

Evaluación de riesgos de la Transferencia Génica Horizontal en bacterias contaminantes del cultivo *in vitro* de caña de azúcar

Leonardo J. Moreno-Bermúdez*, José Machado-Rodríguez, Yelenys Alvarado-Capó, Mileidy Cruz-Martín. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. CP 54 830. e-mail: ljmoreno@ibp.co.cu

RESUMEN

La transferencia génica horizontal es un fenómeno que debe tenerse en cuenta al realizar las evaluaciones de riesgo en plantas genéticamente modificadas, ya que estas pudieran transmitir por esta vía los transgenes incorporados artificialmente a otros organismos con los que estén en estrecho contacto en el ambiente y afectarlos de alguna manera. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los riesgos de la transferencia génica horizontal en especies bacterianas contaminantes del cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) no transgénica, que en algunos casos coinciden con especies endofíticas y/o habitantes de la rizosfera (de plantas transgénicas). Se determinó la capacidad de transformación natural de catorce cepas de bacterias con un plásmido que contenía genes que confieren resistencia a los antibióticos Ampicilina, Estreptomicina y Espectinomocina, utilizado como vector para la transformación genética de plantas, y a partir del cálculo de las frecuencias de transformación de cada especie se evaluaron los riesgos. Se obtuvieron bacterias transformadas y no transformadas, la menor frecuencia se obtuvo para *Escherichia coli* (0.09×10^{-9}) y la mayor para *Pseudomonas stutzeri* (266.6×10^{-9}). El hecho de que algunas de las bacterias estudiadas hayan sido naturalmente transformables constituye un factor de riesgo, y pueden emplearse como un modelo para estudiar la transferencia horizontal de genes, en caso de encontrarse como endofíticas o asociadas a la rizosfera de plantas que hayan sido modificadas genéticamente, a la hora de realizar las evaluaciones de riesgos a dichas plantas.

Palabras clave: evaluación de riesgos, *Saccharum* spp. híbrido, Transferencia Génica Horizontal.

Risk assessment of Horizontal Gene Transfer in bacterial contaminants of sugarcane *in vitro* cultures

ABSTRACT

The horizontal gene transfer is a phenomenon that must be taken into account when performing risk evaluation of genetically modified plants, because these ones could transmit by this method the artificially incorporated transgenes to other organisms with those they are in strait contact in the environment and affect them somehow. The aim of this study was to evaluate the risks of horizontal gene transfer in bacterial contaminant species of *in vitro* culture of non-transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid), which in some cases coincide with endophytic species and/or residents of the rhizosphere of transgenic plants. It was determined the capacity of natural transformation of fourteen bacterial strains with a plasmid containing genes that confer resistance to antibiotics Ampicillin, Streptomycin and Spectinomycin, used as a vector for plant genetic transformation, and from the calculation of transformation frequencies of each species the risks were assessed. Transformed and non transformed bacteria were obtained. The lower frequency was obtained for *Escherichia coli* (0.09×10^{-9}) and the highest for *Pseudomonas stutzeri* (266.6×10^{-9}). The fact that some of the studied bacteria were naturally transformable is a risk factor for them, and it can be used as a model to study horizontal gene transfer, in case to be found as endophytic or associated with the rhizosphere of plants that have been genetically modified when conducting risks assessments to such plants.

Key words: Horizontal Gene Transfer, risks evaluation, *Saccharum* spp. híbrido.

INTRODUCCIÓN

La modificación genética de plantas se lleva a cabo desde finales de la década de los años 70 del siglo XX (Collazo, 2007) con el propósito de atenuar los problemas que se presentan en la agricultura y la alimentación

a nivel mundial. La ingeniería genética permite obtener variedades transformadas al insertar en estas plantas genes de otras, o de organismos muy alejados de ellas desde el punto de vista evolutivo. En muchos casos se han utilizado genes bacterianos que confieren resistencia a antibióticos como

genes marcadores para la selección de las plantas transformadas (Mercer *et al.*, 1999).

