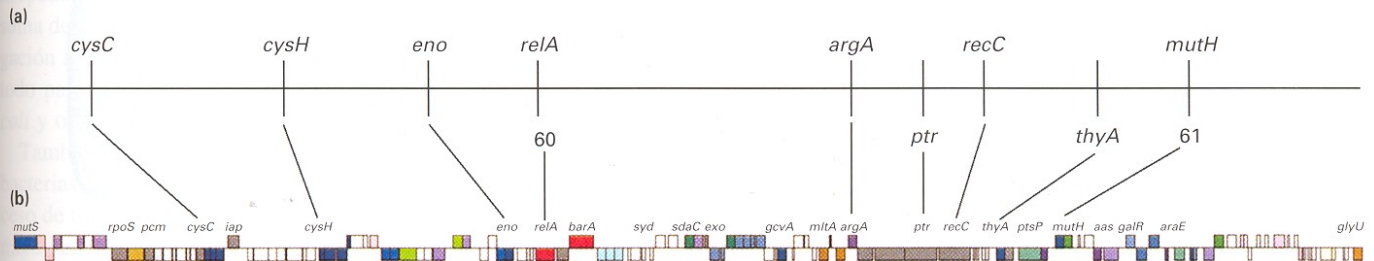


Figura 7-34. Correlación entre los mapas genético y físico. (a) Marcadores del mapa genético de 1990 en la región próxima a los minutos 60 y 61. (b) Posición exacta de cada gen, basada en la secuencia completa del genoma de *E. coli*. (Por simplicidad, no aparecen todos los genes en la figura). Los cuadrados pequeños representan genes y supuestos genes. Cada color representa un tipo de función diferente. Por ejemplo, el rojo denota una función reguladora y el azul oscuro denota las funciones de replicación, recombinación y reparación del DNA. Se indica la correspondencia del orden de los genes en los dos mapas.

Cartografía del cromosoma

Combinando las técnicas de conjugación interrumpida, análisis de ligamiento por recombinación, transformación y transducción, se han elaborado algunos mapas cromosómicos bacterianos muy detallados. Actualmente, los marcadores genéticos nuevos suelen localizarse primero en un segmento de unos 10 a 15 minutos, utilizando para ello una serie de estirpes Hfr que transfieren DNA a partir de diferentes puntos a lo largo del cromosoma. Esto permite seleccionar marcadores dentro del intervalo, que son utilizados luego en experimentos de cotransducción con el fago P1.

En el año 1963, el mapa de *E. coli* (Fig. 7-32) ya detallaba las posiciones de aproximadamente 100 genes. Tras 27 años de refinamiento posterior, el mapa de 1990 indica la posición de más de 1400 genes. La Figura 7-33 muestra una porción de 5 minutos del mapa de 1990 (que está ajustado a una escala de 100 minutos). La complejidad de estos mapas ilustra el poder de resolución y la sofisticación del análisis genético. ¿Hasta qué punto estos mapas corresponden a la realidad física? En 1997, se obtuvo la secuencia de DNA del genoma completo

de *E. coli*, permitiendo así comparar la posición exacta de los marcadores del mapa genético con la posición correspondiente a la secuencia lineal de DNA respectiva en la que están cifrados. La Figura 7-34 muestra la comparación de un segmento en ambos mapas. Claramente, el mapa genético corresponde de manera precisa a las posiciones relativas del mapa físico.

Revisión de la transferencia génica bacteriana

1. La transferencia de genes entre bacterias puede llevarse a cabo mediante conjugación, transformación y transducción mediada por fagos.
2. La herencia de marcadores genéticos mediante transferencia conjugativa de DNA por estirpes Hfr, transformación de segmentos del cromosoma donante y transducción generalizada son procesos que comparten una propiedad importante. En todos estos procesos, se introduce un fragmento de DNA

en la célula receptora, que debe sufrir dos hechos de recombinación para que sea integrado en el cromosoma y heredado posteriormente. Los fragmentos que no se incorporen, no pueden replicarse y por consiguiente, se diluyen y desaparecen de la población de células hijas.

- La transferencia conjugativa de factores F' portadores de genes bacterianos y la transducción especializada de ciertos marcadores genéticos son procesos similares en el sentido de que en ambos casos se introduce eficazmente un conjunto limitado y específico de genes bacterianos en la célula receptora. Para su transmisión no es necesario que ocurra recombinación normal, como en el caso de la herencia de fragmentos de DNA. Después de la transferencia de F', el factor F' se

replica en el citoplasma bacteriano como una entidad separada. Por otro lado, el DNA del fago transductor especializado se integra en el cromosoma bacteriano mediante un sistema de recombinación específico de ese fago. En ambos casos, se produce un diploide parcial (merodiploide), ya que los dos procesos permiten la herencia simultánea del gen transferido y del alelo correspondiente en la célula receptora.

- La transferencia génica puede utilizarse para cartografiar el cromosoma bacteriano. Los cruzamientos con estirpes Hfr se utilizan primero para localizar una mutación en una región determinada del cromosoma. Posteriormente, la transducción generalizada proporciona una localización más precisa.

