

13
21-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES DE TESIS
FAC. DE QUIMICA

MUTAGENESIS DIRIGIDA DEL LOCUS QUE
COMPLEMENTA A LA MUTANTE LM01
DE Rhizobium etli

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ARTURO CALDERON FLORES



MEXICO, D. F.

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. VELEZ PRATT GUADALUPE
Vocal	Prof. MATEOS MARCOS ROSA DEL CARMEN
Secretario	Prof. CALDERON JIMENEZ JORGE FERNANDO
1er Suplente	Prof. TZUSUKI REYES MARIA GUADALUPE
2do Suplente	Prof. ORTIZ JIMENEZ MARCO ANTONIO

**Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones
Biomédicas. UNAM**

Asesor del tema: Dr. Jorge Fernando Calderón Jiménez



Sustentante: Arturo Calderón Flores



**Between the acting of a dreadful thing
And the first motion, all the interim is
Like a phantasma or a hideous dream.**

W. Shakespear

**Pero en las zonas ínfimas del ojo
no ocurre nada, no, sólo esta luz**

....

**Muerte sin fin.
José Gorostiza**

**A TODOS LOS QUE CONVIVIERON Y CONVIVEN
CONMIGO -aún a nivel de pañilo-**

A LOS QUE INVIERTEN EN ESPERA DEL FUTURO

**A GISELA DU PONT POR SU ENSEÑANZA
Y ASESORIA TECNICA**

**A LOS QUE OCUPEN SU TIEMPO
EN LEER ESTAS PAGINAS**

GRACIAS.

No hay mala, un error,
que corrección de verdad.

ÍNDICE

Capítulo	página.
Introducción.	1
Planteamiento del problema	12
Objetivos	14
Material y métodos	15
Resultados	30
Discusión	43
Conclusiones	45
Bibliografía	46

INTRODUCCIÓN

- No solo los que habitan en organismos

1- NITRÓGENO EN LA TIERRA, NITRÓGENO EN LOS SERES VIVOS.

El nitrógeno es parte integral de todas las células vivas, forma parte de las estructuras de soporte de las células, participa en las transformaciones químicas de los seres vivos como parte integral de las cadenas de aminoácidos de las proteínas y de las bases puricas y pirimidicas de las cadenas de DNA y RNA. Es el entorno de los seres vivos el que les provee de todos los elementos, el nitrógeno está presente en la tierra en distintos estados de oxidación y formas físicas, pero solo el que está en la superficie de la corteza terrestre, el agua y la atmósfera puede ser utilizado por los seres vivos (46). El elemento al ser utilizado por los organismos sufre cambios en el estado de oxidación dando lugar al ciclo del nitrógeno (6).

- Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno tiene lugar gracias a la actividad de los organismos vivos en los procesos de (1, 6):

- Fijación Las moléculas de nitrógeno diatómico atmosférico son reducidas a amonio por los microorganismos fijadores de nitrógeno
- Asimilación El amonio es utilizado para sintetizar proteínas por una gran cantidad de organismos aerobios y anaerobios, la asimilación puede utilizar también nitratos para sintetizar proteínas
- Desaminación Durante la descomposición de la materia orgánica los grupos amonio se transforman a amonio
- Nitrificación El amonio se oxida en condiciones aerobias hasta nitrato mediante dos procesos que llevan a cabo dos grupos de bacterias presentes generalmente en el mismo ecosistema en proporciones balanceadas, el primer paso de la oxidación del amonio es la formación de nitrito por las bacterias formadoras de nitrito, esta transformación es realizada en mayor proporción por el género *Nitrosomonas*; el nitrito se oxida aún más por las bacterias formadoras de nitrato, el género que predominantemente lleva a cabo esta transformación es *Nitrobacter* (1)
- Desnitrificación En condiciones anaerobias el nitrato es utilizado como aceptor de electrones por los microorganismos anaerobios, al aceptar electrones el nitrato puede transformarse en N_2O o en N_2 , estos gases pasan a formar parte de la atmósfera provocando la pérdida del elemento en los ecosistemas terrestres, ya que en su forma de gas diatómico solo es utilizable por los fijadores de nitrógeno que dan entrada al elemento al ciclo de transformaciones biológicas

La cantidad de nitrógeno reducido (distinto a N_2) se calcula en alrededor de $1 \cdot 10^{12}$ toneladas, esta contenida en los suelos y el agua en forma de nitrógeno orgánico e inorgánico, en el aire como óxidos y otros compuestos volátiles y en la biomasa de los animales y las plantas, tiene un tiempo de residencia menor a 40 años, por otra parte el nitrógeno diatómico de la atmósfera suma una cantidad cercana a $38 \cdot 10^{14}$ toneladas con un tiempo de residencia de 44 millones de años (6). De esos valores es claro que la vida no podría soportarse sin la entrada de nitrógeno desde la atmósfera que realizan los fijadores de nitrógeno.

2- LOS SERES QUE FIJAN NITRÓGENO.

La reducción de nitrógeno desde la molécula N_2 hasta amonio o amoníaco es una reacción favorecida termodinámicamente, pero los altos requerimientos de energía de activación hacen de este un proceso difícil, la ciencia encontró una solución al problema cuando se requirió de amoníaco distinto al de las fuentes naturales, tal solución se conoce como proceso Haber-Bosch y consiste en reaccionar en presencia de un catalizador basado en compuestos de hierro a los gases nitrógeno e hidrógeno a una temperatura de entre 300 y 500 °C y una presión de 300 atmósferas (7). La industria de este modo contribuye con el 25% del nitrógeno fijado anualmente, los procesos físicos naturales añaden un 1% %, mientras el restante 10% lo fijan microorganismos que, gracias a su capacidad de reducir hasta amonio la molécula de dinitrógeno son conocidos como fijadores de nitrógeno o bien como diazotrofos (7). Los efectos producidos por estos organismos en los campos de cultivo eran ya conocidos antes del inicio de nuestra era, pues para mejorar las cosechas se rotaban los cultivos que están asociados a la fijación de nitrógeno (46), pero no fue sino hasta el fin del siglo pasado y el principio del actual que el proceso se comenzó a estudiar con los métodos de la microbiología y la química, en estos años investigadores como Winogradsky, Beijerinck, Wilfarth y Hellriegel describieron la fijación de nitrógeno realizada por los generos *Rhizobium*, *Clostridium* y *Azospirillum* (1, 46)

La capacidad de reducir nitrógeno esta restringida a los procariontes, estos diazotrofos son un grupo variado de organismo que forman parte de diversos ecosistemas y por lo tanto realizan la reducción de nitrógeno en una diversidad de circunstancias (36)

-Organismos que fijan nitrógeno en vida libre.

- Organotrofos

Los generos *Azotobacter*, *Dexia* y *Xanthobacter* son aerobios que habitan en los suelos o en lugares húmedos cercanos al suelo como las hojas y las base de troncos, en el caso de las bacterias de género *Azotobacter* existe organotropía hacia las raíces de las plantas, lugar en el que están presentes en mayor concentración.

Los generos *Bacillus*, *Klebsiella*, *Thiobacillus* y *Azospirillum* son aerobios facultativos, y al igual que *Azotobacter* el genero *Azospirillum* tiene organotropía por las raíces de las plantas. *Clostridium* y *desulfivibrio* son anaerobios que se desarrollan principalmente en ambientes con alto contenido de materia orgánica en descomposición. Los organotrofos fijan solo unos pocos kilogramos de nitrógeno por hectarea (6, 46)

- Fototrofos

Los organismos fototrofos fijadores de nitrógeno estan representados por las cianobacterias, las bacterias no sulfuradas, las bacterias purpuras y las bacterias verdes sulfuradas, estos microorganismos habitan ecosistemas que van desde los acuáticos de agua dulce o salada, hasta los suelos que sufren ciclos de humedad-deseccación que algunos generos soportan con eficacia. Los fototrofos pueden fijar nitrógeno en cantidades cercanas a los 30 Kg por hectarea (6, 46)

- Organismos que se asocian para fijar nitrógeno

Las bacterias que se asocian para fijar nitrógeno son de los generos *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradirhizobium* y el propuesto *Sinorhizobium* de la familia de la *Rhizobiaceae*, esta familia bacteriana agrupa además a los generos *Agrobacterium* y *Phyllobacterium* que son patógenos de vegetales. La relación establecida es de tipo simbiótico y la mantienen con plantas de la familia *Leguminosae*, aunque el genero *Parasponia*, que no es de la familia *Leguminosae*, es capaz

de nodular. La relación simbiótica es capaz de fijar hasta 140 Kg. de nitrógeno en una hectárea cada año con la ventaja de ir directamente a la planta (1, 5, 6, 36, 46)

3- LA SIMBIOSIS QUE FLIJA NITRÓGENO

Cuantitativamente fijar nitrógeno mediante una simbiosis planta-bacteria representa una mayor eficiencia, pero ¿Qué hay además de ello?, ¿Por qué se estudia?, ¿Cuál es su importancia?

- Ecológicamente es importante porque debido a su capacidad simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno la familia *Leguminosae* que agrupa a más de 17 000 especies de plantas tan pequeñas como hierbas anuales o grandes como árboles, puede colonizar regiones con suelos pobres en nitrógeno (41)

-Es de importancia económica por la cantidad de campos de cultivo utilizados para producir alfalfa, garbanzos, chícharos, trébol forrajero etc (6, 39, 41, 46)

- Para países como el nuestro representa una forma natural de fertilización de cultivos endémicos tan importantes como el frijol que es única fuente de proteínas de calidad para amplios sectores de población.

-Resulta interesante a la curiosidad humana el hecho de que la relación entre una bacteria y una planta provoque la formación de un órgano especializado (conocido como nódulo) dentro de la raíz para alojar a las bacterias y fijar nitrógeno (1, 5, 30)

-¿Qué es lo que impide a la bacteria cruzar la línea entre la simbiosis y la invasión parasitaria? o, dicho de otro modo ¿por qué los rizobios son diferentes a sus primos los *Agrobacterium* que son parásitos de las plantas?

- ¿Cómo es que se controla el flujo de sustancias entre los dos miembros de la simbiosis?, ¿Qué sustancias participan?

- La utilización de fertilizantes sintéticos provoca la salinización de los campos de cultivo y de otros ecosistemas afectados por el agua que drena de éstos. La fijación de nitrógeno se ha pensado como una alternativa al uso de suplementos nitrogenados en la agricultura

- Primera aproximación.

Una vez destacados algunos de los puntos que resaltan la importancia de la fijación simbiótica del nitrógeno y de plantear algunas de las preguntas que guían el trabajo de los grupos de investigación alrededor del mundo, se hace necesario describir el proceso biológico

El proceso de la fijación simbiótica de nitrógeno puede ser descrito de una forma excesivamente simplista que sin embargo puede guiar una descripción

Comienza con la quimiotaxis de las bacterias hacia las raíces de la leguminosa atraídas en especial por compuestos flavonoides, a estos compuestos los podemos denominar la señal de la planta porque provoca respuestas celulares de las bacterias

Las bacterias liberan hacia la raíz compuestos conocidos como Nod que químicamente son tetraméros o pentaméros de glucosamina sustituidos, tales compuestos actúan como señales de la bacteria y provocan la deformación de la raíz de la planta.

Las bacterias comienzan a invadir la células de la raíz del vegetal

Las raíces del vegetal se deforman formando estructuras conocidas como nódulos, dentro de los cuales las bacterias son englobadas por una membrana de la planta

Los bacterioides fijan nitrógeno gracias a la activación de los genes que codifican para la nitrogenasa y para los cambios metabólicos necesarios para tal actividad.

Se establece el intercambio de compuestos, el bacteroide fija nitrógeno y la planta provee de compuestos de carbono al bacteroide

4 - LOS MIEMBROS DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA.

De los nódulos de las leguminosas se aíslan bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, estas bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son bacilos gram negativos pleiomórficos en condiciones adversas, móviles, con flagelo polar o subpolar, aerobias estrictas. Los *Rhizobium* se caracterizan por tener grandes plásmidos en los que está parte de la información necesaria para establecer interacciones con las plantas (30). Se ha observado que para cada especie de planta hay una especie de bacteria simbiótica o solo unas pocas especies (5, 6, 39, 41, 46, 54, 59, 63), con esta situación encontramos plantas y bacterias con solo un tipo de asociación conocida, mientras para otras especies se conocen varias interacciones (Tabla 1)

Interacciones entre *Rhizobium* y leguminosas

Bacteria (especie)	Planta (género)	Planta (nombre común)
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago</i> <i>Melilotus</i> <i>Trigonella</i>	alfalfa
<i>R. fredii</i>	<i>Glycine</i>	soya
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Leucaena</i>	frijol
<i>R. etli</i> *	<i>Phaseolus</i>	frijol
<i>R. loti</i>	<i>Lotus spp</i>	loto
<i>R. meliloti</i> <i>bv. viciae</i> <i>bv. trifolii</i> <i>bv. phaseoli</i>	<i>Vicia</i> y <i>Pisum</i> <i>Trifolium</i> <i>Phaseolus</i>	habas y chicharos trebol frijol
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine</i>	soya
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> ** <i>Phaseolus vulgaris</i>	frijol
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Alcacia</i> y <i>Sesbania</i>	

* *R. etli* fue definido como especie en 1994, antes era *R. phaseoli* (60)

** Planta que forma nódulos en los tallos (5)

Tabla 1. Interacciones simbióticas del género *Rhizobium*.

-¿Qué determina esta especificidad?.

-Antes del nódulo.