Lo anterior ha propiciado el debate entre científicos de si la nueva variedad pudiera constituir un riesgo para los organismos con los cuales se relaciona en el ambiente, al transmitir por vía horizontal los transgenes incorporados, o afectarlos directamente mediante las proteínas codificadas por estos (Nielsen y Townsend, 2004).

Es necesario entonces, antes de introducir en la naturaleza una planta genéticamente modificada, realizarle evaluaciones de riesgo y un fenómeno que se tiene muy en cuenta en estos casos es la Transferencia Génica Horizontal (TGH), que ha sido estudiada con mayor profundidad en las bacterias (Friesen *et al.*, 2006).

Sería beneficioso contar con especies bacterianas que se puedan utilizar como modelo al evaluar los riesgos de la TGH a partir de plantas transgénicas. Además, también podría ser útil que al realizar las evaluaciones en bacterias endofíticas y/o habitantes de la rizosfera de plantas genéticamente modificadas, ya se conociera el nivel de riesgo al que están sometidas algunas especies por estudios previos sobre TGH efectuados en ellas.

Teniendo en cuenta lo anterior este trabajo tuvo como objetivo evaluar los riesgos de la Transferencia Génica Horizontal en especies bacterianas contaminantes del cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) no transgénica, que en algunos casos coinciden con especies endofíticas y/o habitantes de la rizosfera de plantas transgénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del ADN plasmídico

Para verificar la capacidad de transformación natural de las bacterias seleccionadas para este estudio, se utilizó el plásmido pHCG 59 proveniente de una cepa bacteriana de *Escherichia coli*, XL-1 Blue, con genes de resistencia a los antibióticos Ampicilina, Estreptomina y Espectinomicina. La cepa se inoculó en una placa de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo LB (Luria-Bertani) (Sambrook y Rusel, 2001) al que fueron incorporados los antibióticos en las siguientes concentraciones: Ampicilina (50

µgml⁻¹) 30 µl, Estreptomina y Espectinomicina (100 µgml⁻¹) 15 µl respectivamente.

Para multiplicar y aislar los plásmidos se utilizó el Protocolo de aislamiento de ADN plasmídico (minialcalino) descrito por Sambrook y Rusel (2001), la presencia e integridad de los mismos se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y la concentración fue determinada por espectrofotometría (*BioPhotometer*, Eppendorf), de luz UV a 260 nm (precisión fotométrica: 1.5%, error sistemático fotométrico ±1%).

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas, identificadas como contaminantes del cultivo *in vitro* de caña de azúcar (Alvarado-Capó, 2003) pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), fueron las siguientes:

- CCIBP–Sp105: *Bacillus licheniformis* (Weigmann 1898)
- CCIBP–M65: *Bacillus pumilus* (Meyer y Gottheil 1901)
- CCIBP–M27: *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835)
- CCIBP–E556: *Burkholderia cepacia* (Pallarini y Holmes 1981)
- CCIBP–ER25: *Corynebacterium* spp. (Lehmann y Neuman 1896)
- CCIBP–E523: *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter 1886)
- CCIBP–M29: *Ochrobactrum antropii* (Holmes 1988)
- CCIBP–E267: *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872)
- CCIBP–E437: *Pseudomonas stutzeri* (Lehmann y Neuman 1896)
- CCIBP–E658: *Serratia ficaria* (Grimont, Grimont y Starr 1979)
- CCIBP–E419: *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni y Bradburry 1993)

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias

Se analizó la susceptibilidad de cada cepa bacteriana frente a Ampicilina, Espectinomicina y Estreptomina por el método de difusión en agar (Bauer *et al.*, 1966).

Se tomaron fragmentos de colonias de las bacterias crecidas en medio de cultivo LB por 24 h y se realizaron suspensiones que se ajustaron al 0.5 de Mc Farland. Posteriormente se inocularon 200 µl en

placas de Petri (9 cm de diámetro) con medio de cultivo LB con espátula de Drjigalsky. Una vez seco el medio de cultivo se incorporaron sobre él tres discos de antibiograma (Whatman 3MM), cada uno con uno de los antibióticos en la siguiente concentración: Ampicilina (10 µg), Estreptomina (7.83 µg) y Espectinomicina (10 µg), según lo recomendado por Gavan (1974). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 a 48 h para luego medir el halo de inhibición. La incubación se realizó a la temperatura mencionada ya que se utilizaron como controles las cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 10145 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11775.

