

94
24'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**SOBRE EL ORIGEN DE UN GENE PLASMIDICO DE
CITRATO SINTASA EN Rhizobium tropici.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ISMAEL HERNANDEZ LUCAS

MEXICO, D. F.

1992

RECIBIDO EN VISTA
DE LA
TESIS CON



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
- GENETICA DE LOS SIMBIOTES.....	2
- BACTERIA.....	2
- PLANTA.....	2
- PLASTICIDAD GENOMICA.....	4
- GENES CON MULTIPLES COPIAS.....	7
- SECUENCIAS DE ADN Y PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) PARA PODER ESTABLECER RELACIONES FILOGENETICAS RAPIDAMENTE.....	11
2.- ANTECEDENTES.....	16
3.- OBJETIVO.....	18
4.- MATERIAL Y METODOS.....	19
5.- RESULTADOS.....	25
6.- DISCUSION.....	30
- APENDICE I	32
7.- BIBLIOGRAFIA.....	39

1.- INTRODUCCION.

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso mediante el cual algunas bacterias convierten el nitrógeno molecular en amonio. Existen algunos casos en los que las bacterias fijadoras de nitrógeno se asocian con otros organismos. Entre estas asociaciones, una de las más estudiadas es la que se establece entre Rhizobium y algunas leguminosas.

Las bacterias del género Rhizobium se incluyen entre las bacterias gram negativas, son habitantes normales del suelo, que interaccionan con las raíces de las leguminosas para formar nódulos en los que se lleva a cabo la fijación del nitrógeno. Para el establecimiento de un nódulo debe existir un reconocimiento específico entre la planta y la bacteria y posteriormente el Rhizobium debe penetrar por los pelos radiculares hasta la corteza de la raíz donde pasa a través de la pared celular y queda encapsulado en vesículas membranosas dentro del citoplasma [1]. En la formación del nódulo existe una marcada proliferación de las células de la corteza radicular y un proceso de diferenciación de ambos participantes. La bacteria sufre cambios morfológicos, es decir, aumenta su tamaño y su forma se vuelve irregular. Esta forma es denominada bacteroide siendo este el estadio en el que se lleva a cabo la fijación del nitrógeno.

La fijación biológica del nitrógeno la lleva a cabo la enzima nitrogenasa, la cual cataliza la conversión de N_2 a NH_4 . Esta enzima tiene dos componentes protéicos: uno de ellos contiene hierro y molibdeno y el otro es un dímero de subunidades idénticas que requiere hierro para su actividad. La estructura de esta enzima se encuentra muy conservada tanto a nivel de proteína como de la secuencia de ADN que la codifica [2,3]. La nitrogenasa es una enzima sumamente sensible al oxígeno, la presencia de este elemento la inactiva irreversiblemente. Es por esta razón que los organismos fijadores de nitrógeno poseen diferentes estrategias de protección contra la oxidación del O_2 . En el caso de Rhizobium cuando se encuentra en el interior del nódulo en las raíces de las plantas, la leghemoglobina protege a la nitrogenasa ya que une oxígeno con gran afinidad y lo libera de una manera dosificada para permitir la respiración de la bacteria [4].

La leghemoglobina constituye un buen ejemplo del carácter simbiótico de la relación planta bacteria ya que la parte protéica es codificada por la leguminosa y el grupo hemo lo sintetiza el Rhizobium [5,6].

El nódulo es considerado como un órgano especializado en la fijación biológica del nitrógeno. La planta transporta a través del floema el fotosintato necesario para su mantenimiento y para la actividad de la nitrogenasa. El nitrógeno fijado y asimilado en aminoácidos o ureídos es transportado hacia las estructuras superiores por el xilema. La compleja serie de eventos que dan por resultado la formación y el funcionamiento del nódulo requieren de la expresión controlada y coordinada de los genes de la planta y de la bacteria que intervienen en este proceso.

GENETICA DE LOS SIMBIONTES.

BACTERIA

En varias especies de Rhizobium se han estudiado los genes que participan en el establecimiento de la simbiosis [7]. Estos genes se encuentran presentes en plásmidos de alto peso molecular llamados plásmidos simbióticos, mientras que en Bradyrhizobium están contenidos en el cromosoma bacteriano [8]. Los diferentes genes bacterianos que participan en la simbiosis se pueden clasificar en grupos: los genes de nodulación comunes (nodABC), los genes de especificidad de hospedero (hsn), el gene nodD que participa en la regulación de los genes anteriores, los genes nif y fix responsables de la fijación del nitrógeno y los genes involucrados en la síntesis de polisacáridos [9].

PLANTA

Las proteínas vegetales que se expresan específicamente durante la formación y función de los nódulos reciben el nombre de nodulinas [10] y tienen como función la de satisfacer los requerimientos estructurales, metabólicos y de transporte de la fijación de nitrógeno. Existen dos tipos de nodulinas: las nodulinas tempranas, que intervienen directamente en la morfogénesis del nódulo y durante la infección de las células vegetales por el Rhizobium.

Las nodulinas tardías, comprenden un grupo grande de genes que son expresados un poco antes del inicio de la fijación del nitrógeno y que han sido caracterizados en una decena de leguminosas [11]; ayudan al funcionamiento del nódulo creando y manteniendo las condiciones fisiológicas necesarias para que ocurra la fijación biológica del nitrógeno, la asimilación y el transporte de los compuestos nitrogenados. Entre las nodulinas tardías están la urfcase II, la sacarosa sintasa y la glutamino sintetasa.

Las clasificaciones originales de las especies del género Rhizobium se basaron en su hospedero. Actualmente se consideran otras características genéticas. En la siguiente tabla se muestran las especies actuales de Rhizobium [12].

<u>Rhizobium</u> .	Planta hospedera.
<u>Rhizobium meliloti</u> .	Alfalfa (<u>Medicago</u>).
<u>Rhizobium leguminosarum</u> .	
biovar viciae.	Chícharo.
biovar trifolii.	Trébol.
biovar phaseoli.	Frijol (<u>Phaseolus</u>).
<u>Rhizobium loti</u> .	<u>Lotus</u> .
<u>Rhizobium fredii</u> .	Soya.
<u>Rhizobium</u> sp NGR234.	Amplio rango de nodulación.
<u>Rhizobium tropici</u> .	Frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>).

En el centro de investigación sobre fijación de nitrógeno se determinó una nueva especie denominada Rhizobium tropici [13], la cual establece asociaciones simbióticas con frijol (Phaseolus vulgaris) y con árboles del género Leucaena y otras leguminosas. Esta bacteria puede ser utilizada en la agricultura en cultivos de frijol ya que es resistente a condiciones extremas: elevadas temperaturas y altos niveles de acidez, además es resistente al aluminio y algunos antibióticos. En Rhizobium tropici los genes de la nitrogenasa se encuentran en una sola copia a diferencia de Rhizobium phaseoli que posee varias copias.

En el plásmido simbiótico de R. tropici se localizan los genes nod (de nodulación) y nif y actualmente se ha encontrado que existe un gene que codifica para la enzima citrato sintasa.

Hasta el momento esta especie es, al parecer, la única dentro del género Rhizobium que posee un gene cromosomal así como un gene plasmídico [14] que codifican para la citrato sintasa.

La citrato sintasa cataliza la reacción de condensación de ácido oxaloacético a cítrico y su función es esencial para la generación de energía y la asimilación de carbono. Esta enzima es considerada como el paso limitante en la regulación del ciclo de Krebs; además, su función es vital en el ciclo de glioxilato (Fig. 1). A su vez aparece en otras vías no cíclicas para la generación de 2-oxoglutarato el cual es un importante precursor en la biosíntesis (Fig. 2).

Los genes que codifican para las enzimas del ciclo de Krebs se encuentran organizados en grupos cercanos unos a otros en el cromosoma de E. coli: citrato sintasa (gltA), succinato dehidrogenasa (sdhCDAB), succinil-CoA sintetasa (sucABCD) [15]. Mientras que en Rhizobium tropici el gene plasmídico no se encuentra flanqueado por otros genes del ciclo de Krebs.

Se sabe que la citrato sintasa aparece en todos los organismos aerobios y esta ausente en algunos anaerobios como Moniliformis dubis, Gemella haemolysans, Streptococcus faecalis y Lactobacillus plantarum [16].

PLASTICIDAD GENOMICA.

El genoma simbiótico de Rhizobium está sujeto o inmerso en la dinámica global del genoma de las bacterias [9]. Amplificaciones (duplicaciones) deleciones y transposiciones, son ejemplos de las modificaciones que pueden ocurrir en el genoma.

Transposiciones.

Las transposiciones implican la transferencia de un segmento cromosómico a otra posición ya sea en el mismo cromosoma o en un cromosoma diferente. Una clase de transposiciones involucra a los elementos transponibles, los cuales han jugado un papel importante en la evolución bacteriana debido a que pueden crear mutaciones y reorganizarse en el genoma de su hospedero. Además, los elementos transponibles pueden proporcionar diferentes ventajas selectivas como resistencia a diferentes antibióticos.

Se sabe que en el cromosoma de tipo silvestre de E. coli se encuentran varias copias de estos elementos transponibles denominados IS1, IS2, IS3. Normalmente cuando una IS se coloca dentro de la secuencia de nucleótidos de un gene, este se inactiva. La reversión de tal mutación puede ocurrir cuando los elementos IS se mueven nuevamente.

Figura. 1.

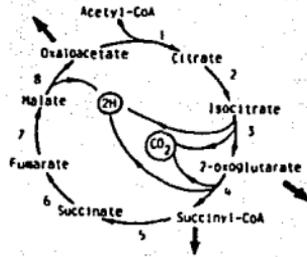
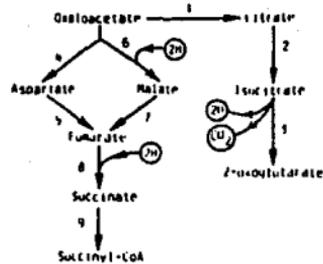


Figura. 2.



Rutas metabólicas en las cuales la citrato sintasa constituye uno de los componentes primordiales tanto para organismos anaerobios como aerobios en la generación de energía y diferentes precursores para biosíntesis.

Delecciones.

O también llamadas deficiencias cromosómicas son a menudo letales, como cabría esperar si faltasen genes responsables de algunas funciones esenciales en la fisiología o en el desarrollo del organismo. Las delecciones también pueden no ser letales y quizás sean favorecidas por la selección natural en la evolución de formas saprófitas o parásitas, cuando no se requiera la función de determinados grupos de genes. Existen pocas pruebas experimentales para probar dicha sugerencia. Ha quedado sin embargo bien establecido que en la evolución han intervenido delecciones y no únicamente duplicaciones .

Duplicaciones.

Las duplicaciones del material genético seguidas de la divergencia de los segmentos duplicados para llevar a cabo funciones distintas han sido un recurso importante en la evolución.

La forma (as) ancestral (es) de vida de todos los organismos con ADN probablemente contenían una corta doble hélice de ADN formado únicamente por uno o pocos genes. Las decenas de miles de genes distintos encontrados, como por ejemplo en el genoma humano, son descendientes de ese corto segmento ancestral a causa de múltiples duplicaciones y modificaciones del mismo.