En la tierra encontramos una gran cantidad de microorganismos entre los que están los rizobios, la concentración de los microorganismos está relacionada con la concentración de sustancias nutritivas (5, 46), la mayor cantidad de microorganismos se encuentra en la rizósfera

(46), donde se pueden encontrar vitaminas, aminoácidos y otras sustancias nutritivas que son exudadas por las raíces de las plantas (5, 46)

Las leguminosas además de los compuestos nutritivos exudan al medio sustancias derivadas de las flavonas conocidas como flavononas, flavonoides e isoflavonoides (14, 18, 26, 39, 53, 55, 59), éstas sustancias se han encontrado en por lo menos 20 familias de plantas, pero la mayor parte de ellos en las leguminosas (12, 13, 18), el papel que desempeñan en la vida de la planta no está totalmente establecido pero hay propuestas que apuntan en el sentido de que sirven como protección ante posibles parásitos (18), pues son sintetizadas a mas alta velocidad y excretadas cuando se presentan bacterias u hongos en la superficie de las raíces (12), las bacterias del género *Rhizobium* son capaces de degradar a los compuestos flavonoides (51), cuando son simbioses, las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* inducen la secreción de fitoalexinas que son antimicrobianas y algunos de ellos isoflavonoides (13), los flavonoides y los isoflavonoides sirven a la planta de precursores para cumestrenos y pterocarpenos con potencial inhibitorio del crecimiento de hongos y bacterias (51). Los dos tipos de flavonas son derivados del metabolismo de fenil propano y malonil-CoA, cada especie de planta tiene un perfil de producción de flavonoides e isoflavonoides que actúan en la simbiosis como la señal de nodulación (5) Algunos de los flavonoides son la Daizeína (4',7-dihidroxisoflavona) que activa a *Bradyrhizobium japonicum* (33, 64), y la naringenina (4',5,7-trihidroxisoflavona) que induce actividad en *Rhizobium etli* (59) (Fig 1)

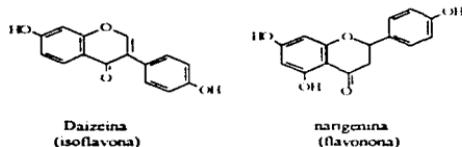


Figura 1. Estructura de una flavonona y de un isoflavonide

5 - LOS GENES DE LA NODULACIÓN

Los rizobios, al igual que las bacterias saprófitas, tienen quimiotaxis por vitaminas, azúcares, aminoácidos, ureidos excretados por las raíces de las plantas (5), además tienen quimiotaxis por compuestos flavonoides (51).

Los flavonoides se concentran en la membrana de las células mediante un mecanismo independiente de energía y dependiente del pH, en el caso de la naringenina la concentración en la membrana es dependiente de su hidrofobicidad cuando no está ionizada (53) Si el flavonoides que se concentra en la membrana es específico para la especie, a una concentración mínima de 2.5 nM, se establece una interacción del flavonoides con una proteína membranal de la bacteria, la proteína NodD es la responsable de la interacción, es una proteína expresada constitutivamente (5, 15, 26, 63, 64) que cuando se une al flavonoides provoca despolarización de la membrana (53), luego de la interacción la proteína nodD funciona como activador de la transcripción de los genes nod inducibles

al unirse a una región conservada de 50 pares de bases en el DNA de la bacteria conocido como la caja nod (5). Cada especie de *Rhizobium* tiene un número de alelos del gene nodD, en el caso de *Rhizobium meliloti* encontramos tres variantes lo que le da oportunidad de interactuar con varias plantas y establecer una regulación por amonio (16, 23, 24), otras especies solo tienen un tipo de variante de nodD, restringiendo las posibilidades de respuesta a las señales del hospedador (5)

Los genes nod se denominan así por ser necesarios para llevar a cabo la nodulación de las raíces de las plantas susceptibles. Las proteínas codificadas por los genes nod distintos a nodD sintetizan y excretan un polímero de glucosamina con diversas sustituciones dependiendo de la especie. A estos compuestos se les denominó compuestos Nod (63), y al ser producto de la actividad de varios genes nod su naturaleza depende de la dotación genética de cada cepa de *Rhizobium* (26, 48). Los genes nodA, nodB y nodC son responsables de la síntesis de la estructura básica y están presentes en todas las cepas que nodulan (5, 14, 15, 23, 26, 59), son intercambiables entre las distintas especies y todas las que carecen de ellos tienen fenotipo nod (no son capaces de provocar división celular en las raíces de las leguminosas) (5). Las sustituciones o "adornos" en la estructura tetrasacárida básica son grupos químicos como sulfato, lípidos o grupos acetilo colocados por los productos de los genes nod huésped-específico, se han descrito algunos de los genes así como la sustitución que realizan, si alguno de los genes de este grupo se cambia de especie, la nueva cepa cambia la especificidad de huésped pudiendo nodular en el huésped de la cepa donadora del gen en particular pero puede llegar a perder la capacidad de nodular en el huésped natural de la cepa (14, 15) (Tabla 2)

FUNCIÓN BIOLÓGICA DE ALGUNOS DE LOS GENES nod HUÉSPED - ESPECÍFICOS

GENE	FUNCIÓN
nodH	sulfotransferasa
nodS	N-metilasa
nodL	acetiltransferasa
nodE	cetoacilsintetasa
nodPQ	ATP sulfonilasa
nodPQ	cinasa
nodF	acarreador de ácidos

Tabla 2. Función biológica de algunos genes nod en el género *Rhizobium*.

Algunas especies de *Rhizobium* producen varios tipos diferentes de sustancias nod (lipoquitin-oligosacáridos sustituidos), esto permite a la bacteria tener diferentes huéspedes vegetales, se cree que la diversidad de factores nod es producto de la especificidad y eficiencia de la ruta de biosíntesis de cada sustancia, porque se encontró que la N-metilación realizada por NodS de *A. caulinodans* y la O-acetilación hecha por NodL de *R. leguminosarum* utilizan preferentemente los quito-oligosacáridos diacetilados en la porción no reductora, mientras que la sulfotransferencia de

NodH en *R. meliloti* acepta al quito-oligosacárido sin modificaciones como sustrato, las tres reacciones anteriormente mencionadas son altamente eficientes y pueden competir entre ellas, pero otras como la transferencia de las cadenas de ácidos grasos, son transformaciones poco eficientes llevando a mayor variación de los productos. Por el lado de algunas plantas las variaciones en las sustituciones de los compuestos nod pueden no influir en la nodulación, en el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris*) las seis especies de bacterias que lo infectan tienen compuestos nod que solo comparten entre sí al pentasacárido de glucosamina N-acilado por una cadena de 18 carbonos (59). (Fig 2).

El inicio de la nodulación es un proceso dependiente de dos factores que la bacteria posea una proteína nodD adecuada para interactuar con el flavonoide que la planta excreta, y que la bacteria sea capaz de producir un compuesto nod que provoque cambios en el vegetal, *Rhizobium loti* y *R. etli* tienen el mismo factor nod pero distinto huesped lo que ilustra el hecho (59)

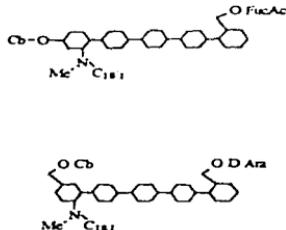


Figura 2. Factores nod de *R. etli* (13, 59) y de *A. caulinodans* (59) (Me = metilo, Cb = carbamoyl, Fuc = fucosa, Ac = acetil, Ara = arabinosa)

Una vez sintetizados, los productos Nod son excretados por la bacteria hacia la raíz de la planta, estos compuestos en concentraciones nano o picomolares inducen hipertrofia cortical en las células vegetales de raíz (5, 14, 54), observándose la actividad mitótica entre las 12 y las 24 horas después de la aplicación (5, 63). La actividad biológica que inducen es similar a las hormonas de crecimiento de los vegetales (5). Las divisiones celulares iniciales están en un plano perpendicular al eje de crecimiento de la raíz pero dan como resultado un meristemo organizado con células dividiéndose en todos los planos (5).

Hay dos tipos de estructuras nodulares dependiendo del sitio de formación del meristemo en la etapa de la inducción por las sustancias Nod (5).

Los nódulos determinados inician el crecimiento del nódulo en la membrana exterior de la raíz y comienzan a ser colonizados por las bacterias que están en el sitio pudiendo pasar aun por los espacios intersticiales de las células vegetales, estos nódulos tienen un segundo primordio de

crecimiento en la parte interna de la raíz, la presencia de dos puntos de crecimiento y la colonización temprana de las células del primordio más cercano a la superficie de la raíz provoca que se produzca un englobamiento de las células del primer primordio y de las del centro produciendo una estructura nodular globular (5).

Los nódulos indeterminados se desarrollan a partir de la formación de un meristema nodular en la parte interna de la raíz, las células crecen perpendicularmente a la raíz, estas células no son colonizadas inicialmente, sino que requieren de la formación de canales infectivos a través de los cuales las bacterias atraviesan las células viajando por el canal, las bacterias llegan a colonizar las células del primordio del nódulo cuando este ya está desarrollado, quedando de forma cilíndrica perpendicularmente al eje de crecimiento de la raíz (5).

6 - INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS VEGETALES, FORMACIÓN DEL NÓDULO.

Las bacterias y las células de la planta están en estrecha relación durante el proceso de la infección del nódulo (5), en este periodo las bacterias sintetizan polisacáridos externos, estos polisacáridos son heteropolisacáridos, B-glucanos neutros y lipopolisacáridos (5, 38). La presencia de estos productos es sumamente importante, ya que las mutantes que carecen de ellos producen nódulos no infectados (56), entre los papeles que juegan estos polisacáridos se propone que protegen a la bacteria de sustancias osmóticas producidas en la infección o bien que pueden interactuar con lectinas y adhesinas de la planta (56).

-Formación del bacteroide.

Luego de atravesar cierto número de células vegetales, las bacterias son endocitadas por las células que forman parte del nódulo y son rodeadas de una membrana de características antigénicas similares a las paredes y membranas vegetales (5), dentro de esa membrana que se denomina membrana peribacteroidal las bacterias dejan de dividirse y comienza una serie de cambios de ambas partes de la simbiosis para que el bacteroide sea apto para fijar nitrógeno (5).

-Cambios en el vegetal

La planta sintetiza un grupo de sustancias conocidas como nodulinas que son necesarias para la formación, desarrollo y mantenimiento del nódulo, entre las más importantes de ellas se menciona a la leghemoglobina, es una hemoproteína capaz de captar oxígeno con una alta afinidad y velocidad de captación, pero con una velocidad reducida de liberación lo que provoca que la concentración de oxígeno que rodea al bacteroide esté en el intervalo 3 - 30 nM, que representa una concentración 10^4 ó 10^5 veces menor a la concentración presente en condiciones aeróbicas estrictas (34), el mantenimiento de condiciones microaerobias es indispensable para el buen funcionamiento de las enzimas fijadoras de nitrógeno, pues en concentraciones más altas de oxígeno su actividad es inhibida; es importante resaltar que el grupo hemo de esta proteína es producido por la bacteria. La glutamina sintetasa es otra de las enzimas claves en la relación simbiótica, puesto que se encarga de asimilar el nitrógeno fijado por la bacteria (5), en algunas plantas con metabolismo de nitrógeno basado en ureidos se sintetiza una proteína que utiliza el amonio fijado por los bacteroides para sintetizar ureidos (5).

La bacteria que está dentro de la membrana peribacteroidal debe adaptarse a las nuevas circunstancias y para ello desarrolla algunos cambios importantes, los primeros tienen que ver con su respiración, ya que al tratarse de bacterias aeróbicas estrictas sometidas a condiciones microaerobias, necesitan adecuar su cadena respiratoria, para ello sustituyen al citocromo *a*₁ por el citocromo *d* con mayor afinidad por el oxígeno (34), el nuevo citocromo puede mantener la respiración a las

concentraciones de oxígeno del bacteroide; el cambio de citocromos es común en los fijadores de nitrógeno y en *Azotobacter vinelandii* se ha encontrado la respiración más rápida entre las bacterias y es debida a la presencia del cit d como acarreador de electrones al oxígeno (34, 36), el cit d de esa bacteria reduce virtualmente todo el oxígeno que atraviesa la membrana de la bacteria (34)

7 - ESPECIALIZACIÓN DEL BACTEROIDE A FIJADOR DE NITRÓGENO.

Una vez que la bacteria se establece dentro del nódulo tiene como papel simbiótico fijar nitrógeno, la reacción de fijación de nitrógeno es altamente demandante de energía según la reacción balanceada (7, 36, 45):



La ecuación está balanceada con respecto a los electrones necesarios para reducir una molécula de nitrógeno, pero la eficiencia de la reacción no es del 100 %, y los valores reales de gasto de energía son cercanos a 30 moléculas de ATP por cada una de las moléculas de nitrógeno atmosférico que se reducen (7, 36). Por este gasto de energía y debido a que la nitrogenasa se inactiva por la presencia de las concentraciones aeróbicas de oxígeno la bacteria simbiótica controla transcripcionalmente la presencia de la nitrogenasa (5, 26, 33, 43, 57)

El control de la presencia de la nitrogenasa es dependiente de la tensión o presión parcial de oxígeno, esto es, se necesita que la bacteria esté rodeada por un ambiente microaeróbico y en el caso de la simbiosis esto se da solo cuando existe la membrana peribacteroidal y la leghemoglobina rodea al bacteroide (5). Las proteínas encargadas de dicho control son FixL y FixJ (26)

- Sistema de regulación FixL-FixJ

Estas proteínas son miembros de la familia de sistemas de regulación de dos componentes que permiten a las bacterias responder a las condiciones ambientales (5, 26), en el caso de FixL y FixJ el estímulo ambiental es la concentración de oxígeno (26), mientras que la respuesta es la transcripción (26) (cuando la concentración de oxígeno es baja) de los genes que codifican para la nitrogenasa y otros relacionados (5, 26)

- FixL

Es una hemoproteína de membrana con tres dominios funcionales: una región hidrofóbica en el amino terminal, una región central con el grupo hemo que une al oxígeno y el carboxilo terminal con actividades de autofosforilación y de cinasa de fixJ, la proteína fosforilada tiene actividad de fosfatasa (26).