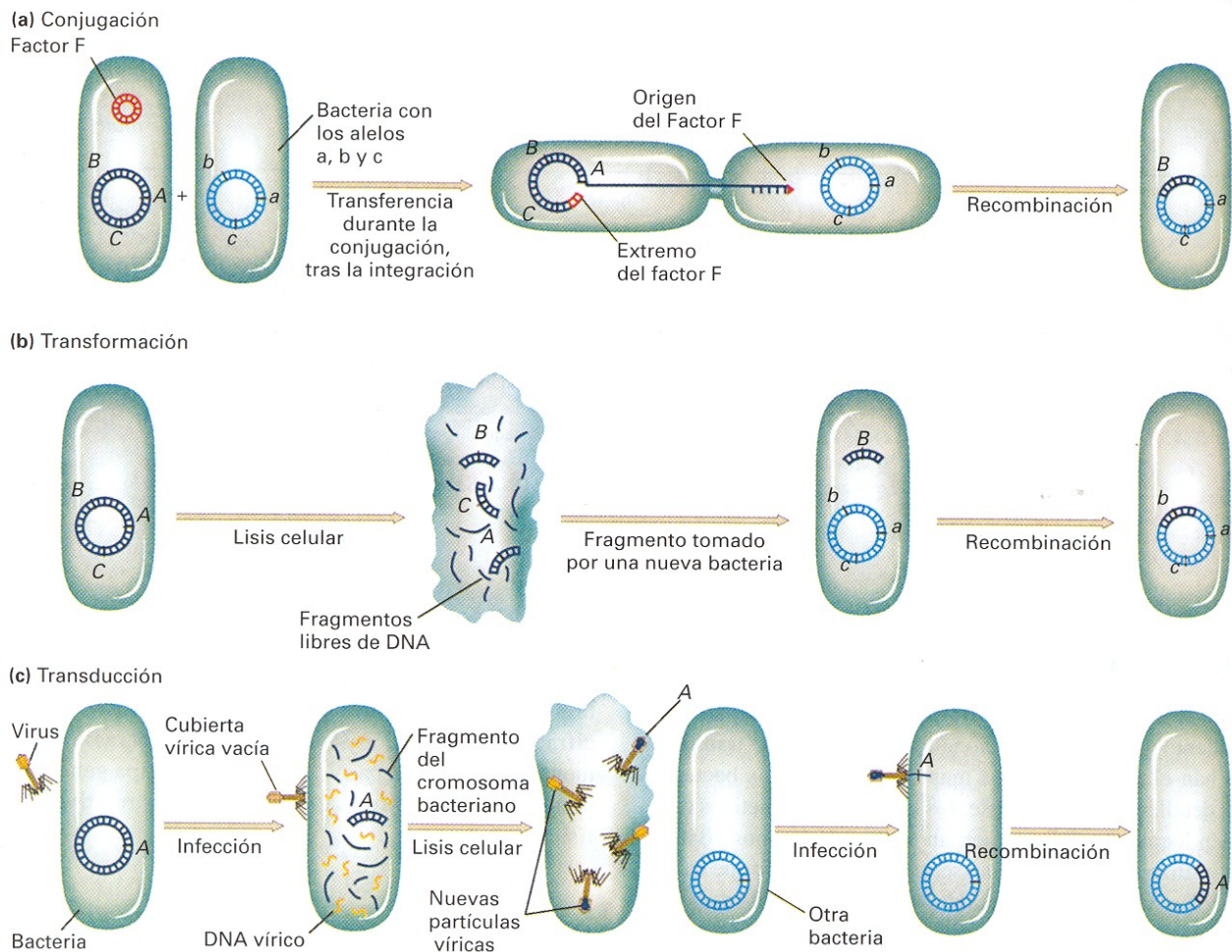


Figura 7-35. Procesos de recombinación en bacterias. La recombinación bacteriana requiere que una célula reciba un alelo de otra célula. (a) En el proceso de conjugación, un elemento citoplásmico, como el factor de fertilidad (F), se integra en el cromosoma de la célula bacteriana. Durante el contacto célula-célula, el factor integrado puede transferir todo o parte de ese cromosoma a otra célula cuyo cromosoma contenga alelos de los genes presentes en el fragmento transferido. Éste recombina con el segmento homólogo del cromosoma de la célula receptora; en el ejemplo mostrado aquí, el alelo B sustituye al alelo b. (b) En el proceso de transformación, un segmento de DNA portador de un determinado alelo es captado del medio ambiente por una célula cuyo cromosoma lleva un alelo con el que puede emparejar; los alelos (en nuestro ejemplo, B y b) se intercambian por recombinación homóloga. (c) En el proceso de transducción, después de que un fago haya infectado a una célula bacteriana, una de las partículas del fago sintetizadas *de novo* toma un segmento de DNA bacteriano en lugar del DNA vírico. Cuando esta partícula infecta a otra célula, inyecta el DNA bacteriano, que recombina con un segmento homólogo de la segunda célula, produciéndose así el intercambio de cualquiera de los alelos correspondientes (en nuestro ejemplo, A y a).