En los últimos años se ha acumulado considerable información acerca del papel evolutivo de las duplicaciones del ADN. Por conveniencia se distinguen diferentes clases generales de duplicaciones génicas:

A) Duplicaciones de seguidas de evolución divergente hacia funciones distintas.

B) Los genes presentes en varias copias en cada genoma, pero que se conservan semejantes en cuanto a la secuencia de ADN y a su función (familias génicas). La presencia de varias copias de un gene permite al organismos obtener grandes cantidades del producto génico en intervalos cortos de tiempo [17]. En los eucariontes los fenómenos antes mencionados también se llevan a cabo por ejemplo, Los genes que codifican las hemoglobinas de los vertebrados han evolucionado por una serie de duplicaciones génicas seguidos de una divergencia gradual hacia funciones distintas. Si bien relacionados, los genes que codifican para las hemoglobinas, así como los que codifican para las mioglobinas pueden remontarse a un sólo gene que se duplicó hace unos 650 millones de años en la línea ancestral de los vertebrados. Tanto las mioglobinas como las hemoglobinas se hallan implicadas en el transporte de oxígeno : las mioglobinas en el músculo y las hemoglobinas en la sangre .

Muchas de las proteínas de un animal pluricelular pueden agruparse en familias: las colágenas, las globinas, las actinas, las proteasas de la serina, etc. Las proteínas de la misma familia están emparentadas tanto por su función como por su secuencia de aminoácidos. Existen pocas dudas acerca de que cada familia ha evolucionado a partir de un único gene ancestral por medio de un proceso de duplicación y divergencia. A menudo, los diferentes miembros de una familia de proteínas son característicos de diversos tejidos del cuerpo, donde realizan variadas tareas análogas pero diferenciadas. Evidentemente la creación de nuevos genes por medio de la diversificación y especialización de los genes existentes ha sido crucial para la evolución de los organismos pluricelulares complejos [18].

GENES CON MÚLTIPLES COPIAS.

Otra clase de secuencias duplicadas de ADN está formada por genes repetidos desde unas pocas veces hasta varios centenares de veces en cada genoma, siendo todas las copias presumiblemente idénticas en cuanto a su secuencia de nucleótidos y por tanto transcritas en secuencias idénticas de RNA. Esta clase incluye los genes que codifican los RNA ribosómicos y de transferencia siendo ambos tipos de genes transcritos pero no traducidos y aquellos que codifican para las histonas y los anticuerpos.

Los ribosomas se hallan implicados en la síntesis de proteínas. Están compuestos por dos subunidades: una pequeña y otra grande. Además poseen tres tipos de RNA y 50 tipos de proteínas ribosómicas.

En los eucariontes los tres tipos de RNA se designan 5S, 18S Y 28S. La subunidad ribosómica pequeña contiene un RNA de 18S; la subunidad grande contiene una molécula de RNA 5S y otra 28S.

En las bacterias existen de igual forma tres tipos de RNA ribosomal: 5S, 16S Y 23S.

La selección natural pudo haber favorecido la multiplicación de los genes RNA ribosomales; ya que la célula requiere un elevado número de ribosomas para la síntesis de proteínas. Cada molécula de mRNA es leída por un grupo de ribosomas denominados polirribosomas que trabajan en forma secuencial a lo largo del mRNA. La demanda de ribosomas por parte de una célula es grande ya que se sintetizan simultáneamente muchas proteínas. Generalmente alrededor del 80% al 85% del RNA de una célula es rRNA.

Al parecer las duplicaciones han favorecido tanto a eucariontes como a procariontes ya que provocan la generación de un alto grado de diversidad, por ejemplo en el caso de los genes que codifican para las inmunoglobulinas, o para la producción rápida y eficaz de una gran cantidad de proteínas en el caso de los genes ribosomales y genes que codifican para las histonas [21].

Una característica relevante del genoma de Rhizobium es la gran cantidad de secuencias reiteradas. El producto de la recombinación de éstas conduce a deleciones, adiciones y amplificaciones; dichos eventos se presentan en una frecuencia de 10^2 a 10^3 y tienen diferentes efectos en la nodulación y fijación de nitrógeno [21,22,]. En Rhizobium phaseoli se han detectado gran cantidad de amplificaciones y deleciones que aumentan los genes de nodulación y fijación de nitrógeno desde dos hasta ocho veces [23]. Estos arreglos son generados por recombinación entre operones reiterados de la nitrogenasa nifHDK [24].

En los eucariontes, las duplicaciones parecen ser un evento más general que en bacterias; sin embargo en Rhizobium se encuentran diferentes ejemplos de genes en varias copias como es el caso de Rhizobium leguminosarum biovar viciae en donde se ha encontrado que una copia de los genes fixN y fixG se localizan en el plásmido simbiótico mientras que la otra copia se encuentra en un plásmido involucrado en la síntesis de polisacáridos [20].

En el megaplásmido (PSym) de Rhizobium meliloti se ha encontrado que existen dos copias de los genes fix entre los cuales se localiza una copia en cada grupo de los genes fix (G,H,I,N). Estos genes son importantes para la fijación de nitrógeno. El primer grupo se encuentra a 220 Kb en la posición 3' del promotor de los genes nifHDK; el segundo grupo se localiza a 40 Kb en la posición 5' del promotor de los genes antes mencionados. Las reiteraciones de los genes fix son funcionales ya que una deleción en ambos grupos afecta la fijación de nitrógeno en R. meliloti. Las reiteraciones de los genes fix pudieron haber surgido mediante un proceso de duplicación en el plásmido simbiótico [25].

Existen ejemplos de duplicaciones de cromosoma a plásmido. Esto se observa en R. leguminosarum en donde se han reportado dos genes que codifican para la enzima glucosamino sintetasa. Uno de estos genes glmS (el cual cataliza la formación de glucosamina 6-P a partir de fructosa 6-P y glutamina en E. coli) se encuentra en el cromosoma, mientras que nodM se encuentra en el plásmido simbiótico y de igual manera presenta actividad funcional de glucosamino sintetasa. Aunado a esto, nodM muestra un alto grado de homología a nivel de proteínas con respecto a glmS de E. coli. nodM está involucrado en la síntesis del factor de

nodulación de Rhizobium el cual es un oligómero de N- acetilglucosamina. Se sugiere que para tener cantidades mayores de glucosamina y asegurar la síntesis de la sustancia o factor que produce los nódulos, es ventajoso tener una copia adicional del gene en cuestión. [26].

El intercambio de material genético entre plásmidos y cromosomas no se da únicamente dentro del mismo organismo, sino también puede ocurrir entre organismos .

Los genes que se transfieren provocan diferentes características fenotípicas como resistencia a antibióticos o metales pesados, producción de toxinas o la habilidad de degradar complicados hidrocarburos.

La transferencia lateral de genes entre bacterias que ocupan el mismo nicho ecológico se ve favorecido por la presencia de transposones o plásmidos, ya que estos funcionan como vehículos para transportar el material genético a otro organismo; además es bien conocido que estos elementos pueden ubicarse en un amplio rango de hospederos. También se ha pensado que fagos bacterianos pueden mediar transferencia lateral de información genética entre bacterias.

Los elementos transponibles han sido importantes en la evolución bacteriana, debido a que provocan mutaciones y rearrreglos en el genoma de su hospedero. La distribución de varias IS (secuencias de inserción en el material genético de los organismos) provee evidencias de la repetida invasión y colonización sobre linajes bacterianos por los elementos IS .

Los mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo el intercambio genético entre las bacterias se han denominado : conjugación (que se da debido a la fusión de una célula con otra mediante una estructura denominada pili a través de la cual se transfieren plásmidos y cromosomas) , transducción (mediado por ciertos bacteriofagos los cuales introducen su material genético) y transformación (en el cual una célula asimila y expresa ADN exógeno).

Se han utilizado varias características genotípicas para establecer posibles relaciones evolutivas tales como el número, tamaño y forma de los cromosomas en los eucariontes. En las bacterias las características fenotípicas y fisiológicas no reflejan en realidad qué tanto una especie está relacionada filogenéticamente con otra. La morfología en bacterias es tan simple que no sirve para clasificarlas; las características fisiológicas han permitido una mejor clasificación. Sin embargo, aunque se pueden agrupar especies bacterianas usando rasgos fisiológicos compartidos, existen especies emparentadas que carecen del rasgo en cuestión. Las bacterias gram positivas definidas por la estructura de su pared celular forman un clado, que también incluye bacterias que no tienen paredes celulares

Recientemente se han desarrollado diferentes técnicas para establecer relaciones filogenéticas entre los organismos, entre estas se encuentran : análisis de electroferotipos (ETS) mediante electroforesis de enzimas [27,28,29] considerando bandas resultantes que representan un alelo específico, detectadas por las actividades bioquímicas de las enzimas. Entre mayor número de alelos compartidos mayor será la cercanía genética entre dos organismos.

El diseño antes mencionado proporciona únicamente aproximaciones debido a que únicamente toma en cuenta a las proteínas para relacionar filogenéticamente a los organismos; existen otras técnicas para hacer filogenia como las técnicas inmunológicas.

Pueden obtenerse estimaciones del grado de semejanza entre proteínas mediante técnicas inmunológicas , tales como la inmunolectroforesis, la inmunodifusión , la precipitación cuantitativa, la fijación del complemento y la turbidimetría.

Para establecer relaciones evolutivas también se ha usado la hibridación del ADN, ya que puede medirse el grado de diferenciación entre dos especies por la proporción de pares de nucleótidos que difieren en el ADN de los mismos. Esto se consigue creando moléculas híbridas entre filamentos sencillos de ADN de diferentes organismos; los dos filamentos de ADN pueden disociarse y reasociarse in vitro, consiguiéndose moléculas híbridas formadas por filamentos procedentes de dos especies distintas de bacterias o virus. En poco tiempo se observó que esta técnica podía utilizarse para medir la diferenciación del ADN entre especies [30]. Por hibridación pueden obtenerse la medida de la diferenciación de ADN entre dos organismos evaluando la extensión de la reacción de hibridación, o sea la fracción del ADN de ambas especies que forman moléculas híbridas.

Las técnicas anteriores muestran cierto grado de exactitud para establecer relaciones filogenéticas entre organismos y entre genes. Sin embargo el estudio de la evolución bacteriana se ha valido de nuevas técnicas de biología molecular para determinar de dónde provienen ciertos genes; o las verdaderas posiciones taxonómicas de los organismos.

La información genotípica tiene más ventajas que la información fenotípica, la base clásica de la clasificación taxonómica, la aparición de métodos como la secuencia de ácidos nucleicos proporciona una forma de interpretación más sencilla y rápida de información genética los elementos de una secuencia, nucleótidos o aminoácidos, están restringidos en un número bien definido; además se puede considerar a una molécula cuya secuencia cambia al azar como un cronómetro; la cantidad de cambios en su secuencia es el producto de la velocidad de fijación

de mutaciones en el tiempo transcurrido. Para que una secuencia pueda ser usada como un cronómetro evolutivo es necesario que los cambios sean proporcionales al tiempo, las velocidades de cambio deben corresponder al espectro de las distancias evolutivas que se quieren determinar (deben poseer zonas de relativa constancia y zonas mas variables) la molécula debe ser lo bastante grande como para proveer la información necesaria y contribuir a un funcionamiento regular del reloj evolutivo.