- FixJ

La proteína FixJ tiene homología con proteínas que activan la transcripción de los genes en las bacterias mediante unión a la región -35 del promotor y presenta un dominio "helix-turn-helix" asociado a las proteínas que reconocen secuencias de DNA (26)

El control que se establece por la tensión de oxígeno sucede en dos niveles: a baja tensión se promueve la autofosforilación de FixL y se reprime la actividad de fosfatasa de la proteína FixL fosforilada, con lo que los niveles de FixJ fosforilada aumentan (26). Con concentraciones altas de oxígeno se previene la presencia de FixJ fosforilada inhibiendo la autofosforilación de FixL y estimulando la actividad de fosfatasa de la proteína FixL fosforilada. La proteína FixJ fosforilada se

una a los promotores de las secuencias de DNA de algunos genes entre los que se encuentra *nifA*, la proteína codificada por este gene junto con las proteínas del sistema *nif* (control de nitrógeno) son reguladores positivos de la transcripción de los genes *nif* y *fix* que codifican para la nitrogenasa y otras proteínas relacionadas, como las de una nueva cadena respiratoria (34)

Los genes necesarios para la fijación de nitrógeno se denominan *fix* y *nif*, los *nif* son homólogos de los genes de *Klebsiella pneumoniae* y corresponden a los genes estructurales de la nitrogenasa y el regulador positivo de ellos *nifA* (26), los genes *fix* son necesarios para la fijación pero no son homólogos de los de *K. pneumoniae* (26)

El complejo enzimático responsable de la fijación de nitrógeno se conoce como nitrogenasa (7, 36, 45, 55), la nitrogenasa esta constituida por dos enzimas, una de ellas contiene fierro y molibdeno, o bien Vanadio y Fierro en condiciones de falta de molibdeno, a esta enzima se denota como componente I, es codificado por los genes *nifD* y *nifK* y estructuralmente es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ (7, 26, 36, 55), mientras la otra contiene fierro y se conoce como componente II, es codificada por el gene *nifH* siendo estructuralmente un homodímero (7, 26, 36, 55)

La reducción del sustrato por la nitrogenasa involucra tres reacciones de transferencia de electrones (7)

- 1- El átomo de fierro de la proteína II (proteína-Fe) es reducido por flavodoxina o ferredoxinas
- 2- La proteína II transfiere electrones a la proteína I, en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP, con una estequiometría de dos moléculas de ATP hidrolizadas por cada electrón transfirido
- 3- Los electrones son transfiridos a la molécula de nitrógeno que esta en el sitio activo Mo-Fe de la proteína I, hasta que se reduce a dos moléculas de amoníaco

■ - INTERCAMBIO SIMBIÓTICO.

La fijación de nitrógeno en simbiosis establece un intercambio de productos entre los dos miembros de la relación, la planta da al bacteroide carbono que obtiene de la fotosíntesis a cambio del nitrógeno que el bacteroide es capaz de reducir de la atmósfera. En este contexto el intercambio metabólico puede ser desglosado en dos grandes rubros

- Nitrógeno.

El bacteroide no asimila el nitrógeno pues se encontro que la actividad de las enzimas responsables de asimilar amonio en estas bacterias GS I (glutamina sintetasa) y la GOGAT (glutamato sintasa) están reducidas, la planta lo asimila fuera del bacteroide en donde hay una forma de glutamina sintetasa sintetizada por la planta especifica de los nodulos (5)

- Carbono.

Se encontró que los azúcares no pueden atravesar la membrana peribacteroidal y no son oxidados por los bacteroides aislados, los ácidos dicarboxílicos succinato, malato y fumarato son utilizados por los bacteroides y en la membrana peribacteroidal hay transportadores para ellos (5, 32, 65), las mutantes en los transportadores de ácidos dicarboxílicos del pueden modular pero son incapaces de fijar nitrógeno, se ha propuesto que en el intercambio pueden participar además de estos ácidos, sustancias que provean carbono y nitrógeno al bacteroide (4, 29, 37, 58)

9 - CONTROL DEL PROCESO.

A lo largo de todo el proceso se han encontrado controles, los controles provocan situaciones tales como la pérdida de los nódulos en plantas infectadas o a una falta de infección aún en la presencia de las bacterias idóneas en las concentraciones idóneas cuando hay nitrógeno disponible en la tierra (50), o, a tener plantas con el mismo peso seco y distinto aspecto y actividad de sus nódulos luego de inocularlas en las mismas condiciones e incubarlas en concentraciones distintas de nitrógeno en la atmósfera (50). Las situaciones presentadas se continúan estudiando.

Investigando el por qué de la falta de nodulación en las plantas leguminosas que crecen en terrenos con cantidad suficiente de nitrógeno se encontró que algunas de las bacterias del género *Rhizobium* no activan los genes de la nodulación (*nod*) porque la expresión de estos genes se regula por la disponibilidad de nitrógeno para la bacteria, las especies en la que se ha descrito tal control son *R. etli*, *R. meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum* que en presencia de amorfo en su ambiente no inducen la nodulación de las plantas (24, 42, 47, 64), mientras que *Rhizobium leguminosarum* no presenta control a este nivel (2).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los objetivos del estudio de la fijación de nitrógeno es incidir en el proceso modificándolo con fines de mejoramiento, en este sentido se encontró que la fuente de carbono otorgada por la planta al bacteroide es limitante de la fijación de nitrógeno (32), razón que ha llevado al estudio de los compuestos con posible participación en el intercambio simbiótico, pues existe la propuesta de que la simbiosis es controlada metabólicamente

Kanh y su grupo de colaboradores (29) propusieron que en el intercambio metabólico entre la planta y el bacteroide podría tener participación un compuesto nitrogenado, de ser así la interacción sería más estable e impediría que el bacteroide se tome en parásito, pues la planta tendría la capacidad de decidir a que bacteroides alimentar y en que momento, porque para sintetizar el compuesto necesaria del nitrógeno que el bacteroide reduce de la atmósfera. Propuso además que los aminoácidos podrían ser los compuestos intercambiados, en especial el glutamato por su papel en el metabolismo de nitrógeno. Apoyando esta propuesta se ha encontrado que

- * El glutamato y el aspartato estimulan la fijación de nitrógeno en bacteroides aislados de la planta (3)
- * Los bacteroides aislados de la soya utilizan preferentemente glutamato, glutamina, aspartato y asparagina para respirar (37, 58)
- * Una mutante de *R. meliloti* en la aspartato aminotransferasa nodula pero no fija nitrógeno (52)
- * El glutamato y el aspartato utilizan los transportadores de ácidos dicarboxílicos y pueden atravesar la membrana peribacteroidal por difusión simple a la concentración en la que se encuentran en las células de las raíces de las plantas(37)

En el grupo de trabajo se busca definir el papel de la glutamina en el metabolismo de vida libre y la relación simbiótica de *Rhizobium etli*, bacteria que establece simbiosis con las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). La glutamina es el producto final de la asimilación de amonio, junto con el ácido glutámico participa como donador de nitrógeno en la síntesis de gran variedad de compuestos nitrogenados, es parte del control del metabolismo del nitrógeno al regularse su relación con respecto al 2-oxo-glutarato (31) y en organismos como *Neurospora crassa* (8, 9) y *Rhizobium etli* (21) se ha demostrado la existencia de un ciclo donde se degrada y sintetiza glutamina a expensas de ATP, el ciclo de la glutamina ha sido propuesto como una manera rápida de controlar la velocidad de síntesis y degradación de la glutamina y con ello de la utilización del nitrógeno en la célula (62), una manera de liberar esqueletos de carbono del metabolismo de nitrógeno para mantener un balance adecuado de los compuestos nitrogenados en la célula o como una estrategia para responder a los cambios nutricionales, además la glutamina ha sido propuesta como corepresor en el metabolismo de carbono pues afectando su utilización y síntesis se afecta la utilización de glucosa y ATP en *S. cerevisiae* (27). En el caso particular de *Rhizobium etli* se ha encontrado que la glutamina participa en la relación simbiótica pues

- * La actividad de la glutaminasa en los bacteroides de *R. etli* se encuentra elevada (20) y

* Una mutante que carece de la actividad de la glutaminasa A acumula mayor cantidad de glutamina en los nódulos (20).

Para estudiar la participación de la glutamina en el metabolismo de *R. etli* en vida libre y en la simbiosis con *Phaseolus vulgaris* se busca afectar la capacidad de utilizar a la glutamina como fuente única de carbono y nitrógeno. La mutante LM01 de *R. etli* se seleccionó por su incapacidad de utilizar a la glutamina como fuente única de carbono y nitrógeno, adicionalmente no puede utilizar al glutamato como fuente única de carbono y nitrógeno, ni al glutamato como fuente de nitrógeno y su capacidad de asimilar amonio está disminuida, en cuanto al fenotipo simbiótico se encontró que la mutante nodula solo en un 30% con respecto a la cepa silvestre y es incapaz de fijar nitrógeno (19). La mutación se complementó con el banco genético de *R. etli* encontrándose un plásmido de 18Kb que complementa todo el fenotipo (19). El hecho de tener en una mutante un fenotipo que involucre la utilización de dos aminoácidos en la simbiosis y la fijación de nitrógeno, y un fragmento de DNA clonado que complementa todo el fenotipo, hacen de ella un interesante objeto de estudio que comenzó a caracterizarse.

La mutante LM01 fue producida mediante mutación con el transposon Tn5mob (61), sin embargo el fragmento de 18 Kb del genoma de *R. etli* presente en el plásmido pMGD4 que complementa todo el fenotipo de la mutante, no hibrida con el fragmento que tiene insertado al transposon (19), tal situación puede ser interpretada de varias maneras, de entre ellas:

* La mutación podría ser debida a una mutación puntual que provoque todo el fenotipo en tanto el transposon podría estar inserto en un sitio donde no causa cambio fenotípico,

* La mutación podría ser provocada por el transposon pero ser de carácter polar,

* La mutante LM01 podría ser una mutante múltiple en la que una parte del fenotipo sea producto de la inserción del transposon, mientras que otra parte del fenotipo sea provocada por una mutación puntual o,

* El fragmento que complementa a la mutante podría ser un supresor de la mutación y por ello no hibrida con el fragmento del genoma de la mutante que tiene inserto al transposon.

Una de las estrategias para definir la mutación es mutagenizar al gen o genes que complementan (clonados en el plásmido pMGD4 y su subclona pMGD4 3), al mutagenizar a estos genes se espera obtener un plásmido que ya no complemente el fenotipo de la mutante LM01 de *R. etli*. El plásmido mutagenizado podría ser utilizado eventualmente para obtener otra mutante que se espera tenga el mismo fenotipo de la mutante LM01 si la mutación está situada en una región del genoma homóloga a la que tiene el plásmido pMGD4 o si la mutación es polar y afecta la región homóloga por una delección o cambio de fase de lectura. Si la mutante LM01 de *R. etli* es una mutante múltiple el plásmido mutagenizado será de gran utilidad para obtener un fenotipo que solo esté afectado por una mutación.

Otra de las estrategias para estudiar a la mutante LM01 de *R. etli*, es estudiar al gen o genes que están involucrados en el fenotipo, puesto que independientemente del carácter de la mutación, se tienen clonados en un fragmento que complementa un fenotipo con funciones alteradas tan importantes como la utilización de aminoácidos, la modulación y la fijación de nitrógeno, para ello se debe subclonar el fragmento clonado para obtener un fragmento pequeño de DNA que complemente la mutación, de esta forma eventualmente se puede secuenciar la parte útil de la información genética clonada y con ayuda de los bancos de secuencias genéticas se pueden conocer las funciones involucradas.

Los mutantes son demasiado largos,
deputaron mejor incruos de la mañana y los tardes.
Miao Tzu-Yung

OBJETIVOS

- Subclonar el plásmido pMGD4.3 para determinar si es posible obtener un fragmento más pequeño de DNA que complemente el fenotipo de la mutante LM01 de *Rhizobium etli*.
- Mutagenizar el locus que complementa a la mutante LM01 de *Rhizobium etli* que está en los plásmidos pMGD4 y pMGD4.3

¿Me gustaría mostrarlo
o le recomiendo a alguien
por popular

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS Y PLASMIDOS

CEPAS	Características importantes	referencia
<i>Escherichia coli</i> HB101	RecA, pro, leu	3
<i>E. coli</i> MT614	malE, Tn5	17
<i>E. coli</i> C2110	nal ^R	17
<i>Rhizobium etli</i> CE3	Tipo silvestre sm ^R	
<i>R. etli</i> LM01	CE3::Tn5	19
PLASMIDOS		
pRK2073	tra, mob, sp' (helper)	27
pLAFRI	Tc'	27
pMGD4	banco de <i>R. etli</i> en pLAFRI, Tc' complementa a la mutante LM01 de <i>R. etli</i>	19
pMGD4.3	subclona EcoRI de pMGD4	19
pMGD4.3-2K	subclona EcoRI de pMGD4.3, Tc'	este trabajo
pMGD4.3-3K	subclona EcoRI de pMGD4.3, Tc'	este trabajo
pMGD4.3- Ω	Tc', Sp'	este trabajo
pMW157	contiene el fragmento Ω Sp', lac, amp'	51

MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB. (Luria Bertani)

Composición:

Peptona de caseína	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
Cloruro de sodio	1.0 %

Preparación de un litro de medio

Peptona de caseína	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
H ₂ O	c b p. 1.0 l

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para preparar medio semisólido se agrega 1.5 % de agar antes de esterilizar.