En el caso de que algunas cepas presentaran resistencia natural frente a algún/os antibiótico/s, no se evaluó la adquisición de resistencia a estos por TGH en dichas cepas.

TGH de los plásmidos a las bacterias

Con el objetivo de transferir los plásmidos a las bacterias se utilizó el método de Brataas *et al.* (2006) descrito brevemente a continuación:

Concentración de células bacterianas

La concentración de células necesarias (aproximadamente 1×10^7 células/µl de solución salina fisiológica (SSF) al 0.85%) se obtuvo por espectrofotometría a una DO_{600} luz visible. Para ello se realizaron precultivos de las bacterias en medio de cultivo LB a partir de colonias crecidas. Los precultivos se mantuvieron en agitación durante 18 h a 37°C y luego se centrifugaron a 1500 g y se colectó el sedimento de bacterias, que se diluyó con 500 µl de SSF y se tomaron alícuotas para cuantificar en el espectrofotómetro.

Concentración de plásmidos

El valor de la concentración del plásmido pHCG 59 se obtuvo por lectura directa en el espectrofotómetro UV a 260 nm. Se realizó la dilución también con SSF al 0.85% hasta alcanzar de 0.13 a 0.27 µg de ADN/µl.

Procedimiento de la TGH

Se mezclaron 75 µl de solución con el plásmido y solución bacteriana respectivamente, y se

adicionó el volumen total en el centro de una membrana de papel de filtro de 2.25 cm de radio con diámetro de poros 0.22 µm (Millipore), incorporado en una placa de Petri sobre el medio de cultivo LB, para lograr el crecimiento de las bacterias en contacto con los plásmidos. Las placas se incubaron 24 h a 37°C sin ser volteadas.

Como controles positivo y negativo se utilizó una cepa de *E. coli*, XL-1-Blue, (sin el plásmido pHCG 59) con conocida capacidad para adquirir ADN foráneo por transformación. Para cada control se utilizó la misma cantidad de células mencionadas en el volumen de 75 µl de SSF, en el caso del control negativo los 75 µl de solución restantes no contenían los plásmidos a diferencia del positivo que sí lo contenían en la cantidad requerida.

Posterior a la incubación los filtros fueron trasladados al interior de tubos de 50 ml de volumen con 4 ml de SSF al 0.85%. Para desprender las bacterias crecidas sobre el papel de filtro Millipore se utilizó el vórtex durante 30 segundos, y a partir de la suspensión obtenida se hicieron diluciones seriadas base 10 (10^{-1} hasta 10^{-7}).

Para determinar el número de bacterias transformadas se transfirieron 100 µl de los 4 ml de la suspensión obtenida a partir de las bacterias crecidas junto al plásmido, a tres placas de Petri cada una con uno de los antibióticos incorporado al medio de cultivo LB en la siguiente concentración: Ampicilina, 50 µg/ml⁻¹; Estreptomina, 100 µg/ml⁻¹ y Espectinomicina 100 µg ml⁻¹. Se usó la espátula de Drigalsky para diseminar la solución y las placas se incubaron durante 72 h a 37°C para luego contar las colonias crecidas.

Para determinar el número de bacterias totales en los 4 ml de SSF al 0.85% se adicionaron 100 µl de la dilución 10^{-7} en una placa con medio LB sin antibióticos. Fue utilizado el método anterior para diseminar la solución y se mantuvieron las mismas condiciones de incubación.