Las moléculas más utilizadas en la actualidad para establecer filogenias son las secuencias de ADN de los RNA ribosomales. Estos genes tienen un alto grado de constancia funcional lo cual los hace un modelo atractivo ya que garantiza un buen funcionamiento como reloj evolutivo. Al parecer se encuentran en todos los organismos, y diferentes zonas del gene cambian a velocidades muy diferentes, esto permite determinar relaciones filogenéticas lejanas.

Su tamaño es de 1.5Kb a 3Kb, poseen muchos dominios los cuales juegan un papel determinante en la funcionalidad de la molécula.

La determinación de secuencias de ADN se ha revolucionado con la introducción de la síntesis de ADN mediante una reacción en cadena (PCR) que permite obtener cantidades muy grandes de un fragmento específico del genoma sin necesidad de aislar y clonar ese fragmento, además el PCR nos puede servir para establecer relaciones filogenéticas eficazmente.

SECUENCIAS DE ADN Y PCR (POLIMERASE CHAIN REACCTION) PARA PODER ESTABLECER RELACIONES FILOGENETICAS RAPIDAMENTE.

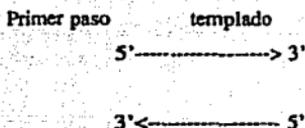
El PCR es una técnica la cual consiste en amplificar un segmento determinado de ADN que se encuentra entre dos regiones de una secuencia conocida. Para llevar a cabo esta técnica se necesitan:

- Dos oligonucleótidos o cebadores (segmentos cortos de ADN 16-24 bases); estos cebadores tienen diferentes secuencias y son complementarios con el fragmento de ADN que se requiere amplificar.
- Un templado o fragmento de ADN que se requiere amplificar, puede ser ADN total plásmidos o simplemente paquetes celulares.
- DNTPS. Deoxinucleótidostrifosfatos (deoxiguanina, deoxicitocina, deoxitimina, deoxiadenuina) éstos se usan para ir formando las cadenas sintéticas de ADN.

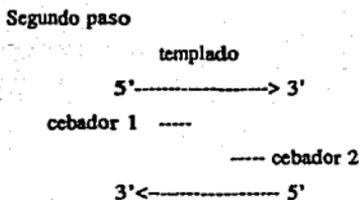
- Enzima polimerasa; se utiliza Taq polimerasa ya que es resistente y funcional a altas temperaturas.

- Ciclos alternos de temperaturas.

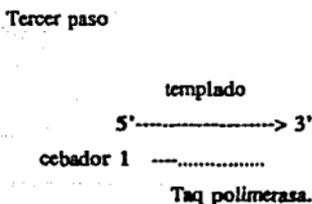
La reacción se lleva a cabo de la siguiente manera: en el primer paso se desnaturaliza el ADN a una temperatura de 95°C en presencia de los cebadores, los DNTPS y la enzima. Enseguida se reduce la temperatura entre 50 y 68°C (dependiendo de la T_m temperatura media de los oligos) para que los dos oligómeros hibridicen o peguen al templado; ésto se conoce como annealing. Posteriormente se aumenta nuevamente la temperatura a 72°C para que la polimerasa empiece a sintetizar las cadenas de ADN complementariamente.



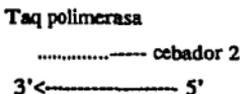
Desnaturalización; se separan las
dos cadenas de ADN por calor 95°C



Pegado de las hebras; los cebadores
se pegan a las cadenas complementarias
de ADN.



La Taq polimerasa empieza a sintetizar
a partir de los cebadores, las cadenas
complementarias utilizando los DNTPS.



Los tres pasos anteriores corresponden a un ciclo de amplificación que generan a partir de dos cadenas de ADN, 4 cadenas de ADN así sucesivamente se obtiene el ADN de forma exponencial. En 30 ciclos se tienen aproximadamente de 10^4 a 10^8 cadenas, aproximadamente dos microgramos de ADN.

La técnica de PCR tiene múltiples aplicaciones entre las que se encuentran:

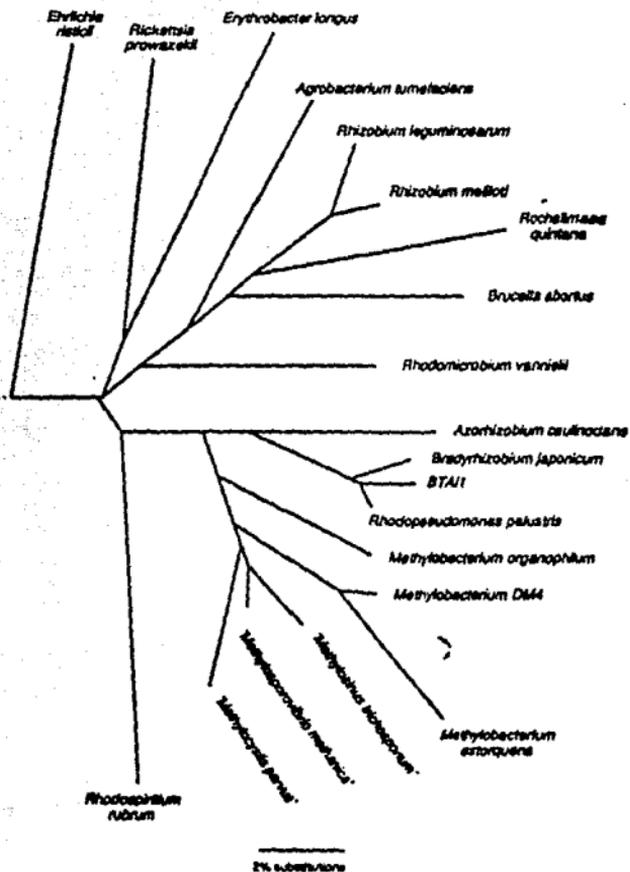
- Generación de secuencias específicas de clonación de doble cadena.
- Amplificación de cDNA.
- Amplificación de cDNAs transportados en bacteriófagos usando oligonucleótidos como primers que hibriden con el ADN requerido.
- Generación de cadenas sencillas a partir de cadenas dobles de ADN.
- Eliminar secuencias no buscadas flanqueando el ADN blanco.
- Generación de grandes cantidades de ADN para secuencia de nucleótidos [31].

El PCR junto con la secuencia de ácidos nucleicos constituye una poderosa herramienta en los estudios filogenéticos; se ha demostrado que con productos cortos (260pb) de PCR de los genes ribosomales 16S se pueden colocar organismos en un contexto filogenético realmente aceptable.

Por ejemplo a posición taxonómica de la cepa BTA11 la cual es fototrófica y es simbiote de la leguminosa Aeschynomene posee características de Rhizobium, entre las que se encuentran velocidad de crecimiento rápido en manitol, habilidad de crecer en sacarosa y lactosa; además, también presenta similitud con Bradyrhizobium en la secuencia nif. Al compartir características de ambos grupos es difícil colocarla objetivamente en alguno de ellos; sin embargo por medio de PCR y secuencia de ácidos nucleicos se ha logrado establecer aceptablemente la relación filogenética de esta bacteria así como la de los Rhizobium y otros organismos dentro de la subdivisión alfa de la clase proteobacteria (Figura 3) [32].

Los estudios enfocados principalmente a discernir sobre las relaciones filogenéticas entre organismos, o que tanta similitud o diferencia comparten un gene con otro se ven ampliamente favorecidos con las técnicas modernas de la biología molecular (hibridación PCR y secuencia) que constituyen verdaderas herramientas.

FIGURA 3



Arbol filogenético el cual muestra la filogenia de las Rhizobiaceae y otros organismos como la cepa BTAl1. La posición de las ramas fue definida por PCR y secuencia de un fragmento de 16S ribosomal.

2.- ANTECEDENTES

Dentro de la línea del análisis de genes bacterianos involucrados en la interacción con plantas se ha determinado la secuencia nucleotídica del gene plasmídico de citrato sintasa de Rhizobium tropici [14]. Es interesante que la mayor cercanía del pcsA (gene citrato sintasa plasmídico de Rhizobium tropici) se observa con la rama en vez de a la rama a la que pertenece Rhizobium [33]. Cuadro 1. Se ha encontrado arriba del pcsA, en la región 5', una secuencia IS la cual es parecida en un 85% a otras encontradas en E. coli y Pseudomonas. El pcsA no está flanqueado por otros genes del ciclo de Krebs, lo que pudiera sugerir que el juego completo del gene plasmídico más la IS se pudo haber ubicado en R. tropici por una transposición endógena o por transferencia lateral entre bacterias.

Hibridaciones previas de ADN total de la cepa silvestre CFN299 (Rhizobium tropici) muestran que la citrato sintasa cromosomal se ubica en una zona de 9 Kb (digestion con la enzima de restricción EcoR1) mientras que la citrato sintasa plasmídica se localiza en una región de 6 Kb; la banda de 9 Kb del gene cromosomal se observa en una cepa (CFN29910) de Rhizobium tropici que posee una deleción en el plásmido simbiótico, mientras que la citrato sintasa plasmídica se encuentra ausente.

La señal del gene cromosomal es menos intensa en experimentos tipo Southern que la del gene plasmídico (cepa CFN299), utilizando como detector un fragmento interno del gene plasmídico de citrato sintasa. Esto tal vez indicaría que existen diferencias en las secuencias nucleotídicas de los dos genes sugiriendo que no son copias idénticas. Fotografía 1

El gene plasmídico de citrato sintasa tiene una regulación diferente dependiente del hierro no descrito para otras citrato sintasas. La expresión del gene plasmídico está regulada por la fuente de carbono (sacarosa).

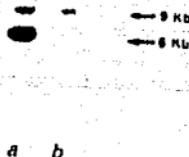


FOTO 1

Experimentos tipo Southern el cual nos muestra : A= ADN TOTAL CEPA CFN 299 DIGERIDO CON LA ENZIMA ECOR1. B= ADN TOTAL CEPA CFN29910 DIGERIDO CON LA ENZIMA ECOR1. 9kb = CITRATO SINTASA CROMOSOMAL, 6kb = CITRATO SINTASA PLASMIDICA. Detector de hibridización fragmento interno del gene plasmídico de citrato sintasa de Rhizobium tropici.

3.- OBJETIVO.

Determinar el origen evolutivo del gene plasmídico de citrato sintasa (pcsA) de Rhizobium tropici. Este gene pudo haberse obtenido por transferencia lateral entre bacterias o por una duplicación del gene cromosomal.

4.- MATERIAL Y METODOS.

Cepas bacterianas.

Rhizobium tropici:

CFN299 Tipo silvestre.

CFN29910. Posee una delección de aproximadamente 200kb del plásmido simbiótico que elimina la citrato sintasa plasmídica.

Un producto de PCR de la cepa 29910 de Rhizobium tropici y la determinación de la secuencia de ácidos nucleicos del mismo serán utilizados para llevar a cabo nuestro objetivo.

Diseño de oligonucleótidos para obtener el producto de PCR del gene cromosomal de citrato sintasa de Rhizobium tropici.