Si se requieren antibióticos estos se preparan en soluciones concentradas mil veces (1000X) y se agrega un mililitro de la solución por litro de medio de cultivo después de esterilizar; (ver preparación de antibióticos al final del capítulo) si se trata de medio líquido cuando está frío, y si se trata de medio semisólido cuando está tibio (42 °C) antes de verterlo en las cajas.

- Medio PY (peptona- levadura)

Composición

Peptona de caseína	0.5 %
Extracto de levadura	0.3 %
CaCl ₂	7 mM

Preparación de un litro de medio.

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
H ₂ O	c b p. 1.0 l

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para preparar medio semisólido se agregan 15 g/l de agar antes de esterilizar.

Por separado se prepara y esteriliza una solución de cloruro de calcio 100 X y se agregan diez mililitros de la solución por litro de medio de cultivo después de esterilizar cuando esté frío o tibio según se trate de medio líquido o sólido.

-Cloruro de calcio para medio PY 100X (0.7 M).

CaCl₂ 10.29 g.

agua desionizada c. b p. 100 ml

Se disuelve el cloruro de calcio y se esteriliza en autoclave

En caso de requerir antibióticos se utilizan las soluciones 1000X y se agregan como en el caso del medio LB. (ver preparación de antibióticos al final del capítulo).

- Medio mínimo

Composición.

MgSO ₄	0.4 mM
K ₂ HPO ₄	1.2 mM
CaCl ₂	1.5 mM
FeCl ₃	0.0005 %
Fuentes de nitrógeno	10 mM
Fuentes de carbono	10 mM

Para preparar un litro

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g.
K ₂ HPO ₄	0.22 g

Más las fuentes de carbono y nitrógeno esterilizables.

Se ajusta el pH con ácido fosfórico o hidróxido de sodio hasta pH 6.8

Con objeto de facilitar la preparación del medio se hacen soluciones concentradas de las sales.

K₂HPO₄ 100X

Se disuelven 21 g de la sal en 1 l de agua desionizada, luego se añade 1 ml de cloroformo para prevenir la contaminación y se guarda en refrigeración a 4 °C

Por separado se preparan una solución de cloruro de calcio 100 X, una de cloruro de hierro III 1000X y soluciones concentradas de las fuentes de carbono y nitrógeno no esterilizables en autoclave.

MgSO₄ 100X

Se disuelven 9.86 g de la sal heptahidratada en 1 l, se almacena a 4 °C

-Cloruro de calcio 100 X para MM

CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.2054 g
agua desionizada	c. b. p. 100 ml

Se esteriliza en la autoclave

-Cloruro de hierro para medio mínimo 100 X

FeCl ₃ ·6H ₂ O	50 mg.
agua desionizada	c. b. p. 10 ml

Se esteriliza por filtración y se guarda en alícuotas de 1 ml en congelación a -20 °C.

-Fuentes de carbono y nitrógeno

*Glutamina 25X

Glutamina	1.82 g
Agua desionizada	c. b. p. 50 ml

(Es la solución más concentrada de glutamina que puede prepararse en agua) Se entibia el agua y una vez disuelta la glutamina se esteriliza por filtración, se agregan 4 ml de esta solución para cada 100 ml de medio de cultivo ya esterilizado y frío

*Acido glutámico 100 X
 -sal sódica del ácido glutámico 16.91 g
 agua desionizada c b p 100 ml

Se disuelve el glutamato y se almacena, se agrega 1 ml de la solución por cada 100 ml de medio de cultivo antes de esterilizar.

*Cloruro de amonio 100 X
 NH₄Cl 5.34 g
 Agua desionizada c b p 100 ml
 Se agrega 1 ml por cada 100 ml de medio de cultivo

-Acido succínico 100 X
 ácido succínico 118 g
 agua desionizada c b p 1 l
 Se añaden 75.19 g de NaOH y luego se ajusta el pH a 6.8 con hidróxido de sodio diluido. El ácido succínico se agrega al medio antes de esterilizar.

CURVAS DE CRECIMIENTO (para *R. ethi*)

- 1.- Sembrar las cepas requeridas en cajas de Petri con medio PY semisólido más los antibióticos correspondientes a cada cepa.
- 2.- Incubar a 30°C durante 3 días
- 3.- Inocular con las células matraces Erlenmeyer con 100 ml de PY más los antibióticos correspondientes a cada cepa.
- 4.- Incubar a 30°C con agitación de 200 r p m durante 15 a 18 horas
- 5.- Centrifugar los cultivos en botellas para centrifugación estériles, durante 10 minutos, 10 000 r p.m. y 4°C (rotor GSA)
- 6.- Resuspender la pastilla celular en 100 ml de solución de sales para medio mínimo previamente enfriada a 4°C.
- 7.- Centrifugar a 10 000 r p.m., 4°C, 10 minutos
- 8.- Resuspender la pastilla en 3 ml de sales para medio mínimo a 4°C.
- 9.- Diluir la suspensión 1:10 y 1:100 partiendo de 100 µl de suspensión
- 10.- Leer la absorbancia de las diluciones a 540 nm contra blanco de solución de sales para medio mínimo.
- 11.- Calcular el volumen necesario para inocular cada uno de los matraces de acuerdo a la siguiente expresión: (utilizar en los cálculos la dilución cuyo valor de densidad óptica esté comprendido entre (0.2 y 0.8))

$$VR = (VF \cdot D O_1) / (D O_m \cdot dil.)$$

donde: VR es el volumen de la dilución necesario para inocular cada matriz
 VF es el volumen del medio de cultivo que se quiere inocular (100 ml)

D.O. representa la densidad óptica requerida al inicio (se utiliza 0.05)
 D.Om es la densidad óptica de la dilución
 dil representa el inverso de la dilución.

- 12.- Inocular los matraces que contienen el medio requerido con la cantidad calculada.
- 13.- Tomar 2 muestras de 1ml con pipeta estéril , una de ellas se deposita en un tubo de ensayo de 13*100 mm, mientras que la segunda se vierte en un tubo eppendorf de 1.5 ml (agitar bien el matraz antes de tomar la muestra)
- 14.- Incubar los matraces a 30°C y agitación de 200 r.p.m.
- 15.- Centrifugar la muestra de el tubo eppendorf durante 4 minutos a 14 000 r.p.m
- 16.- Aspirar el sobrenadante del tubo con ayuda de una jeringa con aguja.
- 17.- Agregar a 500 μ l de ácido tricloroacético al 5% a cada tubo eppendorf.
- 18.- Leer la densidad óptica a 540 nm. de la muestra que está en el tubo de ensayo.
- 19.- A las 4, 8, 12 y 24 horas de incubación se retiran los matraces de la incubadora y se repiten los pasos 13 a 18.
- 20.- Determinar el contenido de proteínas de cada condición mediante el método de "Lowry micro".
- 21.- Graficar la densidad óptica y la cantidad de proteínas contra el tiempo para cada cepa en cada medio de cultivo.

- SOLUCIONES PARA CURVA DE CRECIMIENTO.

-Solución salina al 0.85%

Pesar y disolver 0.85 g de NaCl grado reactivo en 100 ml de agua desionizada, esterilizar por autoclave.

- Acido tricloroacético al 5%

Pesar y disolver 5 g de ácido tricloroacético en 100 ml de agua desionizada, guardar en frasco ambar.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PARA CURVAS DE CRECIMIENTO MÉTODO DE LOWRY MICRO

- 1.- Centrifugar durante 4 minutos a 14 000 r.p.m. los tubos que tienen las muestras con ácido tricloroacético al 5%
- 2.- Aspirar el líquido hasta extraer la mayor cantidad posible.
- 3.- Resuspender en 200 μ l de una solución de NaOH 0.4 N
- 4.- Preparar una dilución 1:3 de Folin en agua
- 5.- Preparar solución ABC (98A + 1B + 1C).
6. Agregar a un tubo limpio de 13*100 mm:

Reactivos (μ l)	blanco	estándar	muestras
agua	200	100	160
muestra	---	---	40
estándar	---	100	---
solución ABC	1000	1000	1000

- 7.- Agitar en el vortex.
- 8.- Esperar 10 minutos.
- 9.- Agregar 100 μ l de folin 1.3.
- 10.- Agitar en el vortex, esperar 30 minutos
- 11.- Leer absorbancia en el espectrofotómetro a 625 nm.
- 12.- Calcular la cantidad de proteína en cada muestra.

-SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE CANTIDAD DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY.

-Solución A.

NaOH 0.1N
 Na₂CO₃*2 H₂O 2%

Para preparar un litro de la solución se pesan y disuelven 4 g de NaOH y 20 g de bicarbonato de sodio en 1l de agua desionizada, se guarda en frascos amber a temperatura ambiente.

-Solución B.

Tartrato de sodio y potasio 2%

Para preparar 100 ml se pesan y disuelven 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua desionizada, se almacena a 4 °C.

-Solución C.

CuSO₄*5H₂O 1%

Se pesa y disuelve un gramo de sulfato de cobre II en 100 ml de agua desionizada, se guarda en refrigeración.

-Solución estandar de albúmina (400 μ g/ml)

se pesan 20 mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en 50 ml de agua desionizada, se hacen alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se almacenan a -20 °C

SELECCION FENOTÍPICA DE CEPAS DE *R. eli* EN CAJA.

A: Para fenotipos de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno

- 1.- Se preparan cajas de Petri con medio mínimo más las fuentes de carbono o nitrógeno a las concentraciones indicadas. (ver medios de cultivo).
- 2.- Se utilizan además de los anteriores los medios PY, medio mínimo amonio succinico y LB.
- 3.- Las placas de agar se colocan sobre un disco de papel con números de 1 al 100 uniformemente distribuidos.
- 4.- Se toma con un palillo de madera estéril cada colonia de interés.
- 5.- Con el palillo se pican las placas de medio de cultivo, cuidando de picar en todas el mismo número; el orden de picado de los medios debe ser establecido de forma que primero se pique el que contenga menos nutrientes y al final el medio LB
- 6.- Se incuba a 30 °C el tiempo necesario para diferenciar los crecimientos de la colonias (entre 3 y 5 días).
- 7.- Se leen los crecimientos contra los controles.

B: Para fenotipos de resistencia a antibióticos.

- 1.- Se utilizan medio PY mas los antibióticos, los controles son medio PY sin antibióticos y medio LB.
- 2.- Se colocan la cajas sobre el disco numerado.
- 3.- Se toma cada colonia de interés con un palillo de madera estéril.
- 4.- El orden de picado es PY sin antibióticos, PY mas antibioticos y L.B.
- 5.- Se incuban las cajas a 30 °C .
- 6.- Se leen las cajas contra los controles.

EXTRACCIÓN DE DNA QUICK CLONE ANALYSIS (modificado)

- 1.- Preparar cultivos líquidos de bacterias de entre 12 y 18 horas de incubación a 37° C y 200 r. p. m. de agitación (para el caso de cultivos de *E. coli*)
- 2.- Llenar un tubo eppendorf con el cultivo.
- 3.- Centrifugar durante 1 minuto a 14 000 r p m. en la microcentrifuga.
- 4.- Aspirar el sobrenadante con una punta de micropipeta conectada a un matraz kzasato conectado a su vez a la línea de vacío.
- 5.- Repetir dos veces los puntos 2 a 4
- 6.- Agregar a la pastilla 100 ul de solución A.
- 7.- Resuspender con el vortex.
- 8.- Agregar 200 ul de solución B
- 9.- Agitar invirtiendo el tubo repetidas veces hasta lograr homogeneidad.
- 10.- Incubar 5 minutos en baño de hielo
- 11.- Agregar 150 ul de solución C.
- 12.- Agitar en vortex durante algunos segundos.
- 13.- Reposar durante 10 minutos en baño de hielo
- 14.- Centrifugar durante 6 minutos en microcentrifuga a 14 000 r p m.
- 15.- Verter el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 16.- Agregar 1 ml de etanol absoluto frio
- 17.- Reposar durante 30 minutos en el congelador de -20 °C.
- 18.- Centrifugar a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos
- 19.- Aspirar el sobrenadante con ayuda de la línea de vacío
- 20.- Agregar 300 ul de etanol al 70 %
- 21.- Centrifugar durante 3 minutos a 14 000 r p m. en la microcentrifuga.
- 22.- Aspirar el sobrenadante con vacío.
- 23.- Secar en un horno de vacío durante 30 o 40 minutos.
- 24.- Disolver la muestra en amortiguador TE. (20 ul si no se va a purificar y 100 ul si se quiere purificar)
- 25.- Mantener a -20° C las muestras para su conservación.

- SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA.

- Solución A

EDTA

10 mM

Tris pH8 25 mM

Se preparan soluciones de EDTA 0.5 M y Tris pH8, 2 M, se agregan 2 ml de la solución de EDTA y 1.25 ml de la solución de Tris, se lleva el volumen a 100 ml.

*EDTA 0.5 M pH8
EDTA*2Na c. b p 16.81g
agua desionizada c. b p 100 ml.

El reactivo se vierte en el agua y se agregan lentejas de NaOH para ayudar a la disolución, se mide el pH con el potenciómetro, se esteriliza por autoclave.

*Tris 2.0 M pH8
Tris base 24.228 g
agua desionizada c. b p 100 ml

El pH se ajusta con HCl y se esteriliza en autoclave.

