

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE UNA CEPA DE STREPTOMYCES
COELICOLOR CON EL GENE CROMOSOMAL DE
HIS A1 EN EL PLASMIDO SCP1

138

T E S I S
Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a
FRANCISCO JAVIER FLORES VERDUGO

México, D. F.

1976



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis
1976
Ul

159



A mis padres y amigos:

A Lucy:

Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE:	NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA
VOCAL:	ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
SECRETARIO:	FRANCISCO BOLIVAR ZAPATA
1ER. SUPLENTE:	JORGE SOTO SORIA
2DO. SUPLENTE:	GERARDO KONO YALCO

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.

Sustentante:

FRANCISCO JAVIER FLORES VERDUGO

Asesor del tema:

FRANCISCO BOLIVAR ZAPATA

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	6
MATERIAL.....	15
METODOS.....	17
RESULTADOS.....	27
a) Verificación del genotipo de las cepas de <u>S. coelicolor</u>	27
b) La inhibición del micelio.....	27
c) Obtención y cuantificación de las esporas.....	28
d) Cruzas y obtención de recombinantes.....	29
e) Curva de supervivencia de la cepa 12 IF a la luz UV.....	31
f) Aislamiento de la SCP1-His A1.....	32
DISCUSION.....	33
TABLA 1.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	38

INTRODUCCION:

En la investigación actual sobre genética de microorganismos es importante destacar el hecho que el enfoque de este tipo de investigación se ha realizado sobre un número muy reducido de microorganismos como son principalmente E. coli, Salmonella typhi, y otras enterobacterias y se han discriminado, desafortunadamente, --- otros microorganismos que ofrecen particularidades genéticas y fisiológicas muy interesantes como son, para mencionar algunas, las espiroquetas, mixobacterias, las algas azul-verdes y otras más.

Considerando que E. coli y Streptomyces coelicolor se localizan en los extremos evolutivos dentro de los procariotes, podemos suponer que las similitudes en estructura y comportamiento del cromosoma de Streptomyces coelicolor y el de E. coli, lo más probable es que persistan en los procariotes intermedios. Estas similitudes se pueden ver comparando los mapas genéticos de ambos (Fig. 6,7).

El mapa genético de S. coelicolor (Fig. 6), resulta muy parecido a los de S. glaucescens, S. rimousus, y S. bikiniensis.

Para resolver esta cuestión se han obtenido -- resultados como son:

- i) Ambos producen cigotos que son merocigotos, es decir, parcialmente diploides.
- ii) Poseen un solo cromosoma (1) que es circular (2).
- iii) Locus funcionalmente relacionados están frecuentemente cercanos en el genoma. (En Streptomyces coelicolor se encuentran también a 90° y 180°). ----

Estas características se han observado también en otras bacterias así como el hecho de que no se ha encontrado ningún Procariote que manifieste una diploidia completa en su cigoto. Salmonella typhimurium (3, 4) presenta también un cromosoma circular.

En este trabajo se desea aislar a partir de -- una cepa de Streptomyces coelicolor que posea un plásmido SCP1 (ADN extracromosomal de replicación autónoma); -- una cepa con el mismo plásmido pero con un fragmento de ADN cromosomal integrado, precisamente el que codifica -- para His A1. Esta cepa desde ahora denominada SCP1' por su analogía con el F' de E. coli, presenta la caracte-- rística de donar el alelo His+ con una alta eficiencia a un receptor His A1⁻ de la misma especie.

El motivo por el cual se realizó este experi-- mento fué, a grandes rasgos, lograr purificar un gene -- (His A1) cromosomal integrándolo al plásmido SCP1 de --- Streptomyces coelicolor. La continuación de este proyec-- to consistiría en formar un plásmido compuesto (por el mé-- todo de los "extremos pegajosos") con el plásmido Col E1 de E. coli, formado éste, se intenta estabilizarlo en -- una cepa receptora E. coli Col E1⁻, His A1⁻ y de esta -- manera se logra concentrar un gene proveniente de otra -- especie de microorganismo y lograr que se exprese. (En -- la sección de DISCUSION se explicará ampliamente esto).

MECANISMOS DE INTERCAMBIO GENETICO:

Se conocen actualmente 3 mecanismos en proca-- riones para el intercambio genético y son:

Conjugación

Transducción

Transformación

Conjugación:

La capacidad de conjugación está determinada -- por la presencia de ADN's circulares extracromosomales a

los que denominamos plásmidos o episomas (esto es lo que se observó en las bacterias usualmente estudiadas como E. coli y Salmonella typhi, pero en nuestro caso, resulta que incluso las que no poseen esta característica, si tienen, aunque en muy baja frecuencia, la capacidad de donar material genético) y que pueden replicarse en forma independiente del cromosoma bacteriano (5,6), los cuales pueden ser transferidos con alta frecuencia durante la conjugación.

Estos ADNs extracromosomales están íntimamente relacionados con otros elementos extracromosomales como son los profagos (7), factores responsables de la producción de colicinas (8) o inhibición de micelio aéreo y la resistencia extracromosomal a antibióticos. Hay evidencias que indican que estos factores se pueden localizar de 2 maneras diferentes, una en forma autónoma y otra integrada al cromosoma (9).

A las cepas que actúan como donadoras se les denomina cepas macho y son las que poseen este factor extracromosomal; a las receptoras se les denomina hembras y carecen de dicho factor. En el caso de E. coli, uno de estos factores es el episoma F (fertilidad) y representa aproximadamente el 1% del cromosoma bacteriano en tamaño denominándose F^+ a la cepa que lo posee. Este episoma codifica para una proteína denominada pilina, la cual se ensambla para formar una estructura llamada pili adicional a la célula, que viene a ser el puente por donde se va a transmitir el ADN hacia la cepa receptora F^- (10) (Fig. 1).

El factor F en un momento dado puede integrarse al cromosoma mediante un mecanismo de recombinación y ahora a esta cepa se le denomina Hfr (alta frecuencia de recombinación). Esta cepa tiene la propiedad de transmitir ADN cromosomal al receptor, permaneciendo el factor

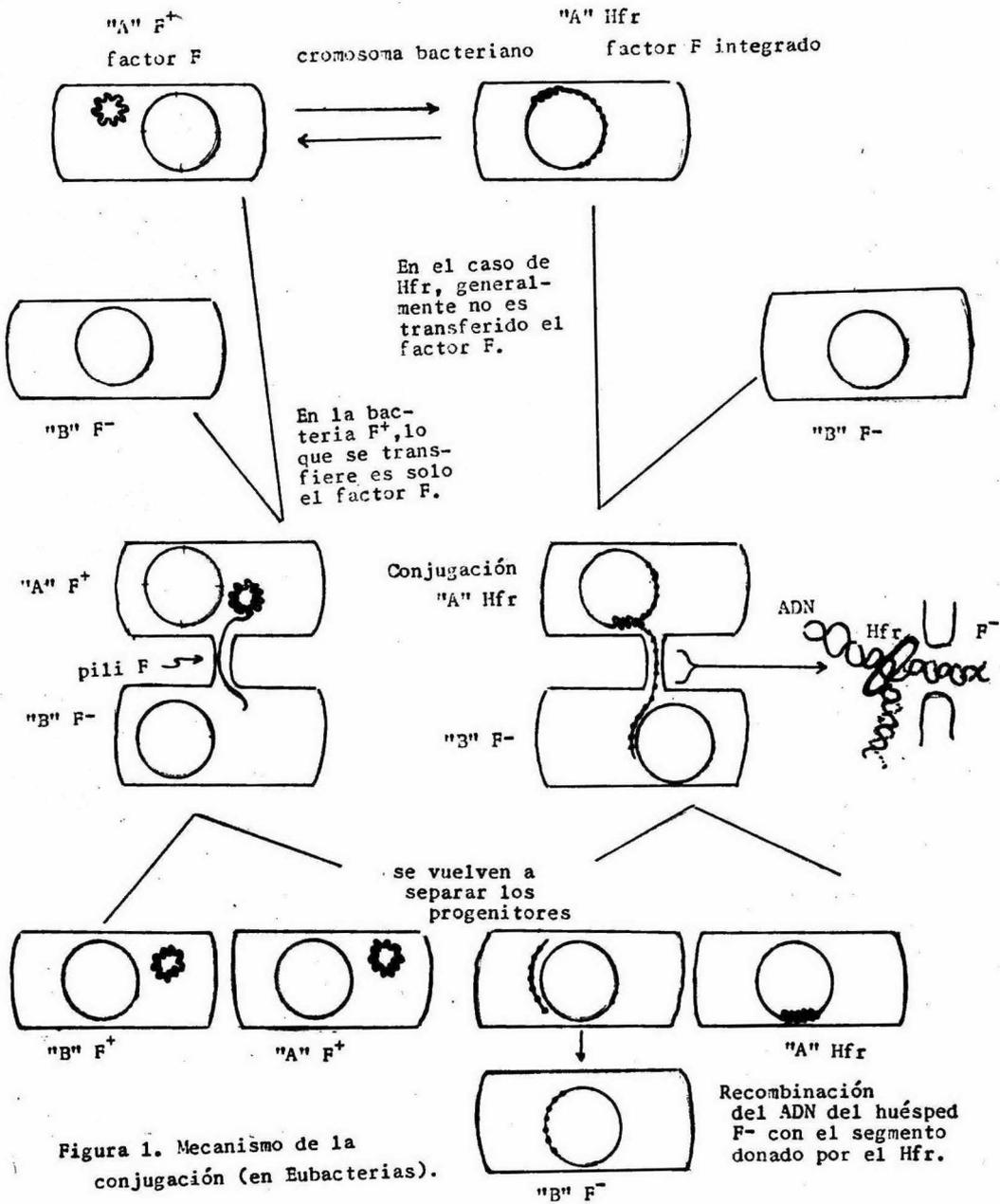


Figura 1. Mecanismo de la conjugación (en Eubacterias).

F en el extremo terminal del cromosoma y rara vez es --- transferido, ya que el puente formado por el pili es susceptible a la ruptura y así terminada la transferencia, permaneciendo la receptora como F^- . Cuando el factor -- F es autónomo lo único que se transfiere en E. coli, es dicho factor, convirtiéndose la hembra ahora en F^+ y --- por lo tanto en macho (Fig. 1).