Para seleccionar la secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos o cebadores; se evaluaron las secuencias nucleotídicas de: E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Rhizobium tropici, Rickettsia prowazekii, Thermoplasma acidophilum, y Coxiella burnetii. Estas secuencias se alinearon con el programa PILEUP (fig4). Posteriormente se realizó la búsqueda de fragmentos pequeños conservados en las diferentes especies tomadas en cuenta.

Se escogieron las siguientes regiones nucleotídicas

1030---1050

5'-----3'

AAGATGCCGACCATCGCCG (PRIMER J1)

1409-----1432

3'-----5'

CTTGCTAGCAAGAACAGGAACC (PRIMER J2)

Las secuencias mostradas se encuentran muy conservadas en los genes de citrato sintasa. Tomando como base esto se mandaron sintetizar estos oligonucleótidos para ser usados posteriormente como oligonucleótidos base en la reacción de PCR del gene de la citrato sintasa cromosomal de Rhizobium tropici.

cit ₁ syn.msf(Pseocita)	attgCgggCC	TtTtataAaa	GgCgTaAata	GCcccCTTTT	TCTgCgAaaa
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)C	gCTcCaTATc	GgCgTcgcT	cgAtatTTca	TcAaTaactat
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	401				450
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	CTCGgCcCCc	gAgGcgCCTt	aGgaAacCTa	CaCtTtCAaT	cGcaccgAtc
cit ₁ syn.msf(Rircita)aTc	aaaaAaatTT	ataaatCgta	atCattctct
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	ggcGccCCCG	cgaaaaCCCG	cGcgGTTTcAc	CCCCCTctcg	GGaagcAat
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	CcCcgCaacG	AaGgCtCTA	CgGcATggaT	tCgCgcaAaT	tGcAtctcGa
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	aTtAcCgCct	ttgttctCtA	tcacgTtAtT	CCTCTggAtT	GtctCTacgGc
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	451				500
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	gATtTgggca	AAtTtTgaaa	ATcCcaactaa	AaTtcatTAT	AgTtAcaAgc
cit ₁ syn.msf(Rircita)	aATtTctAa	AAtTAggtT	ATAcctgaCTG	AaTgAggTAT	ATacATtATg
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	tAgaaCacAg	AtcagTTeat	tggcgacCTG	ttatctccca	gCTAgcAGAT
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	atTtatecct	ctaATgTgtT	cggggcccCTG	ctCGGggggt	ACTgATGAtT
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	ttTggCatAt	tAaTcTTat	ctcCgcatGg	AcOGaCtTc	gCTATctTg
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	501		Inicio del gene		550
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	aCTAcAcccg	CcAGgAGcAc	gAaTgcGcaA	tCgtAAAgcT	aAActTtCt
cit ₁ syn.msf(Rircita)	aCT..AaTgg	CaAtaAAtaT	AACTTtAGAA	ttgcAgAatT	aAAaATTAGa
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	cCTTgaggnaa	a.....At	AtCaTgGata	aCAacAAAgc	ctgTgTctTA
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	tCAAgcaTaa	aTAGAGGCG	AtCaTtGctT	aCAaAAAgc	gcAgTtATa
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	cCgAttgggt	CTAaataGta	AtTTtTaat	ctAtttAtT	gAAaTTAAa
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	551				600
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	tTgaa....A	aTCAgTcGgt	tGAATtTcct	aTtataTTCac	gTACcctTGG
cit ₁ syn.msf(Rircita)	ggtA.....A	CT....AtT	taAgTTtAcct	aTcCTTaaAg	caAgTATCGG
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	gTCgAcGCC.	..CAtagTgc	cGAATTgaaa	ctcCgtTCAa	gcAcgATCGG
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	aTcGAgGGct	CagcCCCcGT	cGAacTGCCC	gTcCTATCcg	gTACCATgGG
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	aTatgtatac	CgatCCCAaa	atcATAcgac	gaaATTTCAa	aTAgCgTtaa
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	601				650
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	cAagGATGTg	ATtGAcgTA.	..aagacATt	gGcaatcat	GgTGCCTtTg
cit ₁ syn.msf(Rircita)	TaaagATGTA	ATCGATATAa	OtaGggTATc	tCGCGAAgCc	GATtACTTtA
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	TcccGAcGTc	cTCGgcATtC	GatccCTcTc	cGaGcAgAcG	aAgatTtTA
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	TcccGATGTA	gTgGATgTAc	GggGcCTAcac	cg....ccAcG	GgccACTTcA
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	aAgatATcat	ATatgTAgAG	GTgtatTaat	gcCaGAAAcT	GaaCaAAATTA
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	651				700
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	CgctGcAgct	TGGtTTTtAc	TCTACaGCGG	CTTGTgAAcT	AAAAATCACC
cit ₁ syn.msf(Rircita)	ctTATGATCC	ggGcTTTATc	TCTACTcGctT	CTTGTcAaTc	tActATtGcA
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	CTTATGATCC	TGGcTtAcT	TcGactGGGT	CgTGCgAGTc	cAgcATCACC
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	CCtTcGATCC	TGGcTtAcT	TcGactGGGT	cATCGcGGTc	gAaGATCACC
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	gCaAaGggCt	TGaggATgTc	aaATaCaAGTgGac	AAGcCTCACg
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	701				750
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	TtTATCOATG	CGGAGAAAAG	tATtTtTGCTG	TATCGGGGgt	ATCCaATcGA
cit ₁ syn.msf(Rircita)	TaTATGAGCG	GtGAtAAAAG	CATatTatgG	TATCGGGAT	ATgATATtAA
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	TtTATGAGCG	GCGAcgAAAG	CgTcCTGCTG	aATCGGGTt	ATCCGATCGA
cit ₁ syn.msf(Pseocita)	TaTATGAGCG	GCGAcAAAAG	CgTcCTcTc	aATCGGGCT	AcCCcATCGA
cit ₁ syn.msf(Thacit ₁ syn)	accATCGACG	GaaAtAAAGG	aATcCTCGCa	TAcgGCGGCT	ATtCTgTCGA
cit ₁ syn.msf(Ecglta)
	751				800
cit ₁ syn.msf(Coxcyt ₁ syn)	tCAAtTgGCT	GAcAAAtcGg	...AtTATat	GGAAGTtTGT	TACTtACTGg
cit ₁ syn.msf(Rircita)	AgActTaGCT	GAGAAAaGtG	...AtTtTct	aGAAGTgGca	TAtTtGATGg
cit ₁ syn.msf(Pcaa)	ACAgcTtGcC	GAGcAcgGcG	...AcTtctCT	cGAAGTCTGT	TACCTGCTOC

Fig.4. Alineamiento nucleotídico de los genes de citrato sintasa reportados. Los α y flaquean los oligonucleótidos j1 y j2

citayn.msf (Psecits)	gCAAeTgGcg	GAGAAAtcc0	AcTAcCT	GGAAAcuT0c	TACCTGCT0C
citayn.msf (Thacitsyn)	AgAtaTeatT	GccctctgGg0	cacAggATga	GGAgATC0cag	TATCT0tTcC
citayn.msf (Ecglta)

	801				850
citayn.msf (Coxcytsyn)	TGTATOGCGA	GCTcCCgAac	aaAGgagAaA	AGgAAAAATT	tGttcgcACG
citayn.msf (Rircits)	TcTATOGGGA	GCTaCCaAgT	agtGatCAGT	AttgtAAATTT	tactaAaAag
citayn.msf (Pcaa)	TcTAcGGCGA	atTGGCgACC	GcAGccCAGA	AGaAggAcTT	CgactAtcGg
citayn.msf (Psecits)	TGAAcGGCGA	GCTGCCcACC	GccGcGCCAG	AGgAAcAgTT	C0tcGgcACC
citayn.msf (Thacitsyn)	TGTATGGgAa	cCTcCCaACT	GaAcaGgAGC	tcagAAAAATa	CaagGAaACC
citayn.msf (Ecglta)

	851				900
citayn.msf (Coxcytsyn)	aTtaAagAac	ACACCAGcGT	ttATgAGCAA	gTGAcaAAaT	TtTTCaAT00
citayn.msf (Rircits)	GTtgcctcAtc	AttCatTaGT	gaATGAaagA	tTaccactATt	TaTTtcAAac
citayn.msf (Pcaa)	GTCgtGcACC	ACACCATGGT	gCATGAacAA	atT0tccgctT	TCTTCACCG0
citayn.msf (Psecits)	aTcaAGaACC	ACACCATGGT	tCAcAgCAG	tTGAAGcCT	TCTTCAACCG
citayn.msf (Thacitsyn)	GTCCAGAAGg	gttatAaGaT	aCcaGAtttt	gTcAtaAAcG	cCaTaAggCa
citayn.msf (Ecglta)

	901				950
citayn.msf (Coxcytsyn)	tTTtCaCtat	0AcGGCCATC	CTATGGCgAT	GgT0cTta0C	aCcaTCCGGC
citayn.msf (Rircits)	cTTTtGcaGt	tctctCtATC	CTAAGcAT	tAT0cTtGca	Cct0TtGGTt
citayn.msf (Pcaa)	tTTcCGCcGc	0ATCGCCATC	CgATGGCgT	cATUtgccGGC	tgcgTCCGGC
citayn.msf (Psecits)	cTTcCGCcGc	GAcGCCcATC	CgATGGCgT	GATUtgccGGC	gtgaTCCGGC
citayn.msf (Thacitsyn)	gcTgCcaagGg	GaatCGgATg	CTGTGGCaAT	Gca0aTg0cC	CgCgTtGca0
citayn.msf (Ecglta)

	951				1000
citayn.msf (Coxcytsyn)	CTCTcTcAGC	tTTCTATCAC	GAtGcGtTag	ACATCACtaA	aCCGgcCgAC
citayn.msf (Rircits)	CTCTcTcAGC	aTTCTATCct	GATtTaTaa	AtTTcAaTGA	a...acgAG
citayn.msf (Pcaa)	CTCTgTcGcC	cTTCTATCAC	GAcTCCcTcG	ACATCACtaA	tCCGcACgC
citayn.msf (Psecits)	CcTCTcTcGcC	cTTCTATCAC	GAcTCCcTcG	ACATCACtaA	CCCGaAgcA
citayn.msf (Thacitsyn)	CcaTggCAGC	aTcggAGaca	aAgTtCcaagT	ggAaCAaGGA	taCGgACaga
citayn.msf (Ecglta)

	1001				1050
citayn.msf (Coxcytsyn)	CGCGAAtTat	CGCCcATcG	AtTaATaGCC	AAaATGCCcA	CGcTgGCC0C
citayn.msf (Rircits)	tcAtGAAcTta	CGCctATTaG	AATGATtGCT	AAGATaCCtA	CtATcGct0C
citayn.msf (Pcaa)	CcCAtgGTcG	CaegCtTTCG	tATGATCGCC	AA0ATGCCGA	C0cTcCC0C
citayn.msf (Psecits)	CGCCaAGTctg	CGCCGcATCG	tTGATCGCC	CGCGAAtTat	CGCGAAtTat
citayn.msf (Thacitsyn)	gacGtTcGag	CaG.....	AATGATCGcG	AgCATGcCag	CGATaCCGcT
citayn.msf (Ecglta)

	1051				1100
citayn.msf (Coxcytsyn)	CATGagTAT	AAaTATcCA	TtGtCAaCC	GTTtATgAc	CctcgcggG
citayn.msf (Rircits)	aATGcCTAT	AAaTATcCA	TaGgCAcCA	GTTtATtAT	CCGaTaAtt
citayn.msf (Pcaa)	CATGCGcTAR	AAGTAcCaT	TcCGCCAGCC	cTTCgtTAC	C0GaaGACG
citayn.msf (Psecits)	CATGGTgT...	AAGTACTcCA	agGCGcAGCC	GaTgATgTAT	CC0cgTaAC
citayn.msf (Thacitsyn)	gAacGtGTac	AgGcACataA	TgaaCctGCC	GccGgagctT	CCGaaccat
citayn.msf (Ecglta)	accCaCaTAT	AgTtTgTCgg	gttcttatcCt	GcaAGtGAT	C0GagTAC0
.....