-Solución B

NaOH 0.2 N
SDS 1.0 %

Esta solución se prepara cada vez que se necesita, se utilizan soluciones concentradas de SDS al 20 % y NaOH 10N.

NaOH 10 N 100 μ l
SDS 20 % 250 μ l
agua estéril 4.650 ml

Primero se agrega la solución de hidróxido de sodio y se agita, después la de SDS para evitar precipitación del detergente, se mezcla en un tubo de ensayo estéril.

*NaOH 10 N
NaOH 10 g
agua estéril 25 ml

Se disuelve en un vaso de pp. estéril. Se puede guardar hasta por dos meses.

*SDS 20 %
Octodécilsulfato de sodio 20g
agua estéril c. b p. 100 ml.

Se agrega el detergente y se calienta ligeramente el agua hasta disolución, evitando que se formen burbujas.

PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE EXTRACCIÓN FENOL-CLOROFORMO.

- 1.- Agregar a la solución de DNA que se quiere purificar el mismo volumen de una solución de fenol estabilizado-cloroformo 1:1 vol.vol.
- 2.- Agitar con el vortex durante 10 segundos.
- 3.- Centrifugar en la microcentrífuga a 14 000 r p m. durante 5 minutos.
- 4.- Retirar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta cuidando de no extraer la interfase, colocarla en otro tubo eppendorf nuevo y estéril. (repetir los pasos 1 a 4 hasta que no tengan interfase).

- 5.- Agregar cloroformo en una relación 1:1, vol vol.
- 6.- Agitar en el vortex durante 10 segundos.
- 8.- Centrifugar a 14 000 r.p.m durante 5 minutos
- 9.- Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo y estéril
- 9.- Agregar solución de acetato de sodio 0.3 M a una relación 1:10 vol vol.
- 10.- Agregar etanol absoluto frío a una relación 1:1 vol vol
- 11.- Reposar a -20 °C durante 20 minutos
- 12.- Centrifugar durante 5 minutos a 14 000 r.p.m
- 13.- Retirar el sobrenadante con ayuda de un matraz kitasato y una línea de vacío.
- 14.- Agregar 300 µl de etanol frío al 70 %
- 15.- Centrifugar durante 2 minutos a 14 000 r.p.m
- 16.- Aspirar el sobrenadante con ayuda de una línea de vacío
- 17.- Secar la muestra en un horno de vacío durante 20 minutos
- 18.- Disolver en amortiguador TE 1:10

-SOLUCIONES PARA PURIFICACION DE DNA.

-Fenol estabilizado - cloroformo
 Fenol estabilizado 50 ml
 cloroformo 50 ml

Luego de hacer la mezcla se guarda en refrigeración en un frasco amber.

*Fenol estabilizado

- 1.- Se licua fenol grado biología molecular a 70 °C
- 2.- Se agrega Tris 1M, pH 8 en relación 1:1 vol vol en el mismo frasco amber del fenol.
- 3.- Se lleva al cuarto frío y se mantiene en agitación constante con el frasco cerrado.
- 4.- Se hace un cambio de amortiguador de Tris a las 4 horas de agitación
- 5.- Se mantiene en agitación en el cuarto frío
- 6.- Se mide el pH de la solución de Tris y del fenol, cuando el pH de las dos fases sea de 7.6 se cambia el Tris 1 M por Tris 0.1 M
- 7.- Se mantiene en agitación en frío durante 3 horas más
- 8.- Se hacen alícuotas y se guardan en congelación a -20 °C

PURIFICACIÓN DEL DNA DE UN GEL DE AGAROSA DE PUNTO DE FUSIÓN NORMAL

- 1.- Correr la electroforesis a 15 V durante toda la noche.
- 2.- Cortar del gel de agarosa la banda que contiene el DNA que se quiere extraer.
- 3.- Dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml se divide en trozos pequeños la banda de agarosa.
- 4.- Perforar en el fondo de un tubo eppendorf nuevo y estéril de 0.5 ml con la aguja caliente de una jeringa de insulina
- 5.- Colocar en el fondo del tubo una capa de entre 2 y 3 mm de fibra de vidrio.
- 6.- Compactar la fibra de vidrio con un tubo de vidrio de 3 mm.
- 7.- Introducir trozos de agarosa con DNA en el tubo perforado
- 8.- Introducir el tubo de 0.5 ml dentro de un tubo eppendorf nuevo y estéril de 1.5 ml

- 9.- Centrifugar los tubos a 6 000 r p m durante 5 minutos en la microcentrifuga
- 10.- Observar el tubo pequeño en el transiluminador de U V , si la agarosa aun contiene DNA se repite el paso 9.-
- 11.- Se extrae el DNA del liquido contenido en el tubo grande mediante la tecnica del fenol-cloroformo.

ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE DNA.

A)

- 1.- Pesar 2. 5 g de agarosa de punto normal de fusión.
- 2.- Añadirlos a 250 ml de amortiguador TBE 1X contenidos en un matríz Erlenmeyer de 500 ml.
- 3.- Calentar en el horno de microondas hasta disolución de la agarosa.
- 4.- Dejar enfriar hasta aproximadamente 40 °C.
- 5.- Agregar 3 µl de una solución de bromuro de etidio de 10 mg/ml
- 6.- Agitar
- 7.- Cerrar los extremos abiertos del soporte del gel con papel adhesivo de 1 cm para formar un molde.
- 8.- Fijar el peine para formar los pozos separado del fondo del soporte el grueso de una hoja de papel.
- 9.- Retirar el trozo de papel.
- 10.- Verter la agarosa sobre el soporte hasta obtener una capa de entre 3 y 6 mm de espesor
- 11.- Dejar enfriar

B)

- 12.- Agregar a las muestras de DNA un décimo de su volumen de la mezcla de colorantes para corrida. (Si solo se quiere utilizar una parte de la muestra , se mezcla con la solución de colorantes sobre un pedazo de parafilm)
- 13.- Mezclar hasta la homogeneidad.
- 14.- Centrifugar durante 5 s. a 14 000 r p m (solo si se trata de tubos)
- 15.- Retirar las cintas que se utilizaron para contener a la agarosa en el soporte
- 16.- Introducir el gel en la cámara para electroforesis
- 17.- Llenar el primer pozo con 5 µl de marcador de peso molecular de DNA (ladder)
- 18.- Llenar los pozos con las muestras
- 19.- Hacer una relación escrita de los pozos y las muestras.
- 20.- Correr el gel a 100 V durante 1 hora o hasta separación de las bandas de los colorantes.
- 21.- Observar el gel en el transiluminador de luz U.V

-SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE DNA.

-Amortiguador Tris-Boratos-EDTA 10X.

Tris base	0.089 M
Acido bórico	0.089 M
EDTA	0.002 M

para preparar 2 l.

Tris base	108.0 g
Acido bórico	55.0 g
EDTA 0.5 m pH8	40 ml
Agua desionizada c.b.p.	2 l

Para prepara el amortiguador 1 X se hace una dilución 1.10

REACCIONES DE LIGACIÓN DE DNA DE INTERPOSÓN Y PLASMIDO .

- 1.- Hacer diluciones de las muestras de DNA que se van a ligar.
- 2.- Llenar los pozos de un gel con las muestras, sus diluciones y con ladder.
- 3.- Correr el gel a 100 V. hasta la separación de las bandas que se pretenden observar.
- 4.- Observar la intensidad de las bandas en el transiluminador de luz UV.
- 5.- Calcular el volumen necesario de las soluciones de plásmido (vehículo) e interposón , para obtener un ligero exceso de interposón en una mezcla equimolar
- 6.- Mezclar las cantidades calculadas
- 7.- Llevar el volumen a 10 μ l.
- 8.- Incubar durante 10 minutos a 45°C en baño de agua
- 9.- Introducir los tubos en baño de hielo
- 10.- Agregar 2 μ l de amortiguador 10X para ligasa.
- 11.- Agregar 1 μ l de DNA-ligasa de T4
- 12.- Incubar a 16°C durante cuatro horas
- 13.- Si el material no se va a utilizar inmediatamente se congela a -20 °C

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*.

- 1.- Crecer la cepa en cajas de Petri con medio LB mas los antibióticos requeridos, inocular con cultivos congeladas con glicerol o DMSO.
- 2.- Incubar durante la noche a 37 °C.
- 3.- Inocular con una asada de las células un matraz de 100 ml con medio LB
- 4.- Incubar a 37 °C con agitación a 200 r.p.m. durante 4 o 5 horas
- 5.- Centrifugar el cultivo en una botella para centrifuga estéril a 4 000 r.p.m. en rotor GSA a 4 °C durante 5 minutos.
- 6.- Lavar las células con una solución previamente enfriada a 4 °C de NaCl al 0.85%.
- 7.- Centrifugar en las mismas condiciones.
- 8.- Resuspender las células en 3 ml de solución salina al 0.85%
- 9.- Calcular el volumen para inocular un matraz de 2 l con 250 ml de medio SOB con una absorbancia de 0.02 a 600 nm (ver técnica en curva de crecimiento)
- 10.- Incubar a 18 °C con agitación de 200 r.p.m. hasta obtener un valor de absorbancia de 0.6.
- 11.- Incubar el cultivo con densidad óptica de 0.6 en baño de hielo durante 10 minutos
- 12.- Centrifugar el cultivo durante 10 minutos a 4000 r.p.m. (rotor GSA) a 4 °C.
- 13.- Decantar.
- 14.- Resuspender en amortiguador TB previamente enfriado en hielo

- 15.- Incubar en baño de hielo durante 10 minutos
 16.- Centrifugar durante 10 minutos a 4 000 r p m (rotor GSA) a 4 °C.
 17.- Decantar.
 18.- Resuspender la pastilla celular en 20 ml de amortiguador TB previamente enfriado en hielo.
 19.- Agregar 1.5 ml. de DMSO estéril
 20.- Incubar en baño de hielo durante 10 minutos
 21.- Adecuar 0.5 mL o 1.0 ml en tubos eppendorf nuevos y estériles
 22.- Guardar rápidamente las células a -70 °C

-MEDIO SOB

Composición	
Peptona de caseína	2.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Para preparar 250 ml	
Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	1.25 g
NaCl	0.1461 g
KCl	0.0466 g
MgCl ₂	0.5082 g
MgSO ₄	0.6162 g
Agua desionizada c. b p.	250 ml.

Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos.

-MEDIO SOC.

Se agregan 0.36 g de glucosa para cada 100 ml de medio SOB antes de esterilizar.

- SOLUCIONES PARA PREPARAR CELULAS COMPETENTES Y TRANSFORMAR.

-Amortiguador para transformación.

Composición	
Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH7.6	

Se preparan tres soluciones por separado para evitar que se formen precipitados durante la esterilización, para obtener 100 ml del amortiguador se mezclan 80 ml solA + 10 ml de solB + 10 ml solC antes de utilizarlo.

-Solución A

PIPES 12 mM
KCl 300 mM

Para preparar 500 ml se pesan 1.8144 g de PIPES (Piperazina-N,N'-bis(ácido-2-etanosulfónico) y 11.1825 g de KCl se disuelven en agua y se aforan a 500 ml. se ajusta el pH a 6.7 unidades y se esteriliza en autoclave.

-Solución B

MnCl₂ 0.55 mM

Para preparar 100 ml se pesan 10.8845 g de cloruro de manganeso, se disuelven en agua y se lleva volumen a 100 ml, se esteriliza en autoclave.

-Solución C

CaCl₂ 150 mM

Para preparar 100 ml se pesan y disuelven 2.205 g de cloruro de calcio en agua desionizada, se lleva el volumen a 100 ml y se esteriliza en autoclave.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES CONGELADAS.

- 1.- Descongelar las células a temperatura ambiente
- 2.- Alicuotar 200 μ l en tubos eppendorf nuevos y estériles
- 3.- Colocar los tubos en baño de hielo
- 4.- Agregar entre 1 y 5 μ l de la solución de plásmido que se desea transformar
- 5.- Resuspender con la micropipeta.
- 6.- Incubar durante 30 minutos en baño de hielo.
- 7.- Introducir los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 30 segundos.
- 8.- Regresar los tubos al baño de hielo, - no agitar-.
- 9.- Agregar a cada tubo 800 μ l de medio SOC.
- 10.- Transferir el contenido de los tubos a un tubo de vidrio de 13 * 100 mm limpio y estéril.
- 11.- Incubar con agitación de 250 r.p.m. durante 1 hora a 37 °C.
- 12.- Transferir el cultivo a un tubo eppendorf.
- 13.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m. en la microcentrifuga .
- 14.- Decantar hasta tener un volumen de aproximadamente 50 μ l.
- 15.- Resuspender suavemente con la micropipeta P200.
- 16.- Plaquear en cajas de LB más los antibióticos.

CRUZA DE BACTERIAS**A.- Cruzas biparentales (para plásmidos con genes tra)**

- 1.- Inocular las cepas en medios ricos semisólidos más antibióticos (*R. etli* en medio PY y *E. coli* en medio LB)
- 2.- Incubar a 37 °C si es cepa de *E. coli* o a 28 °C las cepas de *R. etli*.
- 3.- Verter 1 ml de solución salina al 0.85% estéril en un tubo eppendorf estéril para cada cepa.