El mecanismo de conjugación se presenta entre - cepas de la misma especie o en baja frecuencia entre especies filogenéticamente muy parecidas. (Tabla 1).

Transducción:

Este mecanismo se hace mediante bacteriófagos y consiste a grandes rasgos en lo siguiente:

Después de la lisis de una bacteria causada -- por la infección por un fago transductante, se rompe el ADN cromosomal de dicha bacteria y fragmentos de este -- ADN del tamaño del ADN viral pueden llegar a ser engloba dos dentro de las cápsidas de partículas virales, y el o los genes así secuestrados pueden ser incorporados al -- cromosoma de una segunda bacteria, por un proceso de re-combinación, por medio de una segunda infección con es-- tos pseudofagos. (Fig. 2).

Se conocen 2 tipos de fagos transductantes:

Generalizados

Especializados

Los primeros pueden ser portadores de cualquier parte del cromosoma bacteriano, ya sea por poderse inte- grar en cualquier sitio del cromosoma bacteriano como el caso de $\mu-1$ o nunca se integra, como en el caso de P_1 , el cual en la fase tardía de la infección produce nuclea sas que degradan el cromosoma bacteriano en diversos - -

fragmentos, algunos de los cuales son englobados por las cápsidas de dicho fago.

En la transducción especializada se caracteriza por ser solo determinados genes cromosomales los que son transferidos y son los que se encuentran vecinos al sitio donde se integró el fago al cromosoma (profago), - siendo este sitio específico.

Por ejemplo, el fago lamda de E. coli que se integra en el minuto 17.4 del cromosoma de E. coli K-12 (25), y solo permite la transducción para genes del operón de la galactosa y por otro lado, genes del operón de la biotina, ambos vecinos de dicho minuto.

El S. coelicolor por su crecimiento micelar, - trae como consecuencia, células con diversos estados fisiológicos, resultando desfavorable para la multiplicación viral, los estreptomicetos son por lo tanto susceptibles al fenómeno denominado pseudolisogenia (11). -- Un fago virulento usualmente sólo llega a lisis parte -- del cultivo hasta encontrar una resistencia por las células. La lisogenia ha sido demostrada en diversos estreptomicetos (12), los fagos temperados involucrados, - con excepción del VP5 y otros 2 fagos, fueron derivados de un cultivo lisogénico que demostró traer un profago - por la producción de placas en una cepa sensitiva.

Desafortunadamente la transducción en streptomices aún no se ha logrado, aunque el primer reporte sobre transducción en estreptomicetos que fué en S. olivaceus (13) no nos dejó un sistema reproducible y los intentos preliminares de demostrar transducción por VP5 en S. coelicolor 12 IF dieron resultados negativos. Es --- probable debido a que se han aislado algunos fagos temperados para esa cepa que la transducción sea una reali-

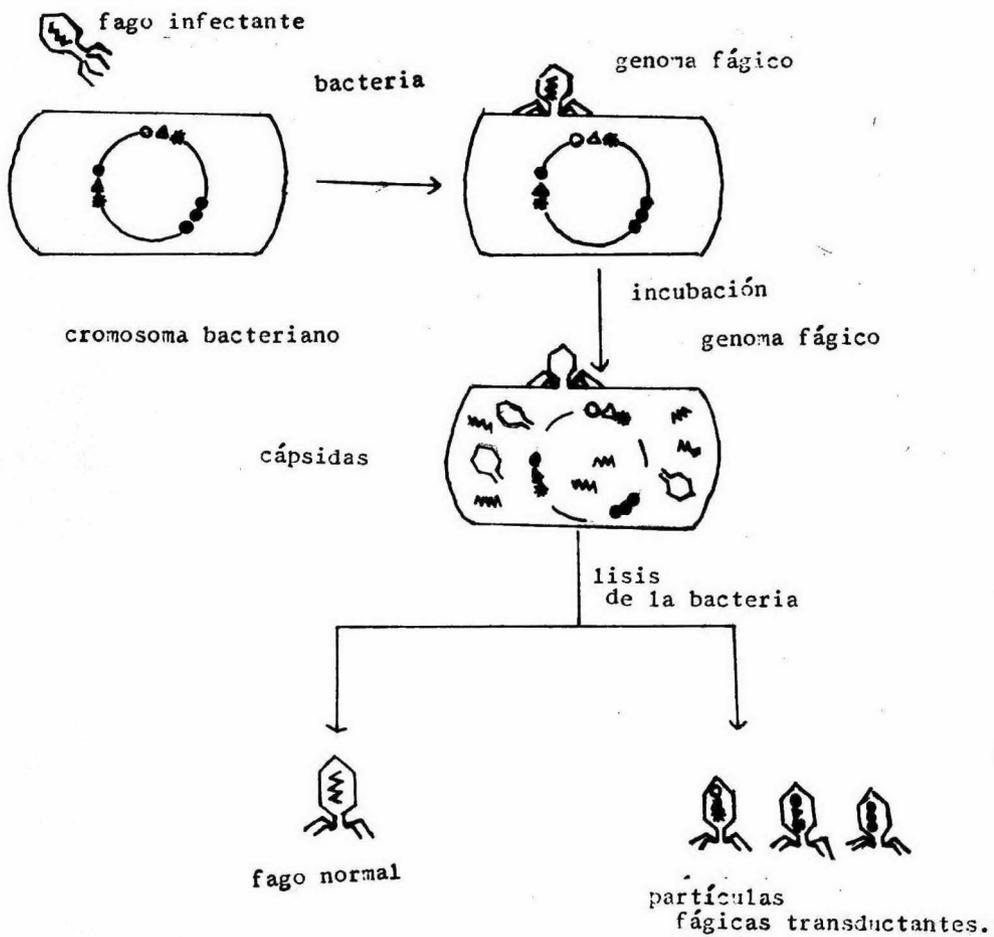


FIGURA 2: MECANISMO DE LA TRANSDUCCION.

dad en un futuro próximo.

Transformación:

La transformación consiste en la purificación del ADN de la donadora y que este sea incorporado, estabilizado y replicado en la célula receptora.

Este fenómeno fué descubierto por Griffith (14) al estudiar la inmunidad a infecciones por neumococo en ratones, de la siguiente manera:

Inyectando neumococos lisos vivos subcutáneamente en ratones observó que estos morían a los 2 días, sin embargo, cuando inyectaba estos mismos neumococos pero -- muertos, no les pasaba nada, igual que al inyectar neumococos vivos pero rugosos; sin embargo, si inyectaba en el mismo ratón, neumococos lisos muertos y rugosos vivos, el animal moría y se aislaban neumococos lisos vivos; sin embargo, no fue sino hasta 1944 cuando Avery, Macleod & Mc. Cartey (15) determinaron que el agente causante era ADN, -- el que era liberado al medio por la bacteria muerta -- (Fig. 3).

GENERALIDADES DE: S. Coelicolor:

1.- Algunas características morfológicas de S. coelicolor.

S. coelicolor pertenece al grupo de los procariotes, es una bacteria, aunque morfológicamente se le consideraba como un hongo (Actino: filamento, myces: hongo) pertenece al: Orden: Actinomycetales (para diferenciarse de los Eubacteriales).

Familia: Actinomycetaceae

Género: Streptomyces

Especie: coelicolor

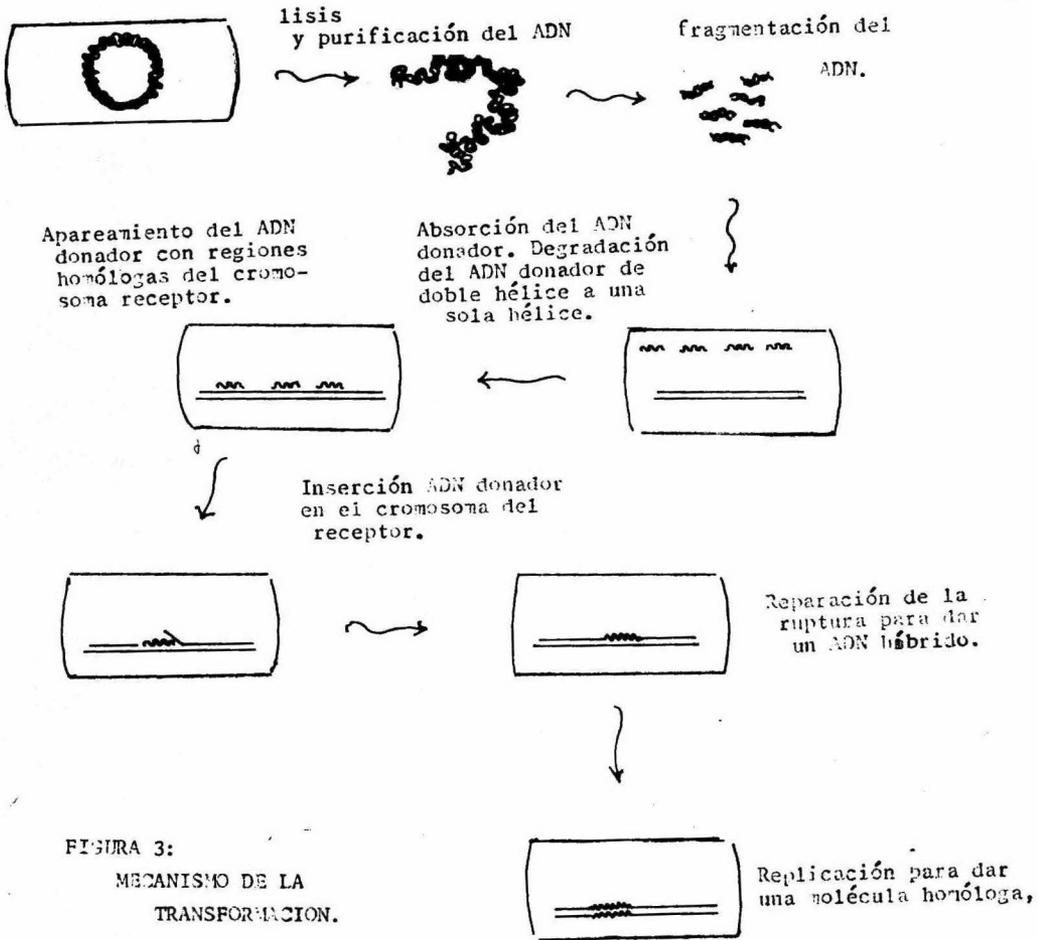


FIGURA 3:
 MECANISMO DE LA
 TRANSFORMACION.