La frecuencia de transformación de cada especie se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Frecuencia de transformación} = \frac{\text{Número de ufc transformadas}/\mu\text{l}}{\text{Número total de ufc}/\mu\text{l}}$$

Incorporación de plásmidos completos por TGH por parte de las bacterias

Con el objetivo de determinar si las bacterias incorporaron el plásmido completo, de cada placa de Petri utilizada para contar el número de bacterias transformadas y con uno solo de los antibióticos incorporado al medio de cultivo, se seleccionaron tres colonias aisladas (en caso de haber ocurrido transformación), y fragmentos de cada una se inocularon en placas con los otros dos antibióticos por separado, en las concentraciones mencionadas y se incubaron a 37°C durante 24 h.

En el caso de haberse observado crecimiento de colonias bacterianas en presencia de los otros dos antibióticos, se tomaron fragmentos de la colonia original y se inocularon en una placa de Petri, con los tres antibióticos incorporados a la vez en el medio de cultivo LB en las mismas concentraciones. La incubación se realizó a 37°C durante 24 h.

Posteriormente se seleccionaron dos colonias crecidas sobre el medio de cultivo con los tres antibióticos, y se realizaron precultivos para aislar el ADN plasmídico mediante el protocolo mencionado. La presencia de los plásmidos se comprobó mediante electroforesis en gels de agarosa al 0.8% y se tomó como

marcador el plásmido pHCG 59 aislado de la cepa de *E. coli* XL-1 Blue.

Evaluación de riesgos de la TGH de ADN plasmídico en las especies bacterianas estudiadas

La evaluación se realizó de forma cualitativa sobre la base de los resultados a partir del cálculo de la frecuencia de transformación de cada cepa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias

En la Figura 1 se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos en algunas especies. Se observó resistencia de forma natural frente a Ampicilina y Espectinomicina en *Bacillus pumilus* (CCIBP-M65) (Fig. 2a), frente a Estreptomicina en *E. coli* ATCC (Fig. 2b), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (Fig. 2c) y *Ochrobactrum antropii* (CCIBP-M29) que también fue resistente a Espectinomicina. Los demás aislados presentaron susceptibilidad intermedia y/o sensibilidad frente a los tres antibióticos con diámetros de inhibición desde 10 mm hasta 55 mm (Fig. 2d). Todos los resultados de las pruebas de susceptibilidad se muestran en la tabla 1.

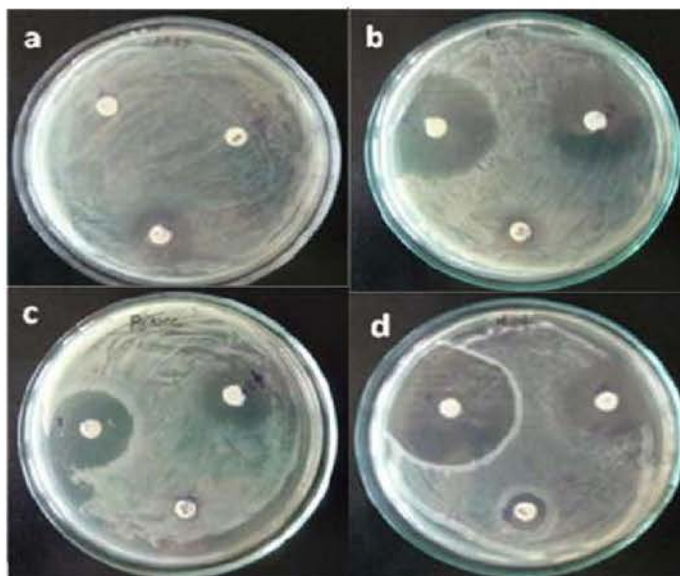


Figura 1. Placas de Petri donde se observa la presencia o no del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos de antibiograma. a: *Bacillus pumilus* (CCIBP-M65), b: *Escherichia coli* ATCC 10145, c: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11775, d: *Stenotrophomonas maltophilia* (CCIBP-E419).

Tabla 1. Diámetro del halo de inhibición (mm) del crecimiento de bacterias contaminantes del cultivo *in vitro* de caña de azúcar frente a diferentes antibióticos.