- 4.- Resuspender cada cepa en la solución contenida en los tubos, guardar células suficientes para las cajas control
 - 5.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r p m en la microfuga
 - 6.- Decantar.
 - 7.- Agregar 1 ml de la solución salina.
 - 8.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r p m. en la microcentrifuga
 - 9.- Decantar.
 - 10.- Resuspender en el menor volumen posible, buscando que las cepas estén a la misma concentración.
 - 11.- Agregar una cantidad equivalente de cada cepa en un tubo estéril
 - 12.- Mezclar con la micropipeta
 - 13.- Verter la cruz a sobre una placa de medio LB sin antibióticos si se cruzan dos cepas de *E. coli* o, en una placa de medio PY sin antibióticos si se cruzaron una cepa de *E. coli* y una de *R. etli*.
 - 14.- Esperar que la cruz pierda agua hasta poder invertir la caja sin que las células caigan.
 - 15.- Incubar durante una noche a 37 °C las cruces de *E. coli* y a 28 °C las cruces de *Rhizobium* con *E. coli*.
 - 16.- Tomar una asada de la cruz a y sembrar por agotamiento en cajas de medio rico mas la mezcla de antibióticos que se espera resista la nueva cepa. Sembrar cantidades similares de las cepas con las que se hizo la cruz a.
- Si se requiere conocer la frecuencia de la conjugación se realizan cuentas por dilución de cada tipo de célula-.

B.- Cruzas triparentales

- 1.- Inocular en medios semisólidos las cepas
- E. coli* HB101 con el plásmido que se pretende conjugar en LB mas el antibiotico de la resistencia del plásmido
- E. coli* HB101 con el plásmido colaborador pRK2073 en medio LB más espectinonucina
- La cepa de *R. etli* que va ser hospedera del plasmido
- 2.- Incubar a 37 °C las cepas de *E. coli* y a 28 °C las cepas de *R. etli*
- 3.- Resuspender las bacterias de cada cepa en solución salina al 0.85 % esteri en tubos eppendorf
- 4.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r p m en la microcentrifuga
- 5.- Decantar.
- 6.- Agregar 1 ml de solución salina.
- 7.- Resuspender la pastilla celular.
- 8.- Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r p m. en la microcentrifuga.
- 9.- Decantar.
- 10.- Resuspender en un volumen de solución salina que asegure tener la misma concentración de cada cepa.
- 11.- Mezclar en un tubo la cepa de *Rhizobium* con la cepa que tiene el plásmido de interés.
- 12.- Mezclar en un tubo una cantidad similar de la cepa que tiene el plásmido de interés, la cepa con el plásmido colaborador y la cepa de *Rhizobium*
- 13.- Centrifugar durante unos segundos a 10 000 r p m en la microcentrifuga
- 14.- Decantar.
- 15.- Resuspender en el menor volumen posible
- 16.- Verter las cruces por separado en cajas con medio PY sin antibióticos
- 17.- Dejar secar la cruz a hasta poder invertir la caja
- 18.- Incubar a 28 °C durante una noche.

- 19.- Tomar una asada de cada una de las cruizas y estriar en cajas de medio PY mas ácido nalidixico y el antibiótico al cual el plásmido que se transfiere proporciona resistencia
- 20.- Estriar en el mismo medio que en 19 - las cepas con la que se hizo la cruz.
- 21.- Incubar a 28 °C hasta aparición de colonias (3 a 5 días)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos se preparan en soluciones 1000 X para ser añadidos al medio de cultivo una vez que está frío o tibio.

- Espectinomina (Sp) 1000 X concentración final 200ug/ml.

Se disuelven 200 mg por mililitro de agua desionizada y se esteriliza por filtración, se guarda en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

- Estreptomina (Sm) 1000 X concentración final 200 ug/ml

Se disuelven 200 mg por mililitro de agua desionizada , se esteriliza por filtración y se guardan alícuotas de 1ml en tubos eppendorf a -20 °C.

- Acido nalidixico (Nal) 1000 X concentración final 20 ug/ml

Se disuelven 20 mg por mililitro de una solución de NaOH 0.1 N se esteriliza por filtración, se guarda en alícuotas de 1 ml a -20 °C en tubos eppendorf protegidos de la luz.

- Tetraciclina (Tc) 1000 X concentración final 10 ug/ml

Se disuelven 10 mg en cada mililitro de metanol, se hacen alícuotas y se guardan a -20 °C protegidas de la luz.

RESULTADOS

1. Fenotipo de utilización de glutamina y glutamato de la mutante LM01 de *R. etli* complementada con el plásmido pMGD4.3.

Con objeto de descartar una posible reversión del fenotipo de la mutante LM01 de *Rhizobium etli* se inoculó en medio mínimo glutamina de donde fue seleccionada (10), además se inoculó en medio mínimo amonio-succinato y medio rico peptona levadura (ver material y métodos) como control de crecimiento en medio mínimo y en medio completo que se espera no estén alterados, en las mismas condiciones se incluyeron dos cepas complementadas de la mutante (LM01/pMGD4 y LM01/pMGD4.3) obtenidas con anterioridad (19) para verificar que los plásmidos con los que se trabajará complementan la mutación, la mutante LM01 fue complementada con el banco genético de la especie que está clonado en el plásmido pLAFR1, de entre los plásmidos que la complementaron se seleccionó al plásmido pMGD4 porque es el que mejor complementó la mutación, este plásmido tiene aproximadamente 18 Kb de material genético inserto y fue subclonado con la enzima de restricción EcoRI obteniéndose entre las subclonas al plásmido pMGD4.3 que tiene 5 Kb de inserto y complementa a la mutante. El fenotipo de todas las cepas fue verificado en caja mediante inoculación por palillo en placas de medio de cultivo semisólido (ver material y métodos) , las lecturas de crecimiento de todos los medios se cuantifican con respecto a la cepa silvestre CE3 de *R. etli*, las fuentes de carbono y nitrógeno se agregaron en una concentración de 10 mM (ver material y métodos). (tabla 1)

CRECIMIENTO EN CAJA DE LAS CEPAS DE *R. etli*

cepa / medio	MM gln	MM NH ₄ ⁺ succ	PY
LM01	-	+++	+++
LM01/pMGD4	+++	+++	+++
LM01/pMGD4.3	+++	+++	+++
CE3	+++	+++	+++

Símbolos MM = medio mínimo, gln = glutamina, succ = succinato de medio, NH₄⁺ = cloruro de amonio, PY = medio peptona levadura, - no crece, +++ muy bien

Tabla 1. Fenotipo en caja de la cepas LM01 y LM01 complementadas

En la tabla 1 se observa que la mutante LM01 no puede utilizar a la glutamina como única fuente de carbono y nitrógeno, y que crece igual que la cepa silvestre en medio rico y medio mínimo amonio succinato.

Una vez comprobado que la mutante LM01 de *R. etli* no revirtió su fenotipo gln⁻, se hicieron curvas de crecimiento en medio líquido para obtener datos cinéticos del crecimiento de las cepas, pues son más útiles que el fenotipo en cajas que determina únicamente si las cepas crecen o no en la condición evaluada. Se utilizaron medios mínimos suplementados con glutamina, glutamina-succinato, glutamato, glutamato-succinato y amonio-succinato respectivamente; la razón de

seleccionar estos medios de cultivo es conocer si la mutante puede utilizar a los aminoácidos glutamina y glutamato como fuente únicas de carbono y nitrógeno, y como fuentes de nitrógeno, ya que estas capacidades se habían encontrado alteradas (10), el medio con amonio y succinato es un control de crecimiento en medio mínimo (Figura 1) En la figura 1 se observa que la mutante tiene afectada la capacidad de utilizar a los aminoácidos glutamina y glutamato como fuentes únicas de carbono y nitrógeno y como fuentes de nitrógeno, contrario a lo que se esperaba y a los resultados obtenidos de la fenotipificación en caja, la mutante tiene reducida la capacidad de crecer en medio mínimo amonio succinato

Con objeto de determinar si la reducción en el crecimiento de la mutante LM01 de *R. etli* en medio mínimo succinato es efecto de la fuente de carbono o reducción de la capacidad de asimilar amonio, se realizó una curva de crecimiento en medio mínimo amonio glucosa, (Figura 2) En las gráficas de la figura 2 se observa que cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno la mutante tiene reducida la capacidad de asimilar amonio lo mismo que en medio mínimo amonio-succinato (figura 1) La curva de crecimiento mostrada en la figura 2 fue seguida por densidad óptica y por cantidad de proteína, las tendencias de ambas curvas son iguales, con base en este resultado el monitoreo de las siguientes curvas se realizara unicamente por densidad óptica

2. Subclonación del plásmido pMGD4.3.

El plásmido pMGD4.3 se subclonó del plásmido pMGD4 con la enzima de restricción EcoRI (10) y comparten dos fragmentos de restricción para esta enzima (Figura 3) uno de 2 Kb y otro de 3 Kb de peso, ya que los plásmidos pMGD4 y pMGD4.3 están clonados en el vehículo pLAFR1 con la enzima de restricción EcoRI se puede subclonar en el mismo vehículo al pMGD4.3 cortando con EcoRI para obtener dos plásmidos independientes con cada una de las bandas de restricción buscando de esta forma reducir el material clonado a la mínima expresión que complemente el fenotipo de la mutante LM01 de *Rhizobium etli*

Patrón de restricción EcoRI de los plásmidos pMGD4 y pMGD4.3

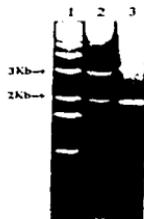


Fig 3. 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pMGD4, 3: plásmido pMGD4.3 (subclona de pMGD4.3).

La técnica utilizada para subclonar al plásmido pMGD4.3 consiste en obtener digestiones parciales del mismo, las digestiones parciales permiten tener en la mezcla de reacción plásmidos a los que se realizaron solo dos cortes, al religar al plásmido con una ligasa de DNA solo tendrán una banda que es lo que se busca. Para encontrar la digestión parcial adecuada se incubó una cantidad constante de DNA de plásmido variando la cantidad de enzima de restricción EcoRI. Se utilizaron 15 μ l de DNA de una solución concentrada de plásmido pMGD4.3 agregando 1.5, 2.5, 5, 10 y 20 unidades de la enzima de restricción EcoRI, se incubó la mezcla durante 60 minutos a 37 °C (ver material y métodos), se hizo electroforesis de las muestras para encontrar un gradiente de digestión (dato no mostrado). Las muestras se ligaron a 16 °C durante 4 horas (material y métodos)

Con el DNA ligado se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* HB101 (ver material y métodos) seleccionando aquellas que crecieran en LB Tc, se les extrajo DNA de plásmido, se digirió con la enzima de restricción EcoRI y se hizo electroforesis de las muestras. Luego de analizar a las 80 colonias resultantes de todas las transformaciones se hizo una gráfica que se muestra en la figura 4, con esta gráfica se pudo encontrar la cantidad necesaria de enzima de restricción para que las tendencias de perder todo el inserto o conservarlo sean iguales graficando los porcentajes de plásmido con dos o ningún fragmento de restricción encontrados en cada condición. Se realizó entonces la digestión parcial de 15 μ l de la misma muestra de DNA de plásmido con 3.5 unidades de la enzima EcoRI en las condiciones descritas, el DNA se ligó en las mismas condiciones que las otras digestiones parciales y de las colonias obtenidas se analizaron 18, una de ellas tiene el fragmento de 3Kb y tres tienen el fragmento de 2 Kb. Las subclonas se nombraron pMGD4.3.3K la que tiene el fragmento pequeño y pMGD4.3.2K la que tiene el fragmento de 2Kb (Figura 5)

Porcentaje de pérdida o mantenimiento de los dos fragmentos de restricción EcoRI en el plásmido pMGD4.3 sometido a digestión parcial y religamiento.

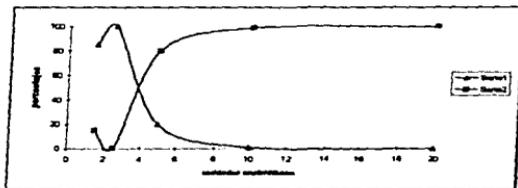


Figura 4. Serie 1: porcentaje de plásmidos con los dos fragmentos de restricción, Serie 2: porcentaje de plásmidos sin inserto

**Patrón de restricción con EcoRI de las
las subclonas del plásmido pMGD4.3**

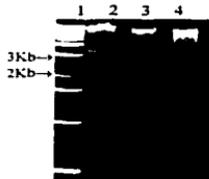


Figura 5. 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pMGD4.3, 3: plásmido pMGD4.3.3K subclonado del pMGD4.3, 4: plásmido pMGD4.3.2K subclonado del pMGD4.3

3. Conjugación de las subclonas del plásmido pMGD4.3 en la mutante LM01.

Para conocer si los plásmidos pMGD4.3.2K y pMGD4.3.3K complementan la mutación se introdujeron por conjugación en la mutante LM01 de *R. ethi*, la conjugación se hizo mediante crucea triparental (ver material y métodos), en esta crucea se utilizaron las cepas LM01 de *R. ethi*, HB101/pRK2073 de *E. coli* y HB101/pMGD4.3.2K o HB101/pMGD4.3.3K de *E. coli* respectivamente. Las bacterias se seleccionaron por su resistencia a los antibióticos ácido nalidixico y tetraciclina con objeto de tener a las bacterias de *R. ethi* (resistencia a NaI) con el plásmido (resistencia a Tc). Una vez obtenidas las cepas LM01/pMGD4.3.2K y LM01/pMGD4.3.3K se hicieron curvas de crecimiento en los medios antes descritos (figura 6) En la figura 6 se puede observar que los plásmidos pMGD4.3.2K y pMGD4.3.3K no complementan a la mutante LM01 de *R. ethi* hecho indicativo de la existencia de un sitio de restricción para la enzima EcoRI que interrumpe el locus que la complementa. Con este dato sabemos que para reducir el material genético del plásmido pMGD4.3 y así obtener un plásmido que complemente el fenotipo de la mutante LM01 de *R. ethi*, debemos cortar los dos extremos del inserto, decidimos no realizar esa subclonación porque teniendo un sitio de restricción conocido en el gen de interés se puede secuenciar hacia ambos lados del inserto y porque sería interesante en caso de secuenciar el inserto del plásmido pMGD4.3 conocer la secuencia involucrada y las que la flanquean inmediatamente

4. Mutagénesis del inserto del plásmido pMGD4

Para mutagenizar el locus que complementa a la mutante LM01 de *R. ethi* se plantearon dos estrategias

- La primera de ellas consiste en insertar "in vivo" un transposon en la secuencia que complementa a la mutante que está en los fragmentos de restricción EcoRI que comparten los plásmidos pMGD4 y pMGD4.3, este método tiene las ventajas de dar un producto mutagenizado fácilmente seleccionable gracias a la resistencia a antibióticos de los transposones, puede localizarse en el patrón de restricción del plásmido con una enzima de restricción adecuada y pueden obtenerse un alto número

de inserciones en lugares distintos. Al ser un proceso "in vivo" las dificultades las condiciones son más fáciles de obtenerse con respecto a la segunda estrategia planteada.