	1101				1150
citayn.msf (Coxcytsyn)	cgaTgAAATa	TGCCGAAAAA	TTtTtaCAtA	TGcTtTTTgG	cACCCCTTaC
citayn.msf (Rircits)	catTagAtTt	TaCcGAAAAA	TTtCTaCAtA	TGATGTTTGC	aACTcCTTGC
citayn.msf (Pcaa)	atcTcGACTA	TGCCcGgAAAT	TTcCTCGcCA	TGtgcTTTGC	cytgcCtTGC
citayn.msf (Psecits)	accTgAACTA	cCGCGAAAAA	TTcCTGCAcA	TGATGTTTca	cACCCCTTGC
citayn.msf (Thacitsyn)	cagaCAGCTA	cGCTGAgAgc	TTcCTGCAcG	ctgcGTTTgG	aGgaaGcG
citayn.msf (Ecglta)	ataaCAACat	TcatTtAAtT	TTtaatCAtC	TaAT.TTgaC	aATCatTca
.....

	1151				1200
citayn.msf (Coxcytsyn)	GAAgAgacaG	AcacctgAcCC	CGTctTAGCT	CgCGCGATGG	ATcGtAtTTT
citayn.msf (Rircits)	actAAATATA	AgTAAATTC	aaTaaTaaA	aAtGctcTta	ATaagATaTT
citayn.msf (Pcaa)	GAggAaTATG	tcGtCAATTC	gcGTCTGCC	CgCCCATGG	AccGcATcTT
.....

6

* J1

citayn.msf(Pseocita) GAgAccaAgo cGATcAgcCC CGTGCTgGCC aAgoCCATOG AcGcAtcTT
 citayn.msf(Thacitayn) acAAAggAaG AGATAgA... ..GCCCATGA ATAcggcaCT
 citayn.msf(Ecglta) cAAAgTgTt AcAaAcATta CcaGgaAaag CAataATOG gTaaAagTta

1201 1250
 citayn.msf(Coxcytaysn) TATCTTcAC CCcGATcACg AaCAaAAAtGc gTcAcAcgAcT ACcGTTCCgag
 citayn.msf(Rircita) TATCTTcAC CCcGATcACg AaCAaAAAtGc gTcAcAcgAcT ACcGTTCCgag
 citayn.msf(Pcaa) cATCTTgCAC GcGgATcATG AaCAGAAAGcGc ATcGAcCTcGc ACcGTTCCgag
 citayn.msf(Pseocita) cATCTTcAC CCcGATcACg AaCAaAAAtGc gTcAcAcgAcT ACcGTTCCgag
 citayn.msf(Thacitaysn) gATcTCTcAc cAcGACcATG AGgTcGcctGc ATcTACcAcGc cAcGgctTgg
 citayn.msf(Ecglta) TgaagTCggt atttcaCctA AgattAActt ATgTAAcagT gTGGaaagTat

1251 1300
 citayn.msf(Coxcytaysn) TCcCCCGcTC taCgGgAGCA AATCC... GTTTgCTGT ATtTcGcGcGg
 citayn.msf(Rircita) TcGCTGGCTC ATcAGGAGcT AATCC... cTTPGcATGT ATtAgCAcTg
 citayn.msf(Pcaa) TCcCCCGcTC tTCCGGcGcC AATCC... cTTPGcTGT ATcGcCCcGc
 citayn.msf(Pseocita) TgCGCGcTC cTCCGGcGcC AATCC... GTTcGcCTGc ATcGcCCcGc
 citayn.msf(Thacitaysn) TcGCGgTAcT AAcCctCtCA gAcat... GTActCcgGc ATAcGcCCAG
 citayn.msf(Ecglta) TgaCCaatTC ATcCGGgaCA gtTattagT GTagaCaaGT tTAataattc

1301 1350
 citayn.msf(Coxcytaysn) GTATTAgTGC tCTCTGGGcGc CcTGCCCAcG CGcGctGctAA TGAAGcctgt
 citayn.msf(Rircita) GTATTGcAcT acTtTGGGGc CcTGCTcAcG CGcGgGctAA TGAAGCAgT
 citayn.msf(Pcaa) GcATcGcAtg CCTCTGGGcGc CGCGCCcATG CGCGCCcAA cGAAcgtGcG
 citayn.msf(Pseocita) GcATcGcCgC CCTTgTGGGgA CGCGCCcATG GgCGCCcAA cGAAAGcTcGT
 citayn.msf(Thacitaysn) cTCTTGGcGc CCTCAaAGGT CCGcTcATG CGcGctGcGc TGAAGcGgTc
 citayn.msf(Ecglta) GgATTGcCaa gtaCTcGatt Cgcatttat tCgTcAcAA TgATcCctTt

1351 1400
 citayn.msf(Coxcytaysn) tTAAAtcATGT TgAgAaAaAT tCGTgATGAg aAaAAtATCG gccAATATt
 citayn.msf(Rircita) ATAAAtATCG TtAAAGAAAT tCGGcGTtct GAGAAAtTc CTAATATGT
 citayn.msf(Pcaa) cTCAACATCG TgAcgGAAAT CGGcGcGc GcCGcATc CggAATATt
 citayn.msf(Pseocita) cTgGcATCG TcGAcGAgAT CGCGcAcGc tCAACATCG acAAgTtCGT
 citayn.msf(Thacitaysn) ATAgcgaAt TcGAtGAgAT aaagpATcc GcCAAgTgG ATAAcTggtT
 citayn.msf(Ecglta) AcctgCAAGc gCccAGAgT CtGtaccac GcttttCccT CtttcaCaGa

1401 1450
 citayn.msf(Coxcytaysn) taAAaAAGCC AAAGACAaA AtGAcCctTT tCGtTtGATG GcCTTcGGCC
 citayn.msf(Rircita) aGctAAAGcT AAAGAAAGA AtGATCCATt tAGGTtAAATG GctTtGctC
 citayn.msf(Pcaa) CGcGcGcGc AAAGACAaA AcGATCCGTT CcGAtTtGATG GcCTTcGGcTc
 citayn.msf(Pseocita) CGGAAGcGc AAAGACAaA AcGATCCGTT CcGAtTtGATG GcCTTcGGcC
 citayn.msf(Thacitaysn) C...AAcGAc AAcataAaA AcGgaaGaa gAGAcTcATG GcCTTcGGcC
 citayn.msf(Ecglta) cGcGcGAGCC AAAtAaAaA cGgTaaagc CAGGTtGATG tCCgaaGGCA

1451 1500
 citayn.msf(Coxcytaysn) ATCGcGTtTA CAaAAAtTAC GATCCcCGcG CCAaAGTCAT GcAGAAaACC
 citayn.msf(Rircita) ATCGcGTtTA tAAAGcTAcT GAcCCGGcGc CCgcaGTAct tAAAGAAcT
 citayn.msf(Pcaa) ATCGcGTtTA CAaAAAcTAc GATCCcCGcG CCAAGATcAT GcAGAAAGcG
 citayn.msf(Pseocita) ATCGcGTtTA CAaAAAcTAc GAcCCGGcGc CCAAGcTAcT GcAGcAGAcC
 citayn.msf(Thacitaysn) AcAGgGTtTA CAaAAAcTAc GATCCcAGg CAaAGATtT CAAGgGcAcT
 citayn.msf(Ecglta) AatttaagTt CcgGcAgTct tA...CGCA AtAAAGcGTc AAgGAGAcC

1501 1550
 citayn.msf(Coxcytaysn) TGctAtGAAG TCCTCgAtGc cGTtGGCC... gCACAAtA AAccttTATT
 citayn.msf(Rircita) TGctAaGAAG TatTAAAtGA AcTAGGcCAG tTagACAAt tACCGcTtT
 citayn.msf(Pcaa) gcgcAcGAGG TCCTCgGcGA AcTcGGC... ATCAAGgAcG ATCCGcTgTt
 citayn.msf(Pseocita) TGcGAcGAGG TCCTCgAgGA gcTgGGC... ATCA...AcG AcCCCGcAcT
 citayn.msf(Thacitaysn) gcTgAgAaAc TctcAGcAA gaagccagAG gTgcACAA... GgTATa
 citayn.msf(Ecglta) TaaatgGctG atacaAAAGc AaaactCacc cTCAAcggGg ATAcAgctgT

1551 1600
 citayn.msf(Coxcytaysn) TaAAcTAcCG ATaAAAtTAg AgaAaAtTcG gtTagAgGAT GAcTATTTCa
 citayn.msf(Rircita) acAAATaGcA ATagAAcTgG AAGctcTCCG tCTCAaAGAT GAATATTTCa
 citayn.msf(Pcaa) cGAcATcCGC ATcGAAcTgG AgcgtATCCG gTgAccGAT GAcTATTTCa