El nombre de Streptomyces fué dado por Waksman & Henrici en 1943; proviene de la concentración de otros 2 géneros: Streptothrix Cohn (1875) y Actinomyces Harz (1877). El género se caracteriza por un micelio vegetativo no tabicado y su multiplicación es por conidias, que constituyen - cadenas en el micelio aéreo (ver fig. 4).

La especie coelicolor se refiere al pigmento que libera al medio; aunque Erikson aisló variedades de S. coelicolor que no liberan pigmentos.

El pigmento producido por S. coelicolor fué estudiado inicialmente por Müller en 1908. Es un pigmento ---- azul-oscuro, pero si el medio es ácido, se vuelve rojo; es difusible y químicamente, probablemente (según Waksaman) -- pertenezca al grupo de las anthocianinas; Cohn considera -- al pigmento similar a la azolitmina (16).

2.- Estudios genéticos en S. coelicolor.

Los estudios genéticos en S. coelicolor, se han - realizado en 3 áreas:

- (a) El sistema de fertilidad
- (b) La diferenciación colonial
- (c) Interacción entre bacteriófagos y estreptom*i*cetos.

La transferencia genética en S. coelicolor ocurre por un proceso descrito como "conjugación" dando como resul- tado la transferencia de segmentos largos de ADN; pero esto no implica forzosamente una analogía estructural a la conju- gación que ocurre en bacterias Gram negativas. El proceso se parece a la producción de merocigotos, conteniendo un -- cromosoma circular de uno de los padres y fragmentos de ta- maño variable del otro. En estudios experimentales las --- cruzas se hacen mezclando esporas de los padres en medio -- sólido, el apareamiento ocurre entre las hifas producidas -

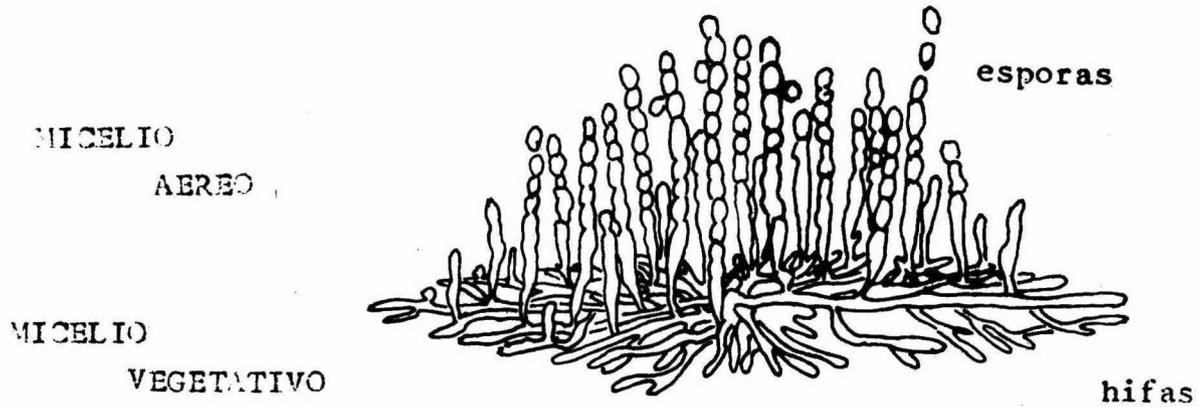


FIGURA 4: Estructura de Streptomyces coelicolor

después de la germinación de las esporas y el resultado --- de la cruza se estudia analizando la progenie de esporas -- (ocasionalmente las hifas fragmentadas) producidas tras la mezcla de micelios, pues las esporas por sí solas no se -- aparean, por eso cuando un medio de cultivo líquido se utiliza como en el caso de la conjugación de eubacterias Gram negativas, las dificultades de manejo de los agregados micelares heterogéneos como resultado de la germinación de -- las esporas, ofrecen un problema que probablemente en un -- futuro cercano podrá ser resuelto.

Las esporas cosechadas provenientes de una cruza incluye recombinantes y miembros de los 2 padres, por lo - que es necesario, para que sea posible el estudio de las - recombinantes, seleccionar varias clases genotípicas en un medio donde ninguno de los padres se pueda desarrollar.

Para explicar los eventos subsiguientes se han - formulado 2 hipótesis:

(a) Si las recombinaciones entre el cromosoma - circular y el fragmento que se introdujo se lleva a cabo - en su totalidad, es decir, si ocurre en número par de en- - trecruzamientos entre el fragmento del donador y el cromosoma del receptor, se producen recombinantes haploides di- - rectamente.

(b) Y en el caso que no sea así, es decir, que no hubo un número par de recombinaciones, como consecuen- - cia se forman genomas parcialmente diploides, aunque sub- - secuentes oportunidades de recombinación ocurren en dichas regiones duplicadas del genoma, dejando finalmente una pro- - ducción de recombinantes haploides. Sin embargo, cuando - el genoma heterocigoto está incluido en una espóra, se de- - sarrolla una colonia que aún tiene descendientes heteroci- - gotos que finalmente darán una variedad de recombinantes - haploides debido a las diferentes recombinaciones que se -

van llevando a cabo en la zona diploide, por ello a este tipo de colonias se les denomina heteroclonas.

Con respecto al sistema de fertilidad, los tipos de fertilidad van a estar en función de la presencia o ausencia del plásmido SCP1 y en caso de estar presente de si está o no integrado al cromosoma y estos son los términos:

IF fertilidad inicial	SCP1 en forma autónoma
NF fertilidad normal	SCP1 integrado al cromosoma
UF ultrafértil (como receptora)	SCP1 ausente.

Avances Técnicos en la genética del *S. coelicolor*.

1.- Métodos Mutagénicos

La mutagénesis con luz ultravioleta (UV) se puede llevar a cabo en condiciones normales de iluminación ya que este microorganismo no es susceptible a la fotorreactivación, y para obtener una sobrevivencia del 1% la radiación varía de 2000 a 4000 ergs/mm² dependiendo de la cepa.

Mutagénesis con N-methyl-N-nitrosoguanidina (NTG).

Las esporas de la mayoría de los estreptomicetos resultan ser algo más resistentes a la NTG que el resto de las bacterias, por lo que para la mutagénesis efectiva con NTG es necesario una mayor concentración de este reactivo a un pH alcalino. Un tratamiento intensivo consiste, incubación por 2 h. en 0.05M de tris (hidroximetil) aminometano ac. maleico a pH 9 conteniendo un regulador y 3 mg. de NTG por ml; en un tratamiento regular se usan 1 mg./ml por 1 h.

Aislamiento de mutantes.-

Algunas mutantes de este microorganismo se han aislado gracias a variaciones en sus características morfoló

gicas, como por ejemplo, se han obtenido colonias blancas facilmente reconocibles a simple vista, denominadas mutantes whi(white:blanco) que son defectuosas en la esporulación.

La cepa A3(2) puede crecer en un medio con agar sin fuente de carbono, o sea que la utilización del agar como fuente de carbono trae como consecuencia el no poder utilizar el método de replicación para determinar mutantes defectuosas en determinado marcador que sea la fuente de carbono. Sin embargo, se han obtenido mutantes que -- crecen con glucosa y no en medio sin glucosa pero con -- agar; usando estas mutantes que poseen una mutación en el locus agaA, es posible determinar otras mutaciones para -- diversas fuentes de carbono.

EL SISTEMA DE FERTILIDAD.

La cepa con que trabajó Hopwood, o sea la A3(2) proviene de la cepa S. coelicolor 3443 de Waksman (17).

El resto de las cepas las obtuvo por mutacion-- es o conjugación de la A3(2).

Con las primeras conjugaciones que se trabaja-- ron la frecuencia de recombinación era igual, pues la --- contribución de material genético de los progenitores a -- la progenie era igual, además de que en estos casos cada progenitor tenía la misma probabilidad de actuar tanto -- como donador como receptor (se considera receptor, al que contribuye con todo su genoma al cigoto, en tanto que donador es el aportador de fragmentos de su genoma: por lo que el cigoto inicial es merodiploide).

Los primeros que trataron de determinar el sistema de fertilidad del S. coelicolor fueron Sermoniti y --

Casiano (18) al encontrar cepas que tenían frecuencias de recombinación diferentes, designando R^- (R = recombinación) a las semiestériles, y a otras R^+ por resultar sumamente fértiles tanto entre ellos como con R^- , incluso llegaron a sugerir algún parecido en comportamiento con las F^+ y F^- de E. coli K-12 (19). Sin embargo, se desconocía mucha información del mapa genético de este organismo y que daban dudas de su mecanismo de fertilidad. No fué sino hasta que Hopwood, tratando a la A3(2) con métodos mutagénicos, principalmente UV, se dedica a la búsqueda de las cepas con fertilidad alterada.

Tras de irradiar con UV, sembrar, poner a conjuguar y replicar en cajas selectivas, pudo determinar -- que había colonias que recombinaban un 100%, o sea extremadamente receptoras, a las que denominó UF (ultrafertilidad) y a las otras NF (fertilidad normal). A la cepa original A3(2) se le denominó IF por el hecho de ser -- la primera con la que se trabajaron conjugaciones -- -- (IF = fertilidad inicial).

Naturaleza de las cruzas:

En una cruzada NFxUF, como ya habíamos dicho con anterioridad, se considera la NF que actúa como donadora de fragmentos de su genoma, mientras que la UF contribuye con todo su genoma, siendo entonces la receptora, constituyendo ambos el cigoto merodiploide; toda la progenie en este caso resulta ser NF.

También se observó que la frecuencia de conjugación va disminuyendo hacia ambos lados de donde se supone es el sitio de inserción del plásmido o sea a las 9 h. -- del mapa genético, por lo que concluyó que la transmisión es bidireccional. En la figura 5 se puede observar la -- frecuencia con que se transfieren los marcadores de una --

NF a una UF.

Como habíamos dicho antes, una cruce $NF \times UF$ da un 100% de recombinantes y todas NF.