* La segunda estrategia consiste en aprovechar el hecho de que el locus que complementa a la mutante LMD1 de *R. coli* tiene un sitio de restricción EcoRI para insertar un "interposon" "in vitro", un interposon es un fragmento de DNA que da resistencia a un antibiótico y que está flanqueado por interruptores de la transcripción, este método conserva las ventajas de los transposones pues al igual que aquellos es seleccionable y localizable, pero a diferencia de los transposones una vez insertado no puede cambiar de sitio (transponerse), lo que hace la mutación más estable.

4.1 Mutagénesis del locus con transposón

Considerando el peso molecular del transposon Tn5 que va a utilizarse en la mutagénesis del locus que complementa a la mutante es 5Kb, decidimos mutagenizar solo el inserto del plásmido pMGD4 que tiene aprox 18 Kb de inserto, ya que el producto de la mutagénesis necesita tener material suficiente para homologarse en una recombinación con la cepa silvestre. Si utilizáramos el plásmido pMGD4 3 sería más probable obtener la inserción en el sitio correcto por el tamaño del inserto, pero con solo 5 Kb de material homologable y 5 Kb del transposon, la recombinación sería menos probable.

En la mutagénesis del inserto del plásmido pMGD4 se utilizó el transposon Tn5 que está en el genoma de la cepa de *Escherichia coli* MT614. Se transformó a la cepa MT614 con el plásmido pMGD4 (ver material y métodos) seleccionando a las colonias que crecieron en medio LB con tetraciclina, se tomó una colonia y se verificó que hospedara al plásmido extrayendo DNA de plásmido y observándolo en un gel de agarosa (dato no mostrado). Con objeto de conocer si la concentración del antibiótico al que da resistencia el transposon afecta la frecuencia de transposición del Tn 5 a los plásmidos, utilizamos la concentración normal o el doble concentración de kanamicina en los cultivos de la cepa MT614/pMGD4.

Para poder seleccionar a los plásmidos que tengan insertado al transposon Tn5 se utilizó un método de selección (17) que utiliza un cambio de célula hospedadora de los plásmidos mutagenizados, y por resistencia a antibióticos se puede aislar a los de interés. La técnica consiste en conjuguar a los plásmidos mutagenizados por cruz triparental (ver material y métodos) entre las cepas de *E. coli* MT614/pMGD4, C2110 y HB101/pRK2073. Se seleccionó a las colonias que crecieron en medio LB con la mezcla de antibióticos ácido nalidixico (Nal), tetraciclina (Tc) y kanamicina (Km), para seleccionar a las bacterias de la cepa C2110 (resistencia a Nal) que tengan como huésped al plásmido pMGD4 (resistencia a Tc) mutagenizado con un transposón (resistencia a Km). En las cruces en las que se usaron bacterias MT614/pMGD4 crecidas en 60 ug/ml de kanamicina, se obtuvieron más clones Nal, Km, Tc resistentes.

A la totalidad de las colonias resistentes a Nal, Tc y Km obtenidas se les extrajo el DNA de plásmido porque aunque ya podían caracterizarse las inserciones del transposón en los plásmidos que las infectan, se prefirió trabajar con la cepa HB101 en lugar de la C2110 pues de la primera resulta más fácil obtener plásmido limpio, las células Nal, Km, Tc resistentes se inocularon en un medio LB con la mezcla de antibióticos a una densidad alta para minimizar el riesgo de selección clonal, a las 6 horas se extrajo el DNA; El DNA obtenido se usó para transformar células competentes de *E. coli* cepa HB101. (material y métodos)

Las células resistentes a Tc y Km obtenidas de las transformaciones descriptas se crecieron en medio líquido y se les extrajo DNA de plásmido, se digirió el DNA con la enzima de restricción EcoRI y se hicieron gels buscando patrones de restricción en los que alguna de las bandas que comparten los plásmidos pMGD4 y pMGD4 3 (bandas de 2 y 3 Kb respectivamente) aumentarían de

peso 5Kb, el trasposón Tn5 no tiene sitio de restricción para la enzima EcoRI, por lo que cualquier fragmento de restricción obtenido al cortar con dicha enzima, y que tenga inserto al transposon aumentará de peso en un factor que representa el peso del trasposon.

Luego de analizar los patrones de restricción con la enzima EcoRI de 307 plásmidos Tc y Km resistentes no se encontró alguno cuyo patron de restricción indicara la insercion en los fragmentos de restricción EcoRI de 2 o 3 Kb. Solo se encontraron plásmidos que pierden la banda de aprox 8 y aprox 1.8 kilobases de DNA. En la Tabla 2 se muestra el numero de colonias analizadas y el sitio de insercion del transposon, mientras que en la figura 7 se muestran los patrones de restricción representativos de cada situacion.

INSERCIONES DE Tn 5 EN EL PLÁSMIDO pMGD4

SITIO DE INSERCIÓN	# DE COLONIAS
En el vehiculo	287
En la banda de 8 Kb	5
En la banda de 1.5 Kb	3
En otras bandas	0
Artefactos	3

Tabla 2. Localización de las inserciones del Tn5 en los plásmidos caracterizados por patrón de restricción EcoRI.

Patrones de restricción EcoRI de los plásmidos con el Tn5 insertado.

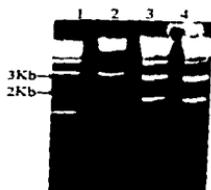


Figura 7. 1: Marcador de peso molecular, 2: plásmido pMGD4, 3: plásmido pMGD4::Tn5 # 35 con inserción en la banda de aprox. 1.7 Kb, 4: plásmido pMGD4::Tn5 # 194 con inserción en la banda de aprox 8 Kb.

Con objeto de comprobar que las inserciones encontradas no mutagenizan el locus que complementa a la mutante LM01 de *R. ethi.* se introdujeron en la mutante por conjugación plásmidos

representativos de las inserciones del transposón que se detectaron en los fragmentos de restricción del inserto y otros que se insertaron en el vehículo, todos los plásmidos conjugados complementan a la mutante y le confieren resistencia a Tc y Km

4. 2 Mutagénesis "in vitro" del plásmido pMGD4.3

Luego de no lograr mutagenizar el plásmido con el transposón se inició la mutagénesis con el interposón. El interposón con el que se trabajó es el fragmento omega de resistencia al antibiótico espectinomomicina (Sp), tiene 2 Kb de peso molecular y esta flanqueado por terminadores de la transcripción (49), se utilizaron para esta técnica los dos plásmidos (pMGD4 y pMGD4.3), el pMGD4 tiene la ventaja de que por su tamaño facilitara una recombinación, sin embargo la probabilidad de que el interposón se introduzca en el sitio adecuado es menor que en el plásmido pMGD4.3 pues a diferencia de aquel que tiene 3 sitios de restricción EcoRI el pMGD4 tiene 7 sitios de corte.

Para la mutagénesis se purificó DNA del fragmento omega a partir del plásmido pMW157, para ello se digirió totalmente al plásmido con la enzima de restricción EcoRI y después se separaron los fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa al 1% del cual se extrajo el inserto por centrifugación de la banda de agarosa que tiene al fragmento omega (banda de 2Kb) (ver material y métodos). Por separado se prepararon digestiones parciales de los plásmidos pMGD4 y pMGD4.3 buscando que la digestión tuviera solo un corte, esto se puede observar en los gels cuando es claramente visible una banda arriba de la correspondiente al vehículo y las bandas del inserto se aprecian ligeramente.

Las digestiones parciales de los plásmidos pMGD4 y pMGD4.3 se transformaron en células competentes de la cepa HB101 (material y métodos), aquellas que conservaban su capacidad de transformar se digerían hasta que la perdieran, pero sin que se observaran claramente los fragmentos de restricción luego de la electroforesis en gels de agarosa.

Para obtener a los plásmidos que tuvieran inserto al interposón se hizo una mezcla del DNA del inserto y del plásmido para ligarlo con la enzima DNA ligasa de T4, la mezcla de reacción se hacía calculando las proporciones de DNA, la que dio mejor resultado fue mezclar el doble de DNA del inserto con respecto al plásmido. La reacción se incubó a 16 °C durante 4 horas (ver material y métodos). Los plásmidos ligados se transformaron en células competentes de la cepa HB101 de *E. coli* (material y métodos), las colonias se seleccionaron en LB con espectinomomicina y tetraciclina (resistencia del interposón y del vehículo respectivamente). De esas colonias se extrajo y digirió el DNA de plásmido para comparar su patrón de restricción con el del plásmido sin mutagenizar, se seleccionaron las colonias cuyo patrón de restricción es igual al del plásmido mas la banda correspondiente al fragmento omega.

Los plásmidos pMGD4- Ω y pMGD4.3- Ω se introdujeron por conjugación en la mutante LM01 mediante un cruce triparental (material y métodos), luego de su selección y aislamiento del medio PY Nal, Tc, Sp, que selecciona bacterias de *R. etli* con el plásmido y el fragmento omega, se buscó su fenotipo de utilización de glutamina en caja, todos los plásmidos pMGD4- Ω complementaban a la mutante por lo que la inserción estaba en un sitio distinto al que interrumpe el *locus* responsable de la complementación. De los plásmidos pMGD4.3- Ω que están en la mutante LM01 de *R. etli* algunos complementan mientras otros no complementan a la mutante, se hizo digestión total de estos plásmidos con la enzima BamHI y se encontró que los plásmidos que no complementan tienen un patrón distinto a los que complementan, permitiéndonos tener no solo la caracterización por fenotipo sino por patrón de restricción. Selecciona uno de los plásmidos que no complementan y que tiene el

mismo patrón que otros que tampoco lo hacen y se denominó pMGD4 3- Ω -14. Los patrones de restricción se muestran en las figuras 8 y 9, en estas figuras están los patrones de restricción del plásmido pMGD4 3, del plásmido pMW157 que es fuente del fragmento omega, de uno de los plásmidos mutagenizados que complementa a la mutante (pMGD4 3- Ω -112) y del plásmido que ya no complementa a la mutante pMGD4 3- Ω -14, en la figura 8 se observa que los plásmidos tienen ya el fragmento omega, mientras que en la figura 9 se puede observar el patrón distinto al cortar con BamHI de un plásmido que complementa y del que no complementa la mutación

Patrones de restricción EcoRI de los plásmidos pMGD4.3:: Ω



Figura 8. 1: marcador de peso molecular, 2: pMW157, 3: pMGD4 3- Ω -14, 4: pMGD4.3- Ω -112, 5: pMGD4.3.

Patrones de restricción BamHI de los plásmidos pMGD4 3- Ω

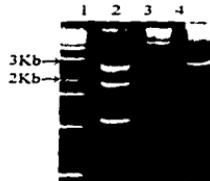


Figura 9. 1: marcador de peso molecular, 2: pMW157, 3: pMGD4 3- Ω -14, 4: pMGD4.3- Ω -112.

Se hicieron curvas de crecimiento de las cepas con los plásmidos mutagenizados para conocer su comportamiento en todos los medios seleccionados, en la figura 10 se puede apreciar que la mutación ya no se complementa a excepción de la condición medio mínimo amonio succinato, lo que indica que se mutagenizó el locus que complementa a la mutante LM01 de *R. etli* en su incapacidad de utilizar a los aminoácidos glutamina y glutamato como fuentes únicas de carbono y nitrógeno, y como fuentes de nitrógeno, además de la posibilidad de la existencia de otro gene involucrado en la complementación de la mutante en la condición medio mínimo amonio-succinato.