citayn.msf(Pseocits)	gGAACtGCGG	ATGAAAGtGg	AAGAAATCGC	cGccAcGAc	cccTAcTTCg
citayn.msf(Thacitayn)	TGAgATGcCC	AcGAAAGtTcG	AAGAcTtTcG	caCaAGC...	...caTTCg
citayn.msf(Ecglta)	TGAAATGtGat	gTCCtGaaag	gaacgTgTgG	tcCaagAtGt	atgATATCC
1601					
citayn.msf(Coxcytsyn)	TTGAAgAAaAA	aCTtTATCCG	AATGtGAtT	TtTAtTCCGG	tTgTAcgctA
citayn.msf(Rircits)	TTGAAAgAA	atTATATCCA	AATGtTcGAtT	TtTAtTcCaGG	CATcATctat
citayn.msf(Pcaa)	TcGAAgAAgAA	gCTtTAcCCG	AATGtTcGAtT	TcTAtTCCGG	CATcAcgctTc
citayn.msf(Pseocits)	TgGAAcGcAA	cCTgTAcCCG	AAcGtCCGAtT	TcTAcTCCGG	gATcATctcTc
citayn.msf(Thacitayn)	gTtCAAAGgg	caTATATCCG	AAcacgGAtT	acTtTCCGG	aATgAttaac
citayn.msf(Ecglta)	gTactctcgg	ttcAAaaggt	gctTcAcCT	TtgAccCaGG	CtTCActtca
1651					
citayn.msf(Coxcytsyn)	AAcGcATtG	GCATCCC...	...tctAA	ATGTTtACGG	TaaTtTTCG
citayn.msf(Rircits)	AAAGcTATG	GEATACC...	...GtCgcAA	ATGTTcACcG	TactTtTTCG
citayn.msf(Pcaa)	AAGGcGcTCC	GCtTCCC...	...cAcGAcC	ATGTTcACcGG	TactTtTTCG
citayn.msf(Pseocits)	AAGGcGATCC	GCATtCC...	...GACCgC	ATGTTcACcG	TgAtTtTTCG
citayn.msf(Thacitayn)	AtGcCcaATg	GatTCCcGct	gAgGAcAAC	ATAtcCACGG	cgcTtTTCG
citayn.msf(Ecglta)	AccGcAtcCt	CGcaatCtaa	aAttACT..t	tTAtTgAtGG	TgAtgaaGt
1701					
citayn.msf(Coxcytsyn)	ctTAtCaCGa	AcGgTgGGCT	GGATtCACA	tTGGAtGGAA	AtGATgagca
citayn.msf(Rircits)	aaTAgCaaGg	ACCGTAgGT	GGATgGCACA	aTGGAAaGAA	ATGcaCGAAG
citayn.msf(Pcaa)	cCTcGcCCcC	ACCGTcGGCT	GGATtgcCCA	gTGGAAcGAg	ATGATCGAAG
citayn.msf(Pseocits)	gCTTgCgCGT	ACCGTcGGCT	GGATtCtGCA	CTGGcAOGAA	ATGcTctcG
citayn.msf(Thacitayn)	gCTAtCCaGg	gttacaGGT	GgcaGgCACA	CtCAtaGAG	tacgTgGgG
citayn.msf(Ecglta)	atTtGctGc	ACCGcGtTt	cccgatCgat	CaGctGgcgA	ccGATtctAA
1751					
citayn.msf(Coxcytsyn)	gTCCCOAtCA	tcGcTcGt	CGCCcAGAC	AatTAtACAC	aGGcAAaACA
citayn.msf(Rircits)	CTAcTGAaCA	aaaaATcAG	agaCctAGAC	AGcTtTACAC	tGGtAtgTA
citayn.msf(Pcaa)	ATCCGgATCA	GcGtATcGc	CGCCcGcC	AGCtTAtAC	CGGcGcAcC
citayn.msf(Pseocits)	gcCCcTAcAA	G...ATcGc	CGCCcGcC	AGCtTAtAC	CGGcGcAcC
citayn.msf(Thacitayn)	AcC...AgCA	GAcATgAt	agCCGAGAg	cGgTtTAcGt	CGGtCctgCA
citayn.msf(Ecglta)	cTaCctggaA	GtttGtTaca	tcCtgcGAA	tGgTpaAAaA	CcGaCtAcAgg
1801					
citayn.msf(Coxcytsyn)	gAGCGAGAAG	taaTctCgt	ggATaAcGt	cAGCAtAAc	agCgaaAAg
citayn.msf(Rircits)	CATaGAG...	.aCTataagT	gtATtgaTA	AAGaaAGTga	cgCATtAAA
citayn.msf(Pcaa)	CtCGCGcAAT	aCTTcCgCT	ttcaaAgC...	...GCTAgCg	gaCATcctg
citayn.msf(Pseocits)	CAGCGcGAcT	TcAcCGcCct	caAggATcG...	.cGGCTGAaA	ccCgTAcgC
citayn.msf(Thacitayn)	gAGcAAAgT	aCTTAcCcaT	cgcTgAAaGA	AAGtGAAaAC	actTtctca
citayn.msf(Ecglta)	a.....
1851					
citayn.msf(Coxcytsyn)	AgaTAAaGAA	AgaaatcTct	GgCtCctTgT	gccagaCaCA	AGAAcgaTgC
citayn.msf(Rircits)	tTGTAtgAt	TAGCaatTtA	GtGAtTtAGa	tgAagcattA	AGAAaTcTa
citayn.msf(Pcaa)	ATGAaAcGAA	tAcCcggtG	cTACGCT...g	cgAtcTgCA	ggTtgaatG
citayn.msf(Pseocits)	cTGGcGAGAA	AgGctgcTtC	GgcAGCc...c	tttttggTcC	cGccctTTTC
citayn.msf(Thacitayn)	AatTtctatt	AAatAtTTTT	AtataCAAG	gcgctTgTgt	TGgAAATTTT
citayn.msf(Ecglta)
1901					
citayn.msf(Coxcytsyn)	CTAtcGttAT	CcAgAAGTca	cagcGAcCtc	catTTTTaaC	tttGtgatCC
citayn.msf(Rircits)	ATtaactcAT	Ct.....	CGAAcAGTgG	tgCtTgAcGgCC
citayn.msf(Pcaa)	CaaTgCgAc	CtCcgGacAc	aaAAAAacGc	ccCGGAgCg	gTCTTTTgC
citayn.msf(Pseocits)	GatTcGgAT	gTctgtgtt	ttCGGAcCC	aaCGaagGcG
citayn.msf(Thacitayn)
citayn.msf(Ecglta)
1950					
citayn.msf(Coxcytsyn)	CGCgCAGatg	gaAcCcaGGc	gcgcttAGC	gCgcTgCgca	TtaCGTGCcG
citayn.msf(Rircits)
citayn.msf(Pcaa)	ttgcaAagGC	cTAgCGcGAg	CaTgCGaAGa	CgtTgaAAcG	gacCGTcCtG

Secuencia directa de fragmentos de PCR

La purificación de ADN total, así como la electroforesis, la digestión con enzimas de restricción y la hibridación se llevó a cabo de acuerdo a Maniatis.

La reacción de PCR se realizó como se describe en el apéndice 1. La síntesis del fragmento se muestra en la foto 2

La secuencia de ácidos nucleicos se realizó de acuerdo al método de Sanger [34] el cual se describe en el apéndice 1.

Se utilizó ADN total de la cepa CFN29910 como templado así como los oligonucleótidos sintéticos J1 y J2 para obtener un producto de PCR (400 pares de bases) sintetizado a partir de la citrato sintasa cromosomal de la cepa antes mencionada. El producto de PCR fué secuenciado en doble cadena utilizando los oligonucleótidos J1 y J2 como primers.

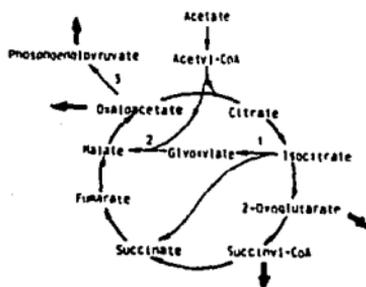


FIG. 4. The TCA cycle and the glyoxylate bypass. The enzymes are as follows. 1, Isocitrate lyase; 2, malate synthase A; 3, phosphoenolpyruvate carboxykinase. Heavy arrows represent fluxes to biosynthesis.

5.- RESULTADOS.

Se presentá la secuencia nucleotídica del producto de PCR del gene cromosomal de Rhizobium tropici así como su comparación, alineamiento, distancia y relación filogenética con los genes de citrato sintasa de E coli, Pseudomonas aeruginosa, Rickettsia prowazeki, Thermoplasma acidophilum, Coxiella burnetii, y el gene plasmídico de Rhizobium tropici. Se muestran los cambios en nucleótidos y su traducción a aminoácidos.

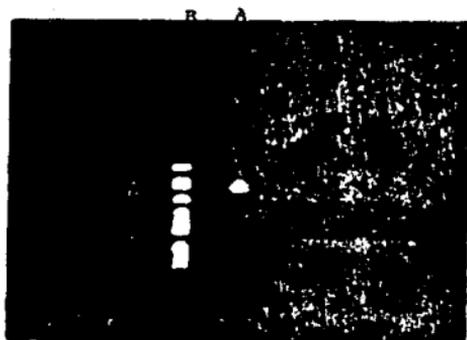


FOTO.2. A) Fragmento de PCR (400pb) del gene cromosomal de citrato sintasa de Rhizobium tropici, utilizando los oligonucleótidos j1 y j2 descritos. b) Marcador de peso molecular plásmido PAT 153 digerido con la enzima Hae III. Patrón de restricción, 587,458,434,339 y 267 pares de bases.

Posa 5-3

Symbol comparison table: 111_DnaSeq:[Uwocp7.Gcpcore.Data.RunData]Nusgoodna.
CompCheck: 6576

Gap Weight: 5.000 Average Match: 1.000
Length Weight: 0.300 Average Mismatch: 0.000

Quality: 321.0 Length: 302
Ratio: 0.972 Gaps: 0

Percent Similarity: 97.194

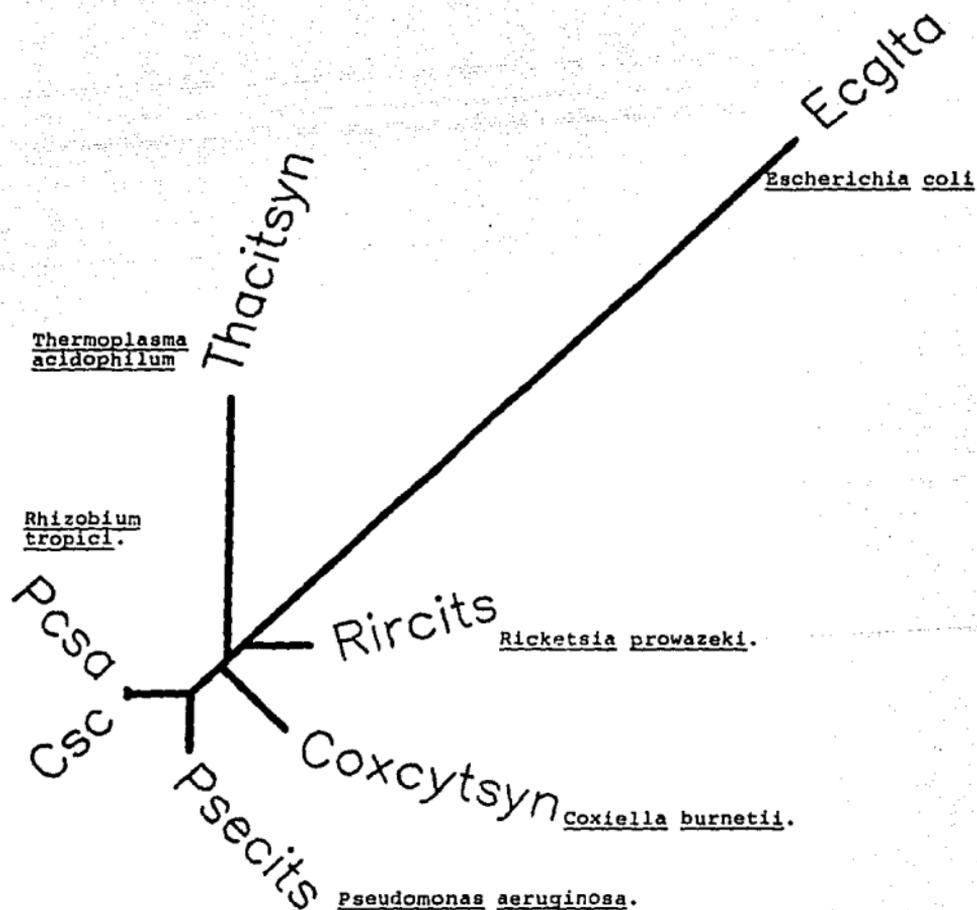
Csc x Posa July 9, 1992 16:12 ..

```

1 AAGATGCCGACCATCGCCGCATGGCCCTACAAGTACCATATCGCCAGCCC 50
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1 AAGATGCCGACCCTTGCCCGCCATGGCCCTACAAGTACCATATCGCCAGCCC 50
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
51 TTCGTTTACCCGAAGAACGATCTCGACTATGCATCGAACTTCCTGCGCAT 100
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
51 TTCGTTTACCCGAAGAACGATCTCGACTATGCGTCGAATTCCTGCGCAT 100
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
101 GTGCTTTGCCGTGCCCTGCGAGGAATATGTGGTCAATCCGTGCTTGCCC 150
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
101 GTGCTTTGCCGTGCCCTGCGAGGAATATGTGGTCAATCCGTGCTTGCCC 150
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
151 GCGCATGGACCGCATCTTCATCTGCAACGCGGATCATGAGCAGAACGCAT 200
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
151 GCGCATGGACCGCATCTTCATCTGCAACGCGGATCATGAGCAGAACGCAT 200
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
201 CGACCTCGACGGTTGCGCTTCCCGGCTCTCCGGGCGCAATCCC TTGCT 250
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
201 CGACCTCGACGGTTGCGCTTCCCGGCTCTCCGGGCGCAATCCC TTGCT 250
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
251 TGCATXXXXXCCGCATCGCATGCTCTCGGGCGCGCCCATGGCGGGCGCC 300
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
251 TGCATCGCCGCGCATCGCATGCTCTCGGGCGCGCCCATGGCGGGCGCC 300
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
301 AACGAACGTGCGCTCAACATGCTAACGGAATCGGCACGGTCGACCG 350
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
301 AACGAACGTGCGCTCAACATGCTAACGGAATCGGCACGGTCGACCG 350