Cepa	Ampicilina	Espectinomicina	Estreptomicina
<i>Bacillus licheniformis</i> CCIBP-Sp105	S (33)	S (22)	S (15)
<i>Bacillus pumilus</i> CCIBP-M65	R (0)	R (0)	S (19)
<i>Bacillus subtilis</i> CCIBP-M27	S (39)	S (24)	I (12)
<i>Burkholderia cepacia</i> CCIBP-E556	S (30)	S (22)	S (19)
<i>Corynebacterium</i> spp. CCIBP-ER25	S (40)	S (22)	S (19)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10145	S (33)	S (24)	R (10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCIBP-E523	S (42)	S (23)	I (12)
<i>Ochrobactrum antropii</i> CCIBP-M29	I (12)	R (13)	R (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCIBP-E267	S (55)	S (20)	S (16)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 11775	S (25)	I (15)	R (0)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCIBP-E437	S (32)	S (22)	I (13)
<i>Serratia ficaria</i> CCIBP-E658	S (31)	S (22)	I (14)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CCIBP-E419	S (55)	S (21)	S (15)
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue) (Control)	S (33)	S (22)	S (19)

R=Resistente, I=Intermedio, S=Susceptible

TGH de los plásmidos a las bacterias

Se observó crecimiento de las bacterias en contacto con los plásmidos en todos los casos. Al evaluar el crecimiento de cada cepa en presencia de cada antibiótico luego de haber propiciado la transformación, algunas cepas se transformaron y otras no. La mayoría de las especies transformadas lo hicieron indistintamente para uno u otro antibiótico. Solamente *S. maltophilia* (CCIBP-E419) no se transformó para ninguno, no sucedió así con *B. subtilis* (CCIBP-M27) y *P. aeruginosa* (CCIBP-E267) que adquirieron secuencias génicas que les confirieron resistencia a los tres. Los resultados de las frecuencias de transformación calculadas para cada especie pueden observarse en la tabla 2. La mayor frecuencia se obtuvo para *P. stutzeri* (CCIBP-E437) y la menor para el control positivo de *E. coli* (XL-1-Blue).

Incorporación de plásmidos completos por TGH por parte de las bacterias

Solamente seis colonias crecieron en presencia de los otros dos antibióticos diferentes a aquel para el cual se

transformaron. Estas colonias fueron: dos de *B. subtilis* (CCIBP-M27) crecidas en las placas con Espectinomicina y Ampicilina respectivamente, dos de *K. pneumoniae* (CCIBP-E523) crecidas en la placa con Estreptomicina y dos de la placa donde crecía *E. coli* ATCC con Espectinomicina.

En la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con las muestras de ADN plasmídico aislado de estas seis colonias, se observaron diferentes patrones de bandas en el gel (Fig. 3) que en algunos casos coincidieron con los patrones de bandas del control (plásmido pHCG 59) y en otros no (ejemplo: Fig. 2D).

El hecho de que algunas bacterias se transformaran y otras no, como es el caso de *S. maltophilia* (CCIBP-E419), además de a sus capacidades individuales de transformación, pudo deberse a que la transformación natural por la cual puede ocurrir la TGH es un fenómeno que ocurre al azar (De Vries y Wackernagel, 2004). Esta explicación también es válida para la adquisición de secuencias génicas de resistencia a uno u otro antibiótico indistintamente en las cepas transformadas.

Tabla 2. Frecuencias de transformación de cepas bacterianas contaminantes del cultivo *in vitro* del caña de azúcar, con el plásmido pHCG 59 de *Escherichia coli* (XL-1 Blue) que contiene secuencias génicas de resistencia a antibióticos.