RESUMEN

El progreso conseguido en los últimos cincuenta años ha servido de base para los recientes avances realizados en el campo de la Genética molecular (que se discuten en los siguientes capítulos). En los primeros momentos de este período, se descubrió que la transferencia genética y la recombinación son procesos que ocurren entre distintos tipos de bacterias. En las bacterias, el material genético se transmite en un único sentido, desde una célula donante (F^+ o Hfr) a una célula receptora (F^-). La capacidad de actuar como donante está determinada por la presencia en la célula de un factor de fertilidad (F), que funciona como un episoma.

A veces, el factor F presente en las células F^+ en estado libre puede integrarse en el cromosoma de *E. coli* y dar lugar a una célula Hfr. Cuando esto ocurre, tiene lugar la transferencia de genes bacterianos y la posterior recombinación. Además, como el factor F puede integrarse en sitios diferentes del cromosoma hospedador, los científicos han podido demostrar que el cromosoma de *E. coli* es único y circular. La interrupción de la conjugación a distintos tiempos ha provisto a los genéticos de un método para elaborar mapas de ligamiento del cromosoma de *E. coli* y otras bacterias similares.

También pueden transferirse marcadores genéticos de unas bacterias a otras en forma de DNA desnudo. El estudio del proceso de transformación en bacterias permitió demostrar por primera vez que el DNA es el material genético. Para que se produzca la transformación, el DNA debe ser tomado por una célula

receptora, y entonces tener lugar la recombinación entre el DNA incorporado y el cromosoma del receptor.

Las bacterias pueden ser infectadas por bacteriófagos. En una forma de infección, el cromosoma del fago entra en la célula y, utilizando su maquinaria metabólica, produce fagos descendientes, que lisan la bacteria hospedadora. Las nuevas partículas de fagos pueden infectar a otras células. Si dos fagos de genotipos diferentes infectan a un mismo hospedador, durante el proceso lítico puede tener lugar la recombinación de sus cromosomas. La localización de genes siguiendo este método ha llevado a la conclusión de que los cromosomas de los fagos pueden ser también circulares.

En otra forma de infección, la lisogenia, el DNA inyectado del fago permanece latente en la célula hospedadora. En muchos casos, este fago latente (el profago) se integra en el cromosoma hospedador y se replica con él. Bien espontáneamente o bien mediante inducción, el profago puede salir de su latencia y lisar la célula hospedadora.

Los fagos pueden transportar genes bacterianos desde una célula donante a una receptora. En el proceso de transducción generalizada, durante la lisis se empaquetan fragmentos aleatorios de DNA en la cápsida del fago. En la transducción especializada, se incluyen en la cápsida del fago genes específicos del hospedador junto con DNA del fago, debido a la escisión errónea del profago de un locus cromosómico concreto.

La Figura 7-35 resume los procesos de conjugación, transformación y transducción.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

bacterias / conjugación / recombinación / plásmido F / Hfr / F^- / donante / recipiente / conjugación interrumpida / mapa cromosómico / pilus / merocigoto / gen

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULO

Suponiendo que una célula es incapaz de llevar a cabo el proceso de recombinación (es rec^-), ¿Cómo se comportaría esta célula como recipiente en transducciones generalizadas y en especializadas? En primer lugar, compare los dos tipos de transducción y luego determine el efecto de la mutación rec^- sobre la transmisión de genes mediante cada proceso.

◆ Solución ◆

La transducción generalizada implica la incorporación de fragmentos cromosómicos dentro de cápsidas de fagos, que pueden entonces infectar a células receptoras. Los fragmentos del cromosoma son incorporados en las cápsidas de forma aleatoria, de modo que cualquier marcador del cromosoma del hospedador puede ser transducido a otra célula. Por el contrario, en la transducción especializada el fago se integra en un punto específico del cromosoma y hay una incorporación poco frecuente en el genoma del fago de marcadores cromosómicos próximos a ese

sitio de integración del fago. Por tanto, sólo podrán ser transducidos aquellos marcadores que se encuentren próximos al sitio de integración específico del fago en el cromosoma del hospedador.

La herencia de marcadores ocurre mediante mecanismos diferentes en la transducción generalizada y en la especializada. Un fago transductor generalizado inyecta un fragmento del cromosoma de la célula donante en el citoplasma de la receptora. Este fragmento tiene que incorporarse al cromosoma receptor por medio de la recombinación, utilizando la maquinaria de recombinación de la bacteria. Por tanto, una bacteria receptora rec^- será incapaz de incorporar fragmentos de DNA, y no podrá heredar marcadores mediante transducción generalizada. En cambio, en el caso de la transducción especializada, el mecanismo principal de herencia de marcadores implica la integración de la partícula transductora en el cromosoma del hospedador, en el sitio de integración específico. Esta integración, que en ocasiones requiere la presencia de un fago auxiliar (coadyuvante), es media-