En una conjugación $NF \times NF$ también se obtienen -- recombinantes; pero en este caso cualquiera de los 2 en un momento actúa como donador y en otro como receptor, -- siendo la población recombinante de el 1%.

En una cruce $IF \times UF$ el número de recombinantes es de sólo el 0.01%, pero el factor determinante de la fertilidad (el SCP1) es transferido 10,000 veces más que los marcadores cromosomales; este es un dato importante para poder diferenciar una IF de una NF. Toda la progenie resulta IF.

En una cruce $IF \times NF$ se tiene un 10% de recombinantes, obteniéndose progenie IF y NF.

Es importante destacar el hecho de que en una conjugación $UF \times UF$ sí existe conjugación, aunque a una frecuencia muy baja (0.001%), cosa que no sucede en E. coli entre dos F^- , en nuestro caso la posibilidad conjugante no va estar determinada por la presencia o ausencia -- del plásmido SCP1, del cual hablaré más adelante, como -- lo está en E. coli, con la presencia o ausencia del plásmido F.

En las cruces $NF \times NF$, $UF \times UF$, $IF \times IF$, cualquiera de los progenitores puede actuar tanto como donador como receptor; en los otros casos es clara la situación.

En otros estudios se observó que el factor que transformaba una cepa UF al cruzarse con una IF en otra IF era el plásmido SCP1 y que era susceptible a perderse --

en forma espontánea transformándose de una cepa IF en una UF (0.3%); esta pérdida puede ser acentuada con irradiación lo que le dá carácter autónomo en las IF.

Más tarde se averiguó que el plásmido SCP1 se -- encontraba integrado en las NF a las 9 h. del cromosoma -- (Fig. 5, 6).

El plásmido permite a las cepas que lo poseen la síntesis de un inhibidor del micelio aéreo de las cepas que no lo poseen y ser ellos resistentes a dicha inhibición (observese en la sección de RESULTADOS).

En una cruce IFxUF no siempre hay una diferencia significativa en fertilidad como en una UFxUF; en cambio -- en una cruce NFxUF es claro que la presencia del plásmido - SCP1 integrado en el cromosoma confiere una alta frecuencia de conjugación.

PRIMER PLASMIDO QUE PORTA UN SEGMENTO DE ADN CROMOSOMAL

En S. coelicolor.

El primer trabajo en el que se obtuvo un plásmido que lleva ADN cromosomal fué reportado por Jacob & Adelberg en 1959 y Adelberg & Burns en 1960 (21) sobre E. coli obteniendo un merodiploide F'.

Y el primer aislamiento de un plásmido que porta un segmento de ADN cromosomal en S. coelicolor fué realizado por Hopwood & Wrihgt en 1973 (22).

Ellos aislaron a partir de la cepa A3(2) una cepa a la que denominaron 1873 con la característica de poseer - un plásmido con el fragmento cromosomal Cys B integrado.

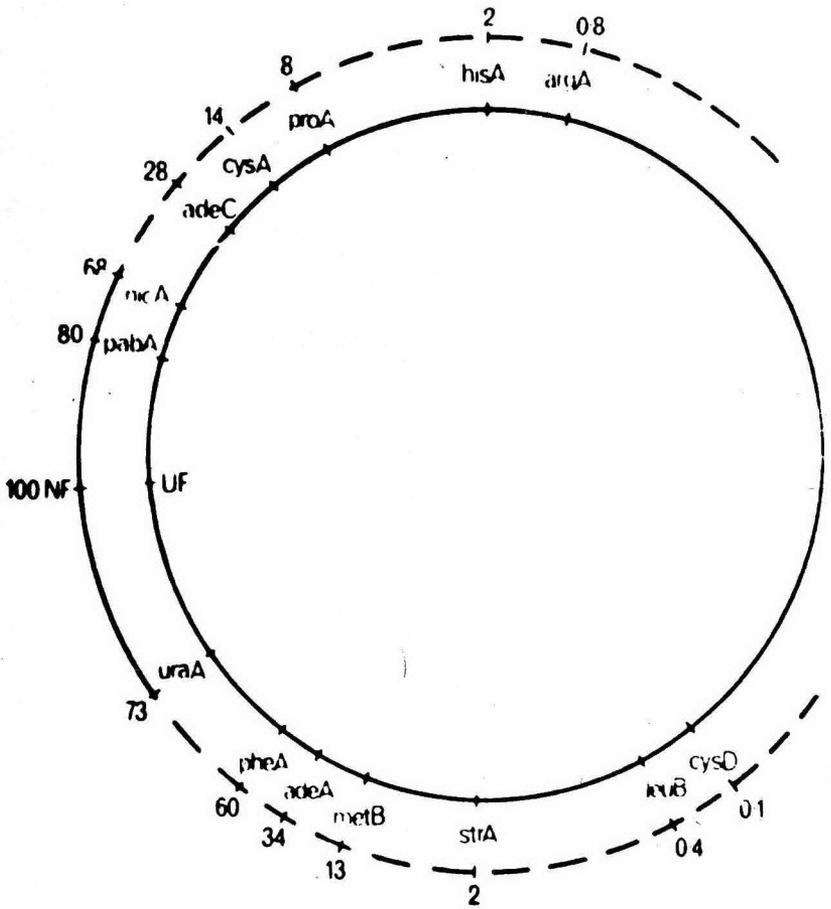


FIGURA 5: Frecuencia de conjugación en S. coelicolor.

El método utilizado fué el mismo que se usó en --- este trabajo con algunas variaciones.

Dichos investigadores irradiaron la cepa 12 - - - (pheA1:IF) con UV hasta un 2% de sobrevivencia (3800 èrgs/mm²) y sembraron en cajas procurando tener 1,000 colonias - por caja. De estas colonias se probó su capacidad de generar conjugantes protótrofas en cruzas por replicación en -- terciopelo sobre cajas sembradas de la cepa A694 (cys B6:UF).

De 53,000 colonias probadas, 60 resultaron tener - una alta capacidad de generar recombinantes protótrofas. -- Después de reciclar se encontró que una cepa, la 1873, resultó ser sumamente eficiente en su donación del marcador ----- Cys B6.

Después se analizó si poseía el plásmido, por la - prueba ya mencionada de inhibición del micelio aéreo.

Se determinaron las frecuencias con las que se - - transferían otros marcadores, concluyendo que éstas eran - - mucho menores que la frecuencia para el marcador Cys B6.

También se determinó el tamaño del fragmento cromosomal integrado al plásmido calculando la frecuencia con que se transferían los marcadores vecinos de Cys B6 que son - - adeA y metB, observando que era muy baja, se concluyó que -- el fragmento cromosomal era, considerando la distancia en-- tre estos 2 marcadores, menor del 2% del mapa genético.

Se experimentó para investigar si era transferi-- ble el plásmido SCP1-cysB6 en otra especie de estreptomice-- tos, que fue S. lividans y se encontró posible, pero sólo - en un 3%.

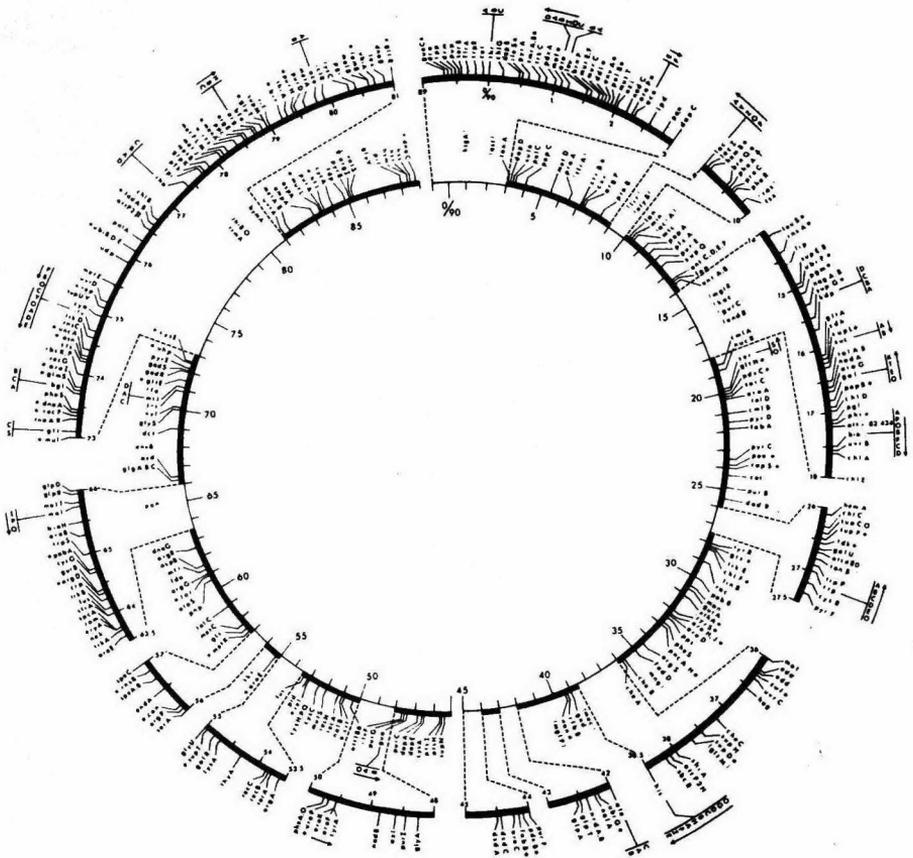


FIGURA 7: MAPA GENETICO DE
Escherichia coli.

1.- MATERIAL:

(A) Se utilizaron las siguientes cepas con las siguientes características (23,24).

12	IF	phea A1
1098	UF	phea A1
A332	NF	phea A1
104	IF	his A1 ura A1 str A1
1190	UF	his A1 ura A1 str A1
A317	NF	his A1 ura A1 str A1

(B) Se utilizaron los siguientes medios (23,24):

CM (Medio Completo)

K_2HPO_4	5 g
NaCl	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 ml (sol. al 10%) †
Peptona (DIFCO)	2 g
Extracto de Levadura	1 g
Hidrolizado de acido nucleicos de Levadura	5 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Hidrolizado de caseína	1.5 g
Agar	1.5%
Glucosa	50 ml †
His, pro, treo, tripto, tir, etc.	50 mg †
Agua C.B.P.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave 15 min., a 15 lb. de presión y -- 115°C.