Cepas	Frecuencias de transformación (ufc/ μ l x 10 ⁹)		
	Amp.	Esp.	Est.
<i>Bacillus licheniformis</i> CCIBP-Sp105	0	0	13.75
<i>Bacillus pumilus</i> CCIBP-M65	RN	RN	0
<i>Bacillus subtilis</i> CCIBP-M27	1.67	0.33	17.62
<i>Burkholderia cepacia</i> CCIBP-E556	12.37	13.50	0
<i>Corynebacterium</i> spp. CCIBP-ER25	0	138.50	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10145	0	0.73	RN
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCIBP-E523	0	0	1.17
<i>Ochrobactrum antropii</i> CCIBP-M29	0	RN	RN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCIBP-E267	13.50	0	5.80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 11775	0	0	RN
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCIBP-E437	151.6	266.0	11.33
<i>Serratia ficaria</i> CCIBP-E658	0	0	0.70
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CCIBP-E419	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue) (Control positivo)	0	0.09	0
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue) (Control negativo)	0	0	0

RN: Resistencia natural, ufc: unidades formadoras de colonias, Amp.: Ampicilina, Esp.: Espectinomicina, Est.: Estreptomocina

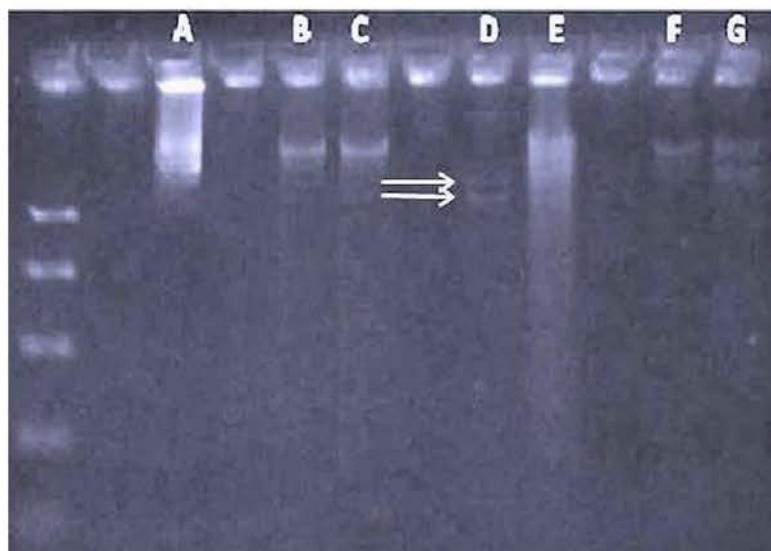


Figura 2. Gel de agarosa al 0.8 % donde se observan bandas de ADN plasmídico ubicadas en diferentes posiciones. A: bandas del plásmido pHCG 59 de *Escherichia coli* (XL-1 Blue) utilizado como patrón, B y C: bandas de plásmidos de dos colonias de *Klebsiella pneumoniae* (CCIBP-E523) crecidas en Estreptomocina, D y E: bandas de plásmidos de colonias de *Escherichia coli* ATCC 10145 crecidas en Espectinomicina, F y G: bandas de plásmidos de colonias de *Bacillus subtilis* (CCIBP-M27) crecidas en Espectinomicina y Ampicilina respectivamente.

La transformación de especies bacterianas en la naturaleza tiene lugar a frecuencias bajas (Gebhard y Smalla, 1999), menores de 1×10^{-7} transformantes por recipientes según Nielsen y Townsend (2004). También en condiciones de laboratorio se obtienen bajas frecuencias de transformación en organismos procariontes (Kay *et al.*, 2002). Si se tiene en cuenta todo lo anterior las frecuencias de transformación obtenidas en el presente estudio para cada cepa bacteriana pueden considerarse bajas.

La no correspondencia entre las bandas de ADN plasmídico del patrón utilizado y las bandas de ADN plasmídico de las colonias mencionadas, pudo deberse a que el plásmido una vez en el interior de las células transformadas, al adoptar la isoforma circular haya perdido secuencias génicas, lo cual pudo afectar su tamaño original (Tortora, 1997).

Evaluación de riesgos de la TGH de ADN plasmídico en las especies bacterianas estudiadas

Aunque las cepas bacterianas estudiadas se hayan transformado a frecuencias bajas, existen riesgos para ellas ya que pueden adquirir por TGH secuencias de ADN foráneo y luego transmitirlo a otros organismos con los que puedan interactuar.