```

Secuencia nucleotídica del producto de PCR de citrato sintasa de la cepa CFN29910
alineamiento, comparación, porcentaje de similitud y de identidad con el gene plasmídico de
Rhizobium tropici CFN 299, lo anterior fue realizado con el programa GAP.



Arbol filogenético del gene cromosomal de citrato sintasa de Rhizobium tropici.

Tabla de sustituciones en el gene cromosomal de citrato sintasa de Rhizobium tropici con referencia al gene plasmídico.

	POSICION	TRIPLETE	AMINOACIDO	TIPO DE SUSTITUCION
pcsa	12	ACC	TREONINA	
csc	12	ACG	TREONINA	SILENCIOSA
pcsa	13	CTT	LEUCINA	
csc	13	ATC	ISOLEUCINA	CONSERVATIVA
pcsa	15	ATC	LEUCINA	
csc	15	CTT	ISOLEUCINA	CONSERVATIVA
pcsa	44	CGC	ARGININA	
csc	44	CGG	ARGININA	SILENCIOSA
pcsa	83	GCA	ALANINA	
csc	83	GCG	ALANINA	SILENCIOSA
pcsa	89	AAC	ASPARAGINA	
csc	89	AAT	ASPARAGINA	SILENCIOSA
pcsa	190	GAG	GLUTAMICO	
csc	190	GAA	GLUTAMICO	SILENCIOSA
pcsa	220	CTT	LEUCINA	
csc	220	CTC	LEUCINA	SILENCIOSA
pcsa	282	GGG	GLICINA	
csc	282	GCG	GLICINA	SILENCIOSA
pcsa	324	CTA	LEUCINA	
csc	324	CTG	LEUCINA	SILENCIOSA

Número de cambios silenciosos: 8

pcsa= citrato sintasa plasmídica.

Número de cambios conservativos: 2

csc= citrato sintasa cromosomal.

Número de cambios radicales: 0

La posición nucleotídica 1030 en los genes de citrato sintasa reportados hasta el momento corresponden en esta tabla a la posición nucleotídica 1.

6.- DISCUSION.

Los resultados obtenidos nos indican que el gene plasmídico (pcsA) de citrato sintasa tal vez se obtuvo por medio de una duplicación del gene cromosomal mediante un proceso de transposición; ya que como se ha mencionado anteriormente en la región 5' del pcsA se ha encontrado una secuencia parecida en un 85% a la IS1 de E. coli.

La adquisición de una copia adicional de un gene de citrato sintasa le confiere ciertas ventajas a la bacteria entre las que se encuentran mayor producción de citrato. En condiciones limitantes de hierro las bacterias producen quelantes o sideroforos para atrapar hierro y transportarlo al interior de la célula. El citrato funciona como quelante de hierro en Bradyrhizobium japonicum [36] en E. coli [37] y en otros microorganismos y quizás en Rhizobium podría tener el mismo papel, ya que en la posición +4 -17 del pcsA se ha encontrado una secuencia que es muy semejante a una caja Fur [38,39]; dicha caja fur nos recuerda a la región regulatoria del gene tonB de E. coli [40] el cual está envuelto en la regulación y asimilación de hierro. Además se ha observado que la actividad del pcsA y la expresión del gene plasmídico se ve incrementada con la limitación de hierro en la cepa CFN299 de Rhizobium tropici.

La disponibilidad de hierro es un factor limitante para el crecimiento de muchos microorganismos. En el caso de Rhizobium, la adquisición de hierro es esencial en la síntesis de diversas enzimas que intervienen en la fijación de nitrógeno como la nitrogenasa y la leghemoglobina, las cuales tienen papeles determinantes durante la fijación biológica de nitrógeno. Otra posible ventaja de tener un gene adicional de citrato sintasa es la posibilidad de que cada uno de los genes tuviera papeles regulatorios distintos, expresándose uno o el otro en condiciones diferentes. De esta manera se genera una respuesta fisiológica eficaz que permite drenar los productos de la reacción de condensación de sus enzimas hacia diversas vías metabólicas, dando lugar a sustratos indispensables en el metabolismo de la bacteria así como para su interacción con la planta durante la fijación biológica del nitrógeno .

Por otra parte el gene plasmídico de citrato sintasa al ser inactivado por una inserción Tn5 mob (cepa CFN 130) causa que la bacteria forme de 30 a 50 % del número de nódulos con respecto a la cepa silvestre. Esta inserción también provoca un decremento en la actividad

específica de la citrato sintasa cuando la bacteria crece en medio mínimo con sacarosa, por lo que el gene plasmídico es requerido para el óptimo crecimiento en sacarosa. La expresión del gene plasmídico está regulada por la fuente de carbono, la sacarosa es el principal componente de carbono en el floema de *P. vulgaris* [41] y quizá es un importante nutriente para la bacteria en el hilo de infección. La capacidad reducida de nodulación tal vez este relacionada con las deficiencias de crecimiento de la cepa CFN 130 durante el proceso de infección.

La proteína del gene cromosomal muestra un alto grado de homología con respecto al producto del gene plasmídico. Al parecer los cambios registrados en ciertos nucleótidos del gene cromosomal no afectan la estructura primaria de la proteína ni los aminoácidos involucrados con el sitio activo de la enzima. Esto proporciona una posible evidencia de que el producto del gene cromosomal es una citrato sintasa funcional.

Se considera que el objetivo del presente trabajo se cumplió y con esto se contribuye al conocimiento sobre el origen de alguna información genética en plásmidos.

Posteriormente y como una continuación del mismo trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1.- Comparar las secuencias de ADN de las zonas regulatorias de ambos genes para verificar si existen semejanzas o diferencias entre ellos, y de ahí, tratar de entender el funcionamiento de los dos genes de citrato sintasa.

2.- Mutagenizar la citrato sintasa cromosomal con una fusión de un gene reporte, una vez obtenida, la mutante cromosomal se comparará con la fusión en el gene plasmídico para entender la participación de cada uno de ellos tanto en vida libre como en simbiosis.

3.- Se pretende obtener la doble mutante que elimine la función de los dos genes de citrato sintasa.

Este proyecto de investigación ha sido aceptado para realizarse dentro del plan de Maestría en Investigación Biomédica Básica y se llevara a cabo en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno.

APENDICE 1

POLIMERASA CHAIN REACCTION (PCR).

Componentes para una reacción de PCR.

50 microlitros de células o de 0.5 a 1 microlitro de ADN (50 nanogramos de ADN).

19 microlitros de agua destilada y esterilizada.

10 microlitros de dNTPS buffer (concentración final de 0.2 mM de cada uno).

10 microlitros de Tris/MgCl amortiguador (concentración final de 2 mM MgCl 12/20 mM tris).

5 microlitros de Tween 20 Nonidet P-40 amortiguador (concentración final de 0.05% de cada uno).

2.5 microlitros de oligónucleotido 1 diluido (concentración final de 12.5 picomoles de cada uno de los oligónucleotidos).

2.5 microlitros de oligónucleotido 2 diluido.

1 unidad de Taq polimerasa.

Volumen final = 100 microlitros en un tubo eppendorf de 0.5 ml. Al final se adiciona parafina líquida para evitar la evaporación.

Amortiguadores

Oligonucleótidos. Dilución de 5 picomoles por microlitro de cada primer.

dNTPS: 2 mM de cada uno (dTCCG, &ATP).

Tris /MgCl : 20 mM MgCl₂ + 200mM Tris HCl pH 8.0.

Tween/Nonidet: 1% solución de cada uno. Tween 20 y Nonidet P-40.

Ciclos y temperatura del PCR.

Paso 1 93 C por 2 minutos.

Paso 2 93 C por 45 segundos.

Paso 3 62 C por 45 segundos.

Paso 4 72 C por 2 minutos.

Paso 5 los pasos 2 y 4 se repiten 34 veces.

Paso 6 72 C por 5 minutos.

Paso 7 6 C hasta remover el tubo de la máquina de PCR.

Verificar la amplificación.

5 microlitros del producto de PCR más 5 microlitros de buffer para ADN (25% de ficoll, 0.5M de EDTA y G naranja) se corren por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en Tris boratos 1X (Tris Boratos 10X = trizma base 60.6gr, ácido bórico 27.8gr, EDTA 3.72 gr. Cbp para 100ml de agua) a 120 volts por aproximadamente 40 minutos.

Teñir el gel en 0.5 microgramos por mililitro de bromuro de etidio, de 15 - 30 minutos y visualizar bajo luz ultravioleta.

Purificación de los productos de PCR por Qiagen tip 5.

- 1.- Transferir la fase acuosa (producto de PCR) a un tubo estéril y adicionar 1 mililitro de buffer QPT.
- 2.- Equilibrar el Qiagen tip 5 con un mililitro de amortiguador QPT.
- 3.- Aplicar la muestra en el Qiagen tip 5.
- 4.- Lavar el Qiagen tip 5 tres veces con un mililitro de buffer QB, forzar la solución permanente.
- 5.- Eluir el ADN con 0.8 volúmenes de amortiguador QF.
- 6.- Precipitar el ADN con 0.8 volúmenes de isopropanol y 0.3 M de acetato de sodio pH 4.8. Incubar 10 minutos en hielo y centrifugar a 15,000 rpm por 30 minutos a 4 C, remover el isopropanol con una pipeta.
- 7.- Lavar el ADN una sola vez con etanol al 80%; secar por 3 minutos al vacío y resuspender en el volúmen adecuado en agua.