Se ajusta el pH a 7.2.

Los aminoácidos se agregan dependiendo de la auxótro-- fa de de que trate.

Preparación del hidrolizado de ácidos nucleicos de levadura:

Hervir 2 g. de ácidos nucleicos en 15 ml. de NaOH 1N por 10 minutos; hervir otros 2 g. de ácidos nucleicos en 15 ml. de HCl 1N por 10 minutos; mezclar las soluciones, ajustar el pH a 6.0, filtrar en caliente y finalmente aforar a 40 ml.

En realidad es equivalente si se le agrega por litro 30 mg. de cada una de las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina, uracilo y timina) previamente disueltas, al medio completo.

Preparación de la solución de vitaminas:

Riboflavina (B ₂)	0.1%
Nicotinamida	0.1%
P-aminobenzoico (PABA)	0.01%
Pirodoxina HCl (B ₆)	0.05%
Tiamina HCl (B ₁)	0.05%
Biotina	0.02%
Medio Mínimo (MM)	
Asparagina	0.5 g.
K ₂ HPO ₄	0.5 g.
KOH	0.3 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 ml. (10%) †
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g.
Agar	15 g.
Glucosa	20 ml. (50%) †
C.B.P.	1000 ml.

Los medios selectivos son suplementados como sigue (por litro):

Histidina	3.5 ml. (2%) †
Adenina y Uracilo	2 ml. (0.5%) †
Los demás aminoácidos	5 ml. (1%) †
Vitaminas	1 mg.
Sulfato de dihidroestreptomicina	50 mg. +

Se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 15 lb. de presión y 115°C.

Notas:

- (/) Todas estas soluciones se esterilizan aparte - en las mismas condiciones y son agregadas después en condiciones estériles al resto del medio.
- (+) Este reactivo se esteriliza por filtración con filtros Millipore HA debido a que es susceptible a la desnaturalización por calor.

Todas las cajas con medios se sometieron a prueba de esterilidad (incubación 24 h. a 37°C) previo a su uso.

METODOS: Verificación del Genotipo de las cepas S. coeli--
color.

1.- Lo primero que se realizó al recibir las cepas fué verificar sus respectivos marcadores de la siguiente manera:

Se sacaron de sus tubos de liofilizado y cada uno por separado se inocularon en matraces con CM, se incubaron a 32°C durante 3-4 días.

Ya crecido el micelio y esporulado se tomaron - - 0.5 ml. y se sembró en toda la superficie de cajas con CM y se volvió a incubar a 32°C hasta ver una esporulación completa en toda la caja (más o menos 4 días).

Después se llevó a cabo una suspensión acuosa de - esporas agregando agua estéril (10 ml) y raspando la superficie con el asa, se extrae la suspensión de esporas y se -- filtra en tubos con un filtro de columna relleno de fibra de vidrio, para retener así posibles fragmentos de micelio; a -

este filtrado se le agregó glicerol estéril hasta una concentración final de 20%, se homogeneizó y se colocó en congelación a -20°C ; pero antes se tomaron alicuotas (0.1 ml) y se hicieron disuciones, sembrando en cajas de CM para obtener así las concentraciones de las diferentes cepas, (esto lo explicaré con más detalle en la sección de obtención de títulos), las cajas se incubaron a 32°C de 3 a 4 días.

De las cajas donde se observaron colonias separadas se tomaron las esporas (de cada colonia) ya sea por medio de asa o de preferencia con un palillo y se hizo un parche hasta completar 40 parches por caja por cepa en cajas de CM; se volvió a incubar a 32°C durante 3-4 días.

Cuando los parches se encontraban bien esporulados se inició el proceso de replicación que consistió en:

A las cajas con los parches de las cepas 12, --- A332 y 1098 se replicaron en terciopelo, después sobre éste cajas de MM + phe, MM + phe + Str y finalmente cajas de MM.

Y a las cajas con los parches de las cepas 104, - A317, 1190 se hizo otra serie de replications en terciopelo con cajas de:

MM + his + ura + str

MM + his + ura

MM + his y MM + ura (las dos con str).

Se incubaron las cajas selectivas a 32°C durante 3-4 días.

Se uso MM + phe + str, para ver su sensibilidad a la str. y así en las conjugaciones utilizar la str. como factor selectivo que impida el desarrollo de estas cepas -- cuando van a actuar como donadoras o receptoras de material genético.

De los parches se escogió uno de cada cepa, se tomaron sus esporas ya sea del original o de la caja selectiva donde se supone si debe de crecer, por medio de asa y se suspende en 1 ml. de agua estéril sembrando después en cajas de medio completo, se incubó a 32°C 3-4 días.

2.- Prueba de la inhibición del micelio aéreo

Como se hizo mención en la introducción, para saber si una cepa posee el factor genético SCP1 que se caracteriza por segregar una substancia difusible que posee la propiedad de inhibir a las cepas que no posean dicho factor la prueba se hizo de la siguiente manera:

De las cajas esporuladas de las cepas a las que ya se les verificaron los marcadores, se tomaron muestras de esporas con un palillo se hicieron 3 parches en una caja de CM, uno proveniente de la 1a 12 (IF), otro de la 1a a -- A332 (NF) y el otro de la 1a 1098 (UF) las tres como sabemos -- son phea A1. Lo mismo se efectuó con las otras tres cepas; así tenemos, como se hizo por duplicado, 2 cajas con par--- ches de las cepas ya mencionadas y otras dos cajas con parches de la 1a 104 (IF), a317 (NF) y la 1a 1190 (UF) que poseen los marcadores his A1. ura A1 y str A1.

Se incubó a 32°C de 3-4 días.

Cuando los parches se encontraron bien esporulados se replicaron en terciopelo y sobre cajas de CM previamente sembradas con una capa de esporas, realizando todas las combinaciones posibles, como fueron:

La caja con los parches $\left\{ \begin{array}{l} 12 \\ A332 \\ 1098 \end{array} \right.$ se replicaron en cajas

sembradas de esporas de las cepas 12, A332 y 1098.

La caja con los parches: $\left\{ \begin{array}{l} 104 \\ A317 \\ 1190 \end{array} \right.$ se replicaron en cajas

sembradas de esporas de las cepas 104, A317 y 1190.

La otra caja con parches: $\left\{ \begin{array}{l} 12 \\ A332 \\ 1098 \end{array} \right.$ se replicaron en cajas

sembradas de esporas de las cepas 104, A317 y 1190.

La otra caja con parches: $\left\{ \begin{array}{l} 104 \\ A317 \\ 1190 \end{array} \right.$ se replicaron en cajas sembradas de esporas de las cepas 12, A332 y 1098

3.- Obtención y cuantificación de esporas.

Ya realizados los pasos 1 y 2 se procedió a obtener esporas de la siguiente manera:

Del primer lote de suspensión de esporas en glicero--rol, se tomó de cada uno 0.1 ml. y se diluyó con 0.9 ml. de agua estéril (1:10), luego este ml. se sembró en una caja de medio completo sobre toda su superficie. †

Se incubaron las cajas a 32°C de 3-4 día y ya esporuladas se inició la extracción de esporas, agregando a la --caja de 2 a 5 ml. de agua estéril, con un asa se raspó la superficie desprendiendo así las esporas, se tomó con una pipeta la suspensión de esporas y se pasó por una columna de vidrio de unos 10 cm. de largo por 1 cm. de diámetro teniendo -- en su interior aproximadamente 1 cm. de altura de fibra de -- vidrio. El filtrado se guardó en un tubo de tapón de rosca, se le agregó glicerol hasta una concentración final del 20% y se guardó en el congelador a -20°C, pero antes, se extrajeron de cada tubo con glicerol 0.1 ml y se hicieron diluciones para saber su concentración de la siguiente manera:

A este 0.1 ml se le agregaron 0.9 ml de agua esté--ril (1:10), luego de esta dilución se tomaron 0.2 ml y se diluyeron con 1.8 ml (1:100) y así sucesivamente hasta tener -- las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 de cada una de las -- diluciones se tomó 1 ml (en general de las últimas 4 dilucio--nes). Y se sembraron en cajas de CM; se incubaron a 32°C por 3-4 días y se contaron las colonias desarrolladas, luego se -- aplicó la fórmula:

esporas/ml = # colonias x dilución/alicuota (1 ml) para obtener el título original de la suspensión en glicerol.

† Se observó que las colonias esporulaban más rápidamente en MM + el requerimiento, que en medio completo.

Cruzas y frecuencias de conjugación.

Técnicas para llevar a cabo las cruzas

1.- Cruza Normal:

(1) Día 1: Mezclar la suspensión de esporas de progenitores que se desean cruzar ($1 \times 10^6 \times 2.7 \times 10^6$) y sembrarlos en un tubo inclinado de CM (medio completo).

(2) Día 4: Añadir 10 ml de agua estéril al tubo y hacer una suspensión de esporas raspando la superficie con un asa, agitar vigorosamente y filtrar a través de un paquete de algodón, centrifugar a 1000 g o más, suspender el sedimento en un volumen pequeño de agua y mezclar vigorosamente. Sembrar 0.1 ml de la suspensión, haciendo con anterioridad diluciones de 1:10 y 1:100, en cajas de MM con los suplementos nutricionales escogidos para que crezcan sólo las conjugantes.

(3) Día 8: Hacer las cajas patrón en el mismo medio así como en cajas selectivas; 50 colonias por caja.

(4) Día 10: Clasificar cualquier marcador que sea visible y clasificar los marcadores auxótrofos por el método de replicación (ver más adelante) en cajas selectivas.

(5) Día 12: Determinar los genotipos.

Tengo que aclarar que el método utilizado nos sirve para mapear mediante selección de haploides, pero en el estudio de S. coelicolor también es importante (aun que para este trabajo no nos es útil) y tiene otros métodos; la detección de heteroclonas por la prueba de complementación, el análisis completo de heteroclonas y el análisis fenotípico de heteroclonas.