Especies como *Bacillus licheniformis* y *Corynebacterium* spp. al ser habitantes de la rizosfera de plantas transgénicas según Siciliano y Germida (1999) y comportarse como transformantes naturales en este trabajo, pueden ser tomadas como base para fundamentar la medidas de bioseguridad en plantas modificadas genéticamente que tengan asociadas de una u otra forma a estas especies. Aunque los autores citados no identifican especies particulares del género *Pseudomonas* que sean endofíticas o rizosféricas, los resultados con las especies de este género también pueden ser tomados en consideración, mayormente con *P. stutzeri* que mostró la frecuencia de transformación más elevada y que ha sido también estudiada por Lorenz y Wackernagel (1994) en relación a la THG.

También constituye un factor de riesgo el hecho de que algunas cepas hayan podido incorporar el plásmido de forma completa, si se considera que este vector presenta genes de resistencia a tres antibióticos, y que vectores semejantes se

podieran emplear para la transformación genética de plantas.

Este trabajo muestra la posibilidad que existe de liberar hacia el campo, junto a las plantas transgénicas, una microbiota ya transformada en el caso de las que coinciden con las endofíticas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta investigación fue llevada a cabo con un vector artificial, el cual puede facilitar la aceptación del ADN por las bacterias llamadas naturalmente competentes (Bensasson *et al.*, 2004) y en condiciones *in vitro* óptimas para el proceso, donde no influyen los factores del ambiente natural en el que se desarrollan las plantas genéticamente modificadas, por tal razón los riesgos para las especies estudiadas pudieran variar.

CONCLUSIONES

Las posibilidades de transformación natural que presentan las cepas estudiadas fueron bajas, no obstante, la capacidad que presentan algunas de estas bacterias para incorporar ADN foráneo, constituye un factor de riesgo en caso de que se relacionen con plantas genéticamente modificadas tanto en el cultivo *in vitro* como en el campo, por la posible transmisión, a otros microorganismos, de transgenes que puedan adquirir por TGH.

REFERENCIAS

- Alvarado-Capó, Y (2003) Incidencia, identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 98 pp
- Bauer, AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 6-493
- Bensasson, D, Boore JL, Nielsen KM (2004) Genes without frontiers? Heredity. 92: 483-489
- Brataas, IO, Eggert J, Gronsberg IM, Ray JL, Jacobsen CC, Nielsen KM, Nordgaard L, Quist D, Utne A (2006) Holistic foundations for Assessment and Regulation of Genetic Engineering and Genetically Modified Organisms – A Laboratory Manual. University of Tromso Editorial, Tromso, Noruega, 45 pp

- Collazo Oduardo, F (2007) La modificación genética de los cultivos: ¿un nuevo paradigma para la agricultura? En: publicación: Boletín Electrónico ISRI no. 17. ISRI, Instituto Superior de Relaciones Internacionales Raúl Roa García, La Habana, Cuba: Cuba
- De Vries, J, Wackernagel W (2004) Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil*. 266: 91-104
- Friesen, TL, Stuckenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Asmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Natur. Gen.* 38(16): 953- 956
- Gavan, T (1974) Prueba *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana. *Clin. Med. Nort. Amer.* 58: 493-504
- Gebhard, F y Smalla K (1999) Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 261–272
- Kay, E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P (2002) *In situ* transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 3345-3351
- Lorenz, MG, Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58: 563-602
- Mercer D, Scott K, Bruce-Johnson A, Glover L y Flint H. (1999) Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 6-10
- Nielsen, KM y Townsend JP (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 22(9): 1110-1114
- Sambrook, J, Rusell DW (2001) Apéndice 2: Media; Capítulo 1: Plasmids and their usefulness in molecular cloning. En: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor, New York
- Siciliano, SD, Germida J (1999) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microb. Ecol.* 29: 263-272
- Tortora, GJ (1997) *Microbiology: an introduction*. Six Edition pp 232-237. Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, California

Recibido: 4-1-2012
Aceptado: 28-2-2012