Composición de amortiguadores.

Amortiguador QPT: 400 mM de NaCl, 50 mM de MOPS, 0.15% de tritón X- 100, pH 7.0.

Amortiguador QB : 750 mM de NaCl, 50 mM de MOPS, 15% de etanol;pH 7.0.

Amortiguador QF : 1.25 M de NaCl, 50 mM de MOPS, 15% de etanol; pH 8.2.

Todos los amortiguadores se guardan a temperatura ambiente.

SECUENCIA DIRECTA DE PRODUCTOS DE PCR DE DOBLE CADENA.

Sanger *et al* [34] han desarrollado un método para secuenciar el ADN el cual se basa en la propiedad de la DNA polimerasa I para sintetizar una copia radioactiva complementaria de un templado de ADN de cadena sencilla o de doble cadena; utilizando un segmento corto de ADN como primer. Se usan los análogos dideoxi de los dideoxinucleótidos trifosfatados normales que impiden continuar la polimerización.

La síntesis de ADN se realiza en presencia de los 4 deoxinucleótidos trifosfatados; cualquiera de ellos puede estar radioactivo. En cada reacción se añade cada uno de los 4 dideoxinucleótidos (una reacción para cada una de las bases G, C, T, A) por lo que en cada una de las anteriores existen moléculas radioactivas de ADN sintetizadas parcialmente hasta donde se encuentra un dideoxi. Estas cadenas sintetizadas poseen el extremo 5' en común pero varían en tamaño (longitud) hacia el extremo 3'.

Las nuevas hebras de ADN radioactivo se pueden separar por electroforesis en un gel de acrilamida.

Las cuatro reacciones se colocan en el gel, se seca al vacío y se autorradiografía para poder leer la secuencia.

PROCEDIMIENTO.

A) Annealling: Desnaturalización de la doble cadena de ADN en presencia del primer.

Componentes: 7.3 microlitros ADN (producto de PCR limpio).

4.7 Annealling buffer.

2.0 Primer (40 picomola\ microlitro).

Mezclar todos los componentes en un tubo eppendorf; hervir por 3 minutos. Colocar el tubo rápidamente en un baño con etanol y hielo seco.

B) Reacción de marcado.

1.0 microlitros de 35S dATP (400kbq)

1.0 microlitros de H₂O.

3.0 microlitros de labelling Mix.

2.0 microlitros de enzima polimerasa T7.

Mezclar los componentes rápidamente por centrifugación.

C) Annealling y reacción de terminación.

6.0 microlitros de la reacción de marcado se mezclan con el annealling (ADN primer), se incuban 5 minutos a temperatura ambiente.

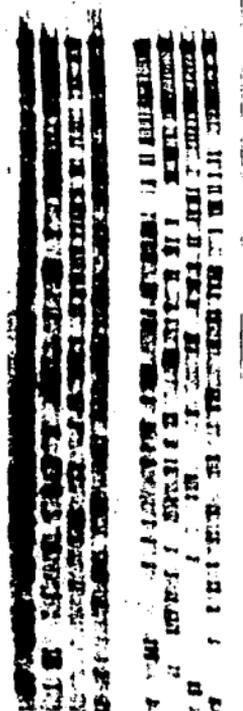
D) Reacción de terminación.

Pipetear 2.5 microlitros de las mezclas de G, A, T, y C dentro de pozos en placas de titulación; precalentar a 37° C y posteriormente adicionar 4.5 microlitros del annealling y reacción de marcado en cada pozo; mezclar por centrifugación e incubar a 37° C durante 5 minutos; adicionar 5 microlitros de la solución stop en cada reacción.

Desnaturalizar las muestras a 80° C durante 3 minutos y cargar 3 microlitros de cada una de las reacciones (G A T C) en un gel de acrilamida, correrlo entre 35 y 40 watts en buffer TB 1X. El gel se fija en ácido acético al 10% y metanol a la misma concentración por 15 minutos; se transfiere a un papel whatman de 3 milímetros y se cubre con una película plástica. Se seca al vacío a 80° C, después de lo cual se remueve la película plástica y se pone en un cassette de autorradiografía con un film para rayos X. Se expone toda la noche a temperatura ambiente y se revela al día siguiente.

SECUENCIA DIRECTA DE PCR.

5'--3' 3'--5'
TCGA TCGA



7.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Beringer, J.E., Brewin, N., Johnston, A.W.B., Schulman, H.M. y Hopwood, D.A.(1979). Proc. R. Soc. Lond. B. 200-209.
- 2.- Postgate, J.(1978). Nitrogen Fixation. Studies in Biology. Edward Arnold (Publishers) LTD. 92.
- 3.- Ruvkun, G.B. by Ausubel F-M.(1980). Interspecies Homology of Nitrogenase Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77(1): 191-195.
- 4.- Winttenberg, J.B., Bergensen, F.J. Appleby, C.A. y Turner, G.L.(1974). The Role of Leghemoglobin in Nitrogen Fixation by Bacteroids Isolated from Soybean Root Nodules. J. Biol. Chem. 249: 4057.
- 5.- Sidlei-Lumbroso, R., Kleiman, L. y Schulman, H.M.(1978). Biochemical Evidence that Leghemoglobin Genes are Present in the Soybean but no in Rhizobium genome. Nature. 273: 558.
- 6.- Cutting, J.A. y Schulman, H.M.(1969). Biochemica et- Biophysica acta. 192: 486.
- 7.- Long, S.R.(1989). Rhizobium- Legume Nodulation: Life Together in the Underground. Cell. 56: 203-214.
- 8.- Hooykaas, P.J., Ledebur, A.M., Wikijne, J., Schilperoord, R.A., Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Casse, F., Bouchard, C., Julliot, J.S. y Denarie, J.(1978). Detection, Isolation and Characterization of Large Plasmids in Rhizobium. In: Evans, H.J., Bottomley, P.J. y Newton, W.E. (eds.) Nitrogen Fixation Research Progress. Martinus Nijhoff Publishers.

- 9.- Martínez, E., Romero, D. y Palacios, R.(1990). The Rhizobium Genome . Critical Reviews in Plant Sciences. 2: 59-93.
- 10.- Van Kammen, A.(1984). Suggested Nomenclature for Plant Genes Involved in nodulation and Symbiosis. Plant. Mol. Biol. Rep. 2: 43-45.
- 11.- Declauney, A. y Verma ,D.P.S.(1988). Cloned Nodulin Genes for Symbiotic Nitrogen Fixation . Plant. Mol. Biol. Rep. 6: 279-285.
- 12.- Denarie, J. DeBelle, F. y Rosenberg.(1992). Signaling and Host Range Variation in Nodulation .Ann. Rev. Microbiol. 46: 497-531.
- 13.- Martínez - Romero, E.(1991). Rhizobium tropici, a Novel Species Nodulating Phaseolus vulgaris L.Beans and Leucaena sp. Trees. Inter. J. Syst. Bact. 41:417-426.
- 14.- M.A.Pardo, et al. Manuscrito en preparación.
- 15.- Nimmo, H.G.(1987). The Tricarboxilic Acid Cycle and Anaplerotic Reactions. En : Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Neidhardt, F.C.
- 16.- Weitzman ,P.D.J. Danson, J.(1976). Citrate Synthase. Curr.Top. Reg. 10: 161-204.
- 17.- Dobzhanski, Th., et al.(1983) Evolution. Cap. 3.
- 18.- Alberts, et al.(1989). Molecular Biology of the Cell. pp 820-835.
- 20.- Hynes, M.F., et al.(1992). The Reiterated fixN Operons of Rhizobium leguminosarum. Sixth International Symposium on Molecular Plant- Microbe Interactions. University of Washington.
- 21.- Flores, M., et al.(1988). Genomic Inestability in Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 170: 1191-1196.

- 22.- Berry, J.O., et al.(1984). Induced Plasmid - Genome Rearrangements in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 157: 218-224.
- 23.- Romero, D., et al.(1991). Amplification and Deletion of a nod -nif Region in the Symbiotic Plasmid of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 173: 2435-2441.
- 24.- Quinto, C., et al.(1982). Reiteration of Nitrogen Fixation Gene Sequence in Rhizobium phaseoli. Nature. 299: 724-726.
- 25.- Marie- Helene Renaliet. et al.(1987). A New Symbiotic Cluster on the psym Megaplasmid of Rhizobium meliloti 2011 Carries a Funcional Fix Gene Repeat and a nod Locus. J. Bacteriol. 169: 2231-2238.
- 26.- C. Marie, M.A., Barny. y J.A.Downie.(1992). Rhizobium leguminosarum has two Glucosamine Synthetase, glmS and nodM Required for Nodulation and Development of Nitrogen Fixation Nodules. 7: 843-851.
- 27.- Selander, et al.(1986). Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis For Bacterial Population Genetics and Systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51: 873- 884.
- 28.-Young, J.P.W. (1985) Rhizobium Population Genetics : Enzyme Polymorphism in Isolates From Peas, Clover, Beans and Lucerne Grown at the Same Site. J. Gen. Microbiol. 131: 2399-2408.
- 29.-Pifero, et al.(1988) Genetic Diversity and Relationships among Isolates of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2825-2832.
- 30.- Dowzhanski,Th. et al (1983). Evolution. Cap.9.
- 31.- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.(1982). Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY. CSH Laboratory.

- 32.- J.P.W. Young, et al.(1991). Phylogeny of the Phototropic Rhizobium Strain BTail by Polymerase Chain Reaction -Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. J. Bacteriol. 173: 2271-2277.
- 33.- Woese, C.(1987). Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-227.
- 34.- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R.(1977). Sequencing with Terminating Inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
- 35.- Nei, Masatoshi.(1987). Molecular Evolutionary Genetics. Chapter 11.
- 36.- Guerinot, M.L., et al.(1990). Citrate as a Siderophore in Bradyrhizobium japonicum. J.Bacteriol. 172: 3289-3303.
- 37.-Hussein, S., et al.(1981). Citrate-dependent Iron Transport System in Escherichia coli k-12. Eur. J. Biochem. 117: 431-437.
- 38.- De Lorenzo ,V., et al.(1987). Operator Sequences of the Aerobactin Operon of Plasmid Colv-k30 Binding the Ferric uptake Regulation (Fur) Repressor. J. Bact. 169: 2624- 2630.
- 39.- Bagg, et al.(1987). Ferric uptake Regulation Protein Acts as a Repressor Employing Iron (II) as a Cofactor to Bind the Operator of an Iron Transport Operon. Biochemistry. 26: 5471-5477.
- 40.- Postle, K., et al.(1983). DNA sequence of the Escherichia coli tonB gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 5235-5239.
- 41.- Fisher ,D.B.(1978). The Stimulation of Sugar Concentration in Individual Sieve-tube Elements by Negative Staining. Planta. 139: 19-24.