2.- Cruza por el método de replicación en terciopelo:

Debido a la forma compacta de crecimiento de S. coelicolor su replicación en terciopelo resulta muy adecuada, puesto que los parches, que se hacen tomando esporas de una suspensión o tubo con un palillo, mantiene su forma y tamaño y siguen siendo susceptibles a otra replicación. Este método introducido por Sermonti y Casiano, es particularmente valioso para apreciar la fertilidad de un gran número de colonias o cepas cuando son apareadas con una cepa común. Las colonias en las que se desea saber su capacidad de conjugarse, se les hace una suspensión, y son puestas a crecer en un medio no selectivo (MC) o bien se hacen parches con ellas en el mismo tipo de medio. Cuando se observen bien esporuladas, estos cultivos son replicados en cajas de CM que han sido previamente sembradas con una capa de esporas (10^7 a 10^8 esporas) de la cepa receptora. Estas cajas donde se va a llevar a cabo la conjugación son incubadas por varios días hasta que estén esporuladas, y después son replicadas en una serie de cajas selectivas en las cuales diferentes clases de progenie se observan.

Determinando las frecuencias de conjugación para diferentes marcadores es posible diferenciar las cepas IF de las NF al igual, por supuesto, que de las UF. También nos sirve para determinar en cuál relación de concentraciones encontramos una mayor eficiencia de conjugación. Para determinar esto último, se hizo lo siguiente:

Se trabajó con las cepas A332 (NF pheA1) y la 1190 (UF his A1, ura A1, str A1), se tomaron esporas de ambas, se hicieron diluciones y se mezclaron hasta las concentraciones deseadas en 1 ml por ejemplo:

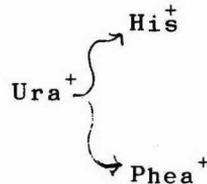
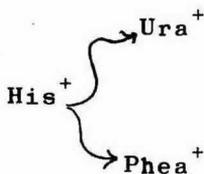
Si uno desea una concentración final de 1×10^6 esporas/ml de la A332 y de 2.7×10^6 de la 1190, siendo

la concentración original de estos de 1×10^7 y 2.7×10^7 respectivamente, lo que se hace es tomar 0.1 ml de las dos, ponerlas en un tubo y agregarles 0.8 ml de agua estéril.

Se sembraron en cajas de medio CM se incubó a --- 32°C de 3-4 días y después se procedió a replicar en cajas selectivas para:

His ⁺	(MM + ura + str + phea)
Ura ⁺	(MM + his + str + phea)
His ⁺ Ura ⁺	(MM + str + phea)

Se repitió la conjugación pero ahora en vez de -- replicar la caja patrón en medio selectivo para His⁺ Ura⁺ - (MM + str + phea), se esperó a que esporularan las conjugantes de las cajas selectivas para His⁺ (MM + ura + str + phea) y las de Ura⁺ (MM + his + str + phea) y estas se replicaron en cajas selectivas de tal manera que de las conjugantes -- His⁺ determinar también cuantas son Ura⁺ (MM + str + phea), lo mismo para las conjugantes Ura⁺ se replicó para determinar cuantas fueron His⁺ (MM + str + phea), lo mismo se hizo para el marcador negativo phea- o sea:



(HIS) Ura (HIS) phea

(URA) His

(URA) Phea

El siguiente experimento trata de hacer notar la diferencia que hay en las capacidades de conjugación entre las cepas diferentes a una misma concentración y se realizó de la siguiente manera:

Se hicieron diluciones para tener las siguientes - concentraciones en la mezcla:

1190	2.7×10^6	his ura str	UF
A317	2.7×10^6	his ura str	NF
A332	1×10^6	phea	NF
12	1×10^6	phea	IF ($1 \times 10^6 \times 2.7 \times 10^6$)

Las esporas se mezclan a la concentración deseada, llevandose a cabo las siguientes cruza, haciendo lo mismo -- que fue explicado en las conjugaciones anteriores:

A332 x 1190	NF x UF
A332 x A317	NF x NF
12 x 1190	IF x UF
1098 x 1190	UF x UF

5.- Aislamiento y caracterización preliminar de un donador -- His-SCP1 (IF).

Como lo explica Hopwood en su artículo, lo que se quiere obtener es un plásmido en nuestro caso SCP1 con un fragmento cromosomal integrado, el que codifica para His A1, que viene a ser en parte, análogo al merodiploide F' Echeri-
chia coli.

Se supone que al irradiar con luz UV, ésta provoca la fragmentación del DNA cromosomal y que hay la probabili-- dad que en algún caso el plásmido se abra y se haga sucepti-- ble de capturar algún fragmento del DNA cromosomal y que cuan-- do ya no se encuentre bajo el efecto de la luz UV sea capaz de volverse a circularizar pero con un fragmento de DNA crom-- somal. Se trabajó con el tubo con glicerol que dió la mayor concentración de esporas de la cepa 12 (IF) phea y se expu-- sieron a diferentes tiempos de irradiación: 5'', 10'', 15'', 20'', 25'', 30'' y 35''. De cada una de las cajas se toma-- ron alicuotas, se les hicieron diluciones (10 , 10^2 , 10^3) y -- se sembraron en cajas de MM + phea; se incubaron a 32°C de -- 3-4 días después de los cuales se contaron las colonias y se hizo su curva de supervivencia.

(B) Proceso de aislamiento de la SCP1-His.

La cepa 12 (phea A1:IF) fue irradiada con luz UV hasta una supervivencia del 2% (36.4'') y sembrado en 60 - cajas procurando obtener unas 1000 colonias por caja, o -- sea:

12 (phea A1:IF)	3.2×10^7 esporas/ml
dil 1.5 : en caja	3.2×10^6
UV hasta el 2% de sob.	6.4×10^4
dil. 1: 6.4	1×10^4
dil 6.4 : 64	1×10^3

Las 60 cajas se incubaron a 32°C durante 3-4 días.

Has que aclarar que todas las cajas fueron marcadas con dos líneas perpendiculares que se intersectan en el centro, lo mismo se procedió a hacer con las cajas de CM y las - cajas selectivas (ura str pheas).

La intención de esto es que estas líneas nos van a servir de referencia para localizar con una plantilla cuadrada a los progenitores que originen a las conjugantes de-- seadas, por lo que es de vital importancia que en el momento de la replicación hacer coincidir en la posición las líneas - trazadas del original con las líneas de la replica en CM y -- con las de la caja selectiva.

Cuando se observa a las 1000 colonias esporuladas - se procede a hacer la conjugación, replicando, tomando en - - cuenta la observación anterior, sobre cajas de CM que han sido previamente sembradas en toda la superficie con la cepa -- 1190 a una concentración final de 2.7×10^6 esporas/plato --- (El sembrado se realiza agregando 1 ml de la cepa 1190 a la - dilución deseada y esperar de 2 a 3 horas a que se absorba en la caja), se ponen a incubar las cajas a 32°C durante 3-4 -- días.

Una vez esporulados los progenitores se procede a replicar en las cajas selectivas para el marcador His, al igual que el caso anterior, tomando en cuenta la misma observación, se incuban las cajas a 32°C 3-4 días.

De las conjugantes que crecieron se les localizó determinando sus coordenadas por medio de una plantilla cuadrículada y los ejes trazados en el reverso de la caja, y con estas mismas coordenadas se procedió a localizar en las cajas originales a los posibles progenitores que las generaron.

De estas colonias se hicieron parches en cajas -- de CM junto con una serie de 4 parches de la 12 IF y otros 4 de la A332 en cada caja como controles.

Se incubó a 32°C durante 3-4 días.

Con los parches esporulados se repitió la conjugación, es decir, se replicaron sobre cajas de CM sembradas con esporas de la 1190 a la misma concentración, incubar a 32°C 3-4 días.

Después, estas cajas se replicaron sobre cajas -- de medio selectivo para His y Ura, incubar a 32°C 3-4 días.

Se volvió a reciclar y con las colonias finales se procedió a determinar su carácter como SCP1-His para ello fue necesario:

- a) Determinar si tenía el factor SCP1, lo cual se logra observando si inhibe el micelio aéreo -- de la 1190, y esto se realizó como ya fué explicado.
- b) Determinar si el marcador His lo trasmitía --- con mucha mayor frecuencia que el de un IF normal y que un NF normal.
- c) Demostrar que el marcador Ura lo transfiere -- igual que un IF normal y a una frecuencia mucho menor que un NF.

- d) Determinar el tamaño del fragmento cromosomal integrado al plásmido y esto se logra sacando las frecuencias con que son transferidos los marcadores vecinos de His A1 o sea Pro A y -- Arg A.

RESULTADOS:

- a) Caracterización de las cepas de S. coelicolor:

De los primeros tubos con suspensión de esporas - en glicerol se obtuvieron los siguientes títulos:

<u>Cepa</u>	<u>Características</u>	<u>Concentración esp/ml</u>
12	IF phea	1×10^5
A332	NF phea	3.6×10^6
1098	UF phea	9×10^5
104	IF his ura str	4×10^5
A317	NF his ura str	3.5×10^6
1190	UF his ura str	1.087×10^7
916	NF his mth phea str	1×10^5

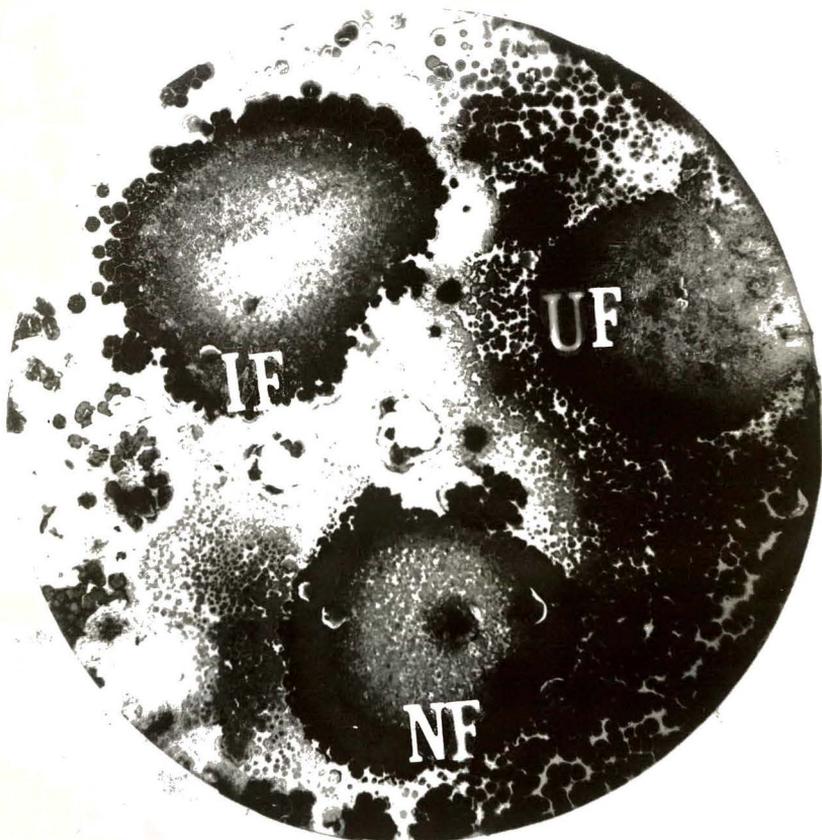
Con respecto a la verificación de los marcadores los resultados fueron como era de esperarse:

<u>Cepa</u>	<u>MM + phea</u>	<u>MM + phea + str</u>	<u>MM</u>
12	+	-	-
A332	+	-	-
1190	+	-	-
	<u>MM+his+ura+str</u>	<u>MM+his+ura</u>	<u>MM+ura+str</u> <u>MM+his+ str</u>
104	+	+	- -
A317	+	+	- -
1190	+	+	- -

La inhibición del micelio

En la prueba de inhibición del micelio aéreo las supuestas IF y NF inhibieron solamente el micelio de las --

UF independientemente de su marcador (fue algo más notable la inhibición sobre la 1190) y, así lo podemos ver en la -- siguiente fotografía:



Después de repetir las extracciones de esporas -- varias veces se mejoraron las técnicas de extracción, lográndose obtener títulos más elevados como los siguientes de los tubos con suspensión de esporas en glicerol, finales:

<u>Cepa</u>	<u>esporas/ml</u>
12	3.2×10^7
A332	1×10^7
1098	7.6×10^7

<u>Cepa</u>	<u>esporas/ml</u>
104	1 x 10 ⁸
A317	9 x 10 ⁶
1190	2.7 x 10 ⁸

b) Cruzas y obtención de recombinantes:

De los resultados para las cruzas de la A332 x 1190 que se obtuvieron, fueron los siguientes: (variando la concentración de esporas de ambos):

	<u>A332 x 1190</u>		<u>His</u>	<u>Ura</u>	<u>His-Ura</u>
a	1x10 ⁶	2.7x10 ⁶	1200	3600	368
b	1x10 ⁴	2.7x10 ⁵	400-500	700-800	150
c	1x10 ⁵	2.7x10 ⁴	140	472	18
d	1x10 ⁷	2.7x10 ⁵	100	485	30

De la tabla anterior podemos observar una notable diferencia cuando la relación NF con UF es de 1:27 (b) es mucho mayor el número de conjugantes que si fuese al revés o sea 10:27 (c); aunque la relación 1:2.7 se encuentre más elevada (a), lo más probable es que una relación 1:27 pero siendo NF de 1 x 10⁶ y UF de 2.7 x 10⁷ den mejores resultados, sin embargo, para trabajar nos conformamos con el caso (a).

Por otro lado, hay que notar que la frecuencia de conjugación para Ura resulta más elevada que para His, lo que era de esperarse, puesto que Ura se encuentra más cerca del sitio de inserción de plásmido SCP1 (9 h.) que His. (Tómese en cuenta que la transmisión es bidireccional; ver mapa genético en antecedentes).

Los resultados de la segunda conjugación con la variante explicada en el capítulo de métodos se obtuvo lo siguiente:

Condición:

A332 (1×10^6 esporas/ml) x 1190 (2.7×10^6 esporas/ml)

HIS	URA	HIS (ura)	URA (his)	HIS (phea ⁻)
1200	3600	545	500	482

De aquí podemos concluir que en la selección para His⁺ de entre las 1200 que resultaron ser His⁺, sólo el 45.5% resultó ser también Ura⁺ (545); es decir, que aunque todas -- estas recombinaron para His⁺, no todas lo hicieron para Ura -- a pesar de estar más cerca del sitio de iniciación de la transmisión.

Con respecto a la selección Ura⁺ sólo el 13.88% resultó simultáneamente ser His⁺, lo que no es de extrañarse -- puesto que el marcador Ura mapea más cerca del sitio de iniciación de transmisión como se mencionó ya anteriormente.

De la His⁺ 482 sí recibieron el marcador negativo -- que viene a ser el 40.6% de la población, lo que fortalece el -- que el marcador phea se localiza poco más atrás que Ura del -- sitio de replicación.

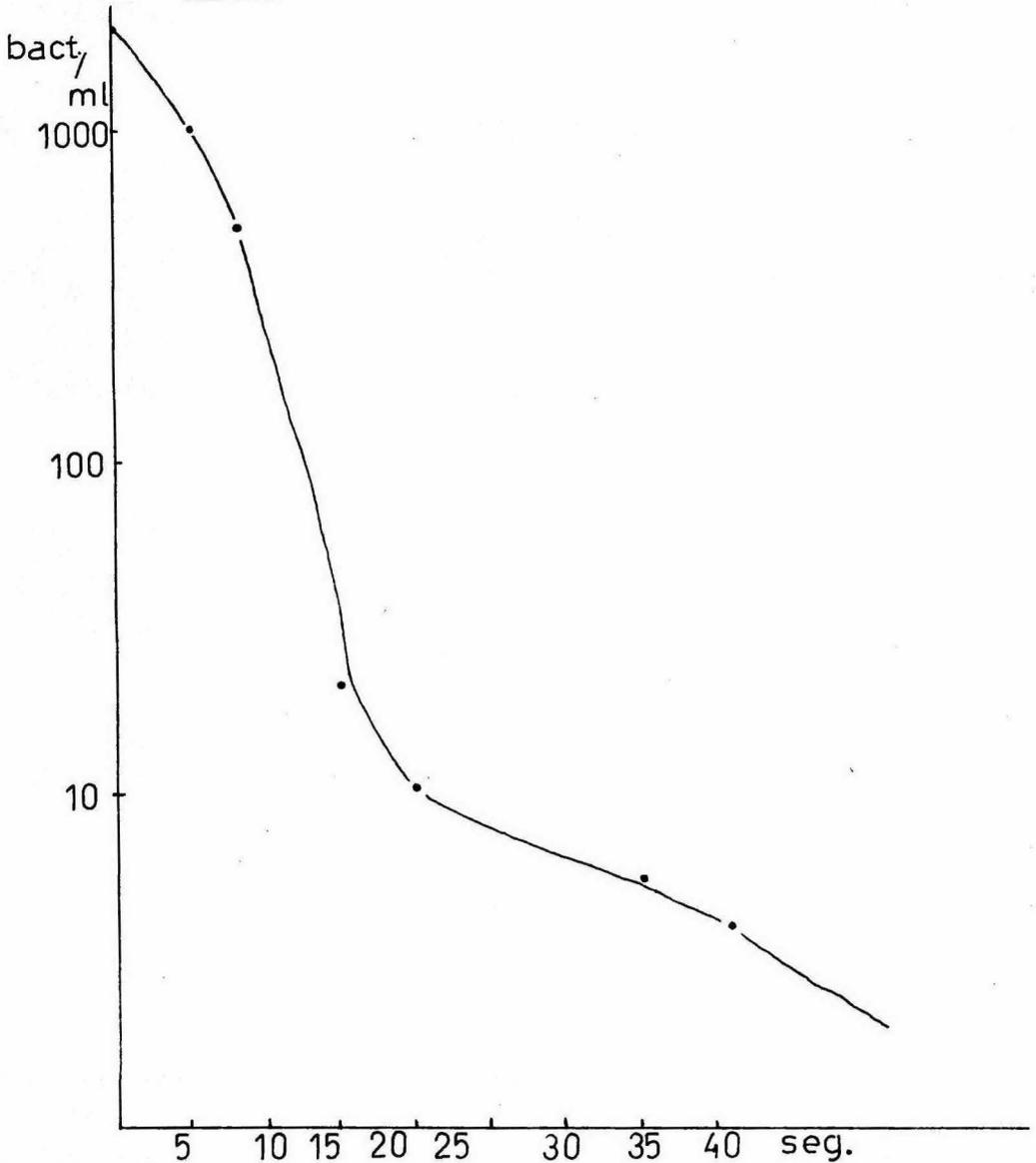
De las conjugaciones entre diferentes cepas se obtuvo la siguiente frecuencia: dada por el número de esporas del donador.

A332 x 1190	UN x UF	1×10^6	x	2.7×10^6	His ⁺	900	0.09%
A332 x A317	NF xNF	1×10^6	x	2.7×10^6	482	0.04%	
12 x 1190	IF x UF	1×10^6	x	2.7×10^6	97	0.0097%	
1098 x 1190	UF x UF	1×10^6	x	2.7×10^6	86	0.0086%	

Como es de notarse la frecuencia de conjugación de -- una NF x UF resulta mucho mayor que la de una IF x UF y por -- supuesto mayor que la de una UF x UF.

c) Curva de supervivencia de la cepa 12 IF a la luz UV.

Gráfica donde se observa la curva de supervivencia de una cepa *Streptomyces coelicor* (12 IF) al ser irradiado con UV.



d) Aislamiento de la SCP1-His.

De las 60,000 colonias obtenidas después de la -- irradiación, 120 fueron escogidas como posibles poseedoras de una alta capacidad donadora del marcador His⁺ ya que lo donaban a una mayor frecuencia que la 12 IF sin irradiar -- (control).

De estas 120 colonias se reciclaron 2 veces, quedando sólo 10 y después únicamente 3 y de éstas 3 con una -- se hicieron las pruebas comprobatorias o sea:

La inhibición del micelio (ver foto)

La transmisión del marcador His y Ura (% de par-- ches):

	His	Ura
12 IF	1	4
A332 NF	97	100
1098	0	0
SCP1-His IF	100	18

Como se carecía de las cepas UF que poseyeran los marcadores Pro A y ArgA, no fue posible determinar el tamaño del fragmento cromosomal integrado al plásmido.

DISCUSION.

El trabajo aquí presentado consistió en la obtención de una cepa de S. coelicolor con un plásmido SCP1 con un segmento de ADN cromosomal integrado (que codifica para his A1), ésto no es mas que la primera etapa de un proyecto cuya continuación consistirá a grandes rasgos, en la purificación de este plásmido prima, y formar un plásmido compuesto con el plásmido Col E1 de E. coli, el cual va a servir como vehículo, para ser transferido, por el método de transformación, a una bacteria receptora E. coli. Al tratar esta bacteria con cloromicetina (la cual inhibe la síntesis de proteínas a nivel de ribosomas, pero curiosamente no inhibe a las proteínas del Col E1) la información del gene His A1 proveniente del estreptomiceto, al igual que toda la información del resto del plásmido compuesto, será amplificada hasta unas 3,000 veces más, logrando una sobreproducción de este metabolito.

Si se logra establecer esta técnica, es de esperarse que la transformación con plásmidos compuestos, se vuelva un método muy aplicable, tanto para la obtención de cepas microbiológicas sobreproductoras, como también una llave de entrada para el conocimiento del comportamiento genético de una amplia gama de microorganismos cuyo estudio en este campo es raquítico.

El método de transformación genética con plásmidos compuestos, ofrece amplias perspectivas en el campo de la microbiología industrial, ya que será posible en cierta forma aislar y concentrar genes de algún interés.

Se lograría obtener cepas sobreproductoras de aminoácidos, vitaminas, antibióticos y cuando se conozca más acerca de la genética de los eucariotes, tal vez sea posible lograr tener microorganismos sobreproductores de hormo-

nas y enzimas de importancia fisiológica para el cuerpo humano.

Incluso la microbiología industrial se extendería a regiones en las que actualmente es incosteable por falta de recursos por los gastos que implicaría la esterilización de las gigantescas incubadoras. Esta es una desventaja en esta rama de la industria, debido principalmente a que la mayoría de los microorganismos útiles al hombre, viven y -- crecen en condiciones de temperatura, pH, osmolaridad, etc. que resultan también óptimas para un gran número de microorganismos contaminantes y por lo tanto dañinos a la Industria de este tipo.

En cambio, si por el método de transformación con plásmidos compuestos se lograra estabilizar las propiedades de estos microorganismos que viven en condiciones extremas como por ejemplo:

pH muy ácido (Thiobacillus, etc.)

Halófilos (que viven a altas concentraciones de sales).

Termófilos, etc. Se disminuiría notablemente el rango de contaminantes, y los gastos, si es que hay que esterilizar las incubadoras serían mínimos.

Como podremos observar en la tabla 1, ya se ha logrado una transgenosis entre organismos de diferentes especies; incluso con células eucariotes como son los fibroblastos humanos y células vegetales. Con estos antecedentes, -- podemos imaginar el alcance y la importancia en el estudio de este tipo de investigación, puesto que conforme más se -- conozca en estos aspectos llegará el momento en el que se -- podrán abordar problemas actualmente sin solución como son la curación de errores congénitos, y esto vendría a constituir lo que se denominaría Ingeniería Genética, ya que se-- ría posible el dirigir los mecanismos genéticos a solucio--

nar problemas de deficiencias metabólicas.

TABLA 1

Sistemas en los cuales se ha reportado transporte de material genético entre dos organismos de diferente especie

Mecanismos	Organismos Involucrados	Tipos de genes transmitidos.	
	Donador ADN	Receptor ADN	
Conjugación	<u>Salmonella typhimurium</u>	<u>E. coli</u> (26)	Todos los cromosomales y episomales
	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	<u>E. coli</u> (27)	Operón <u>nif</u> , genes que codifican para enzimas fijadoras de nitrógeno atmosférico.
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>E. coli</u> (28)	Resistencia a penicilina episomal en <u>Pseudomonas</u> a cromosomal en <u>E. coli</u> .
Transducción	Fibroblastos humanos	<u>E. coli</u> (30)	Genes del operón de galactosa de <u>E. coli</u> que permiten utilizar la galactosa como fuente de carbono.
	Células de plantas superiores - (tomate).	<u>E. coli</u> (35)	Genes del operón de galactosa de <u>E. coli</u> que permiten utilizar la galactosa como fuente de carbono.
Transformación	ADN de <u>Streptomyces coelicolor</u>	<u>B. subtilis</u> (29)	Genes que codifican para enzimas biosintéticas; curación de auxotrofia
	ADN de <u>Salmonella typhi</u>	<u>E. coli</u> (31)	Genes que codifican para enzimas biosintéticas; curación de auxotrofia.
	ADN episomas híbridos <u>Salmonella panama</u> + <u>E. coli</u>	<u>E. coli</u> (32)	Resistencia episomal - a antibióticos

ADN episomal E. coli (33)
híbrido
Staphylococcus
aureus +
E. coli

Resistencia episomal
a antibióticos

ADN episomal E. coli (34)
compuesto
Xenopus
laevis +
E. coli

Transcripción, y re--
plicación ADN 28S y -
18S de X. laevis

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

- 1.- HOPWOOD, D.A. 1965. A circular linkage map en the ----
Actinoyces Streptomyce coelicolor. J. Mol. Biol. 12: -
514-516.
- 2.- HOPWOOD, D.A. 1966. Lack of constant genome ends in --
Streptomyces coelicolor. Genetics 54: 1177-1184.
- 3.- SANDERSON, K.E. & DEMERIC. 1965. The linkage map of --
Salmonella typhimurium. Genetics 51: 897-913.
- 4.- SMITH, S. & B.A.D. STOCKER. 1962. Colicinogeny and re-
combination. Brit. Med. Bull. 18: 46-51.
- 5.- CABBELL, A. 1969. Episomes. Harper & Row Publishers. -
N.Y. and London.
- 6.- SCAIFE, J. 1967. Episomes An. Rev. Microb. 12: 601.
- 7.- LEDERBERG, J.J. 1955. Cel. Comp. Physiol. 45: suppl.
2, 75.
- 8.- HOPWOOD, D., CHARTEK, K. DOWDING & J. VINAN A. 1973.
Bact. Reviews. 37: 371.
- 9.- BRODA, P. 1967. Gen. Res. Comm. 9: 35.
- 10.- BRITTON, C. 1967. Transactions New York Academy of ---
Science 1003.
- 11.- WELSCH, M. 1959. Lysogenicity in streptomycetes. Ann. -
N.Y. Acad. Sci. 81: 974-993.
- 12.- WELSCH, M. 1956. Evidence for the ocerrence of true --
lysogeny among actinomycetes. Virology 2: 703-704.
- 13.- ALIKHANIAN, S.I., T.S. ILYINA & N.D. LOMOVSKAYA. 1966.
Transduction in actimomycetes. Nature (London) 188: --
245-246.
- 14.- GRIFFITH, F. 1928. Hyg. J. 27: 113.
- 15.- AVERY, O.T., MC. LEOD, C.M. & MAC CARTEY. 1944. M. J.
Exptl. Med. 79: 137.
- 16.- ERIKSON, D., OXFORD, A.E. & ROBINSON, R. 1938. Do an--
thocyanins occur in bacteria? Nature, 142: 211.

- 17.- STAINER, R.Y. 1942. Agar-descomposing strains of the - Actinomyces coelicolor species group. J. Bacteriol. -- 44: 555-570.
- 18.- SERMONTI, G.M. & S. CASCIANO. 1963. Sexual polarity in S. coelicolor. J. Gen. Microbio. 33: 293-301.
- 19.- SERMONTI, G. 1969. Genetics of antibiotic-producing -- microorganisms. Wiley-Interscience, London.
- 20.- HOPWOOD, D.A., R.J. HAROLD, A. VIVIAN & H.M. FERGUSON. 1968. Non. A new kind of fertility variant in S. coe--licolor. Genetics 62: 461-477.
- 21.- ADELBERG, E.A. & BURNS, S.N. (1960). Genetic variation in the sex factor of E. coli. J. Bact. 79: 321-330.
- 22.- HOPWOOD, D.A. & M. WRIGHT (1973) A plasmid of S. coe--licolor Carrying a Chromosomal locus and its inter-es--pecific transfer. J. Gen. Microbiol. 79: 331-342. †
- 23.- HOPWOOD, D.A. (1967). Genetic analysis and genome ---- structure in S. coelicolor. Bac. Rev. 31: 373-403. †
- 24.- HOPWOOD, D.A., CHATER, F., DOWDING, J.E. & VIVIAN, A. (1973). Advances in S. coelicolor. Bact. Rev. 37: -- 371-405. †
- 25.- COSLOY, S.D. & OISHI. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. --- USA. 70: 84-87.
- 26.- ANDERSON, R.S., V.M. KEMELLEN, C.M. JONES & J.S. PATTON. 1968. Study of the association of resistance to two - drugs in a transferable determinant in S. typhimurium. Gent. Res. 11: 119.
- 27.- DIXON, R.A. & J.R. POSGATE. 1972. Genetic transfer of Nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae to E. coli. Nature. 237: 102.
- 28.- RICHMOND, M.H. & R.B. SYKES. 1972. The cromosomal in--tegration of a lactamasa gene derived from P-type - - R-factor PRI in E. coli. Genet. Res. 20: 231.
- 29.- MERGEAY, M.R. MARTIN, & J. REMIG. 1970. Transformation d'un mutant de Bacillus subtilis par du DNA Streptomyces coelicolor. Arch. Int. Biochem. Physiol. 78: 603.
- 30.- MERRIL, C.R., M.R. GEIS & J.C. PETRICCIANI. 1971. - - Bacterial virus gene expression in human cells. Nature 233: 398.

- 31.- SANCHEZ, F., F. BOLIVAR & J. MARTUSCELLI. 1975. Transformation of E. coli by lineal DNA from Salmonella typhi. Microbial Genetic Bulletin. 38: 13.
- 32.- COHEN, S.N., A.C. CHANG, H.W. BOYER & R. HELLING. -- Construction of biologically functional bacterial -- plasmid. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 3240.
- 33.- CHANG, A. & S. COHEN. 1974. Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of Staphylococcus aureus plasmid genes in E. coli Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 1030.
- 34.- MORROW, J. COHEN, S., CHANG, A. BOYER, H. GOODMAN & -- HELLING, R. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:1743.
- 35.- MERRIL, C.R., GEIER, M.R. & PETRUCCIANI. 1974. Nature - 233: 398.