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA MUTANTE LM01 DE *R. etli* COMPLEMENTADA

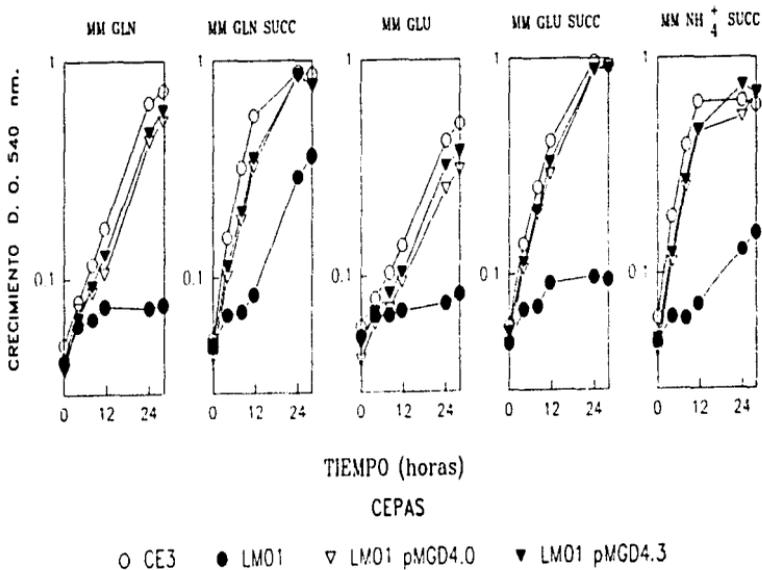


Figura 1. símbolos: gln; glutamina, glu; glutamato, succ; succinato

CURVAS DE CRECIMIENTO
Medio Mínimo glucosa amonio

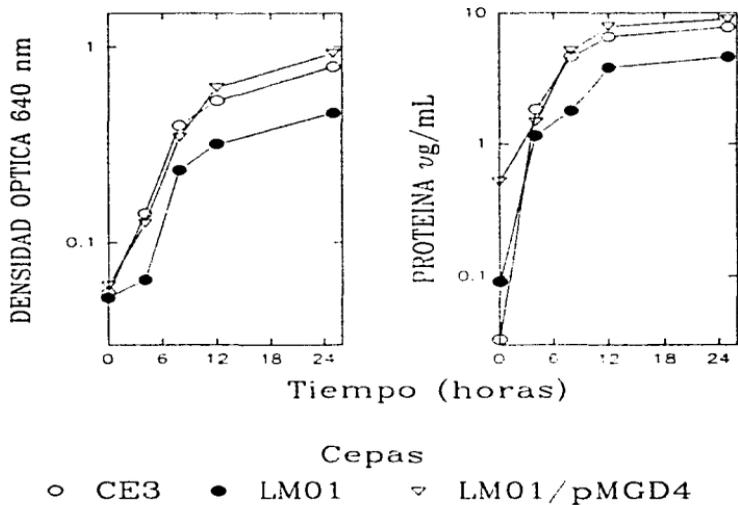


Figura 2

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA MUTANTE LM01 DE *R. etli* COMPLEMENTADA
 CON LAS DOS SUBCLONAS DEL PLASMIDO pMGD4.3

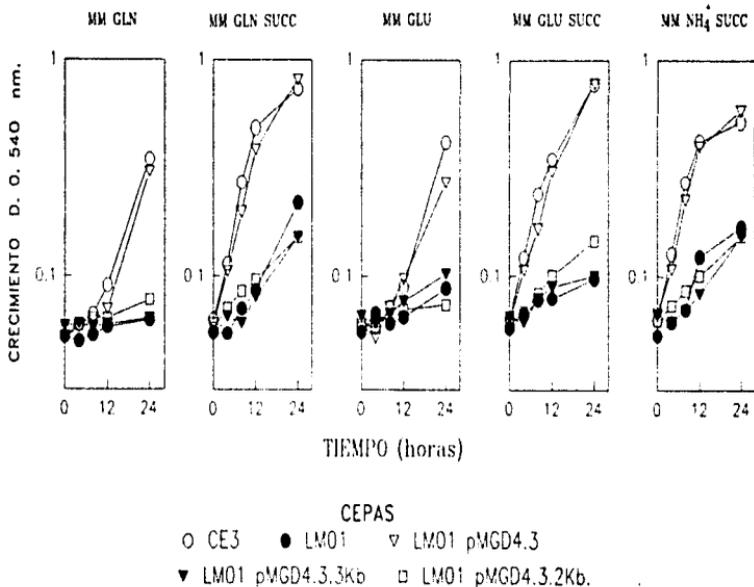


Figura 6

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA MUTANTE LM01 COMPLEMENTADA CON
EL PLASMIDO pMGD 4.3 MUTAGENIZADO

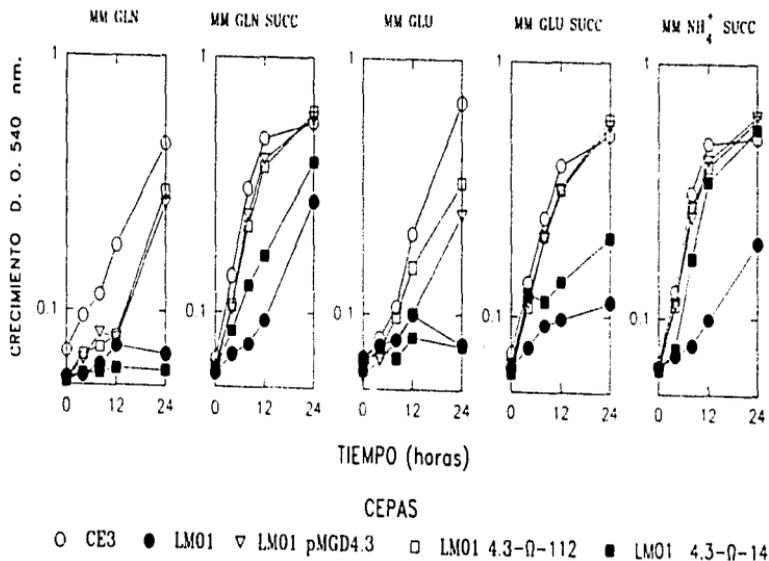


Figura 10

DISCUSIÓN

Por cuanto respecta a la mutación del *locus* con el transposon es claro que el transposón Tn5 tiene preferencia a insertarse en el vector del plásmido pMGD4, puesto que si consideramos únicamente el tamaño del vector y del inserto para calcular la probabilidad de inserción del elemento en la secuencia del inserto, llegaríamos a que cerca del 40 % de los transposones insertados deberían estar en el material genético de *R. etli* que lleva el plásmido porque pesa 18 Kb contra 24 Kb del vehículo, con este mismo razonamiento era probable que cerca de un 10 % de los plásmidos Km, Tc resistentes tuvieran al transposon en los fragmentos de restricción de interés; cabe apuntar que el transposón Tn 5 porque se utilizara un transposon que se inserta sin la necesidad de la existencia de una secuencia específica (17, 61) Para comprobar si el transposón encontró un sitio de inserción "caliente"; es decir, si se insertó en mayor proporción en un solo sitio, se necesitaría digerir una mezcla de plásmidos con una enzima que corte al transposon como *HindIII*, y separar la digestión mediante electroforesis, si hay bandas mucho más intensas que otras, hay sitio de predilección, sin embargo no fue objetivo de este trabajo conocerlo.

Luego de trabajar con los plásmidos pMGD4 y pMGD4 3 para insertar en ellos el fragmento omega de resistencia a espectinomicina solo obtuvimos el plásmido mutagenizado derivado del pMGD4 3, además de que era más probable obtener la inserción en este plásmido porque tiene solo 3 sitios de corte, los plásmidos pequeños funcionan mejor en las transformaciones, efecto que se observó claramente cuando se obtenían células transformadas de uno y otro plásmido con cantidades equivalente o aún superiores del pMGD4.

El plásmido obtenido ya no complementa la utilización de glutamato y glutamina como fuentes únicas de nitrógeno y carbono, y como fuentes de nitrógeno de la mutante LM01 de *R. etli*, sin embargo continua complementándola en la condición medio mínimo-succinato, lo que implica la posibilidad de que la complementación del fenotipo de la mutante LM01 de *R. etli* sea debida a los productos de más de un gen, pues el plásmido pMGD4 3 luego de una mutagenesis continúa complementando una parte del fenotipo, esta situación puede ser debida a que para complementar la mutación en la condición medio mínimo-succinato, se necesite de la presencia de los productos de genes de ambos fragmentos de restricción del plásmido pMGD4 3 y por ello no complementan por separado pero si cuando están presentes ambos, para que esta posibilidad se presente tendría que existir un promotor en el fragmento que se transcribe después del fragmento omega o bien que los terminadores de la transcripción del fragmento omega no sean útiles en *R. etli*. El plásmido mutagenizado puede ser utilizado en una eventual recombinación con un genoma silvestre de la bacteria; para esta recombinación el plásmido cuenta con 2 y 3 Kb de material homólogo a cada lado del inserto, que bien podría resultar en una eficiente recombinación.

El plásmido mutagenizado puede secuenciarse de los extremos del fragmento omega para obtener la secuencia del *locus* que complementa a la mutante LM01 de *R. etli*, hacerlo de esta forma tiene la ventaja sobre secuenciar el plásmido sin mutagenizar de que se pueden usar iniciadores de la transcripción "primer" más grandes y por lo tanto específicos que en el caso de solo un sitio para *EcoRI*, por otro parte no sería necesaria la clonación en otro vector del inserto del plásmido pMGD4.3 que sería necesaria para eliminar los sitios de restricción *EcoRI* del extremo del inserto, pues dejarlos dificultaría iniciar la secuenciación en el sitio correcto.

Es probable que el plásmido pMGD4 3 tenga en su inserto una secuencia que codifique para un regulador o reguladores del metabolismo de *Rizobium etli*, pues complementa un fenotipo pleiotrópico (por mutación única o múltiple) que involucra funciones de vida libre y de simbiosis de

la bacteria, de las que hasta ahora no se conoce una regulación unificadora; este razonamiento, y el hecho de que el plásmido mutagenizado obtenido complementa una de las condiciones estudiadas nos decidió a no continuar buscando otras enzimas con las que se pudiera subclonar al plásmido pMGD4.3 una vez que encontramos que los fragmentos de restricción con EcoRI no complementan por separado la mutación (representaría una gran ventaja que solo un fragmento complementara la mutación por cuestiones técnicas como evitar secuenciar grandes extensiones de DNA); pues tratándose de una probable secuencia regulatoria la información contenida pudiera tener marcos abiertos de lectura para otras funciones que se regulen al mismo tiempo como utilización de aminoácidos e inicio de la simbiosis, varios promotores que permitan la activación en diversas circunstancias o ser parte de un operón que involucre la utilización de sustratos como fuentes de carbono y energía (no utiliza glutamina ni glutamato como fuente de los dos elementos).

La mutante LM01 deberá seguirse estudiando pues podría determinar la importancia del catabolismo de los aminoácidos glutamato y glutamina en la vida libre y en la simbiosis de la bacteria con la plantas del frijol; el plásmido producido sin duda es de utilidad para tales propósitos pues aclarará la naturaleza de la mutación al obtenerse una nueva mutante a partir de él; las posibilidades que se presentan en un futuro son varias, entre otras:

Que una vez que se obtenga la mutante sea igual a la LM01, situación que por sencilla sería deseable para quien realice tal trabajo. Con dicha situación se estaría ante la presencia de la mutación de un elemento muy importante para la bacteria.

Que la mutante sea solo parcialmente igual, situación en la que se habría de explicar porque se complementa con el elemento mutagenizado.

La determinación de la secuencia y la posible aclaración de la naturaleza de la función involucrada o el aumento de una secuencia de función desconocida en los bancos de información hasta la aclaración fisiológica del problema.

CONCLUSIONES

Se logró subclonar al plásmido pMGD4.3, sin embargo ninguna de las subclonas representa la mínima expresión de información que complementa a la mutante LM01 de *Rhizobium etli*.

El locus que complementa a la mutante LM01 de *R. etli* tiene un sitio de restricción para la enzima EcoRI que puede ser utilizado para su secuenciación.

Se mutagenizó el locus que complementa a la mutante LM01 de *R. etli* produciéndose un plásmido que ya no la complementa en la utilización de los aminoácidos glutamato y glutamina como fuentes únicas de carbono y nitrógeno, y como fuentes de nitrógeno, pero si la complementa en la condición medio mínimo-succinato. este plásmido puede ser utilizado en la caracterización de dicha mutante.

BIBLIOGRAFIA

1. Atlas, Ronald M. Microbiology: Fundamental and applications. 2^a ed. Macmillan Publishing Company. New York. 1989. pp 381.
2. Baev, Nodelcho et al. (1992) The expression of the nodD and nodABC genes of *Rhizobium leguminosarum* is not regulated in response to combined nitrogen. FEMSLE 97 205-208.
3. Bergensen, F. F., Turner, G. L. (1988). Glutamate as a carbon source for N₂ fixing bacteroids prepared from soybean root nodules. J. Gen Microbiol. 134:2441-2448.
4. Boyer, H. B. and Roulland-Dussoix, D (1969) A model of complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41 459-472
5. Brewin, Nicholas J. (1991). Development of the Legume Root Nodule. Annu. Rev. Cell Biol. 7:191-226.
6. Brock, Thomas D., Smith, David, Madigan, Michel T. Microbiologia. 4^a de, Prentice Hall, México 1987. pp 457-462.
7. Burris, H. Roberts. Nitrogenases. J. Biol Chem. 266:9339-9342.
8. Calderón, J., and Mora J. (1985) Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. J. Gen Microbiol. 131:3237-3242.
9. Calderón, J., Cooper, A. J., et al. (1989). N¹⁵ isotope studies of glutamina assimilation pathways in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 171:1772-1774.
10. Calderón J. Resultados sin publicar.
11. Cárdenas, Luis., et. al. (1995). Isolation, Chemical structures and biological activity of the lipochitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. Plant Mol Biol. 29.453-464.

12. Dakora, F. D., Joseph, C. M., Phillips, D. A. (1993). Plant Physiology, 97: 759-764.
13. Dakora, F. D., Joseph, C. M., Phillips, D. A. (1993). Plant Microbe Interaction 6: 665-668.
14. Dénarié, Jean , Cullimore, Julie (1993) Lipo-Oligosaccharide Nodulation Factor. A Minireview New Class of Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. Cell, 74: 951-954.
15. Dénarié, Jean , et. al (1993). *Rhizobium* and legume nodulation: a molecular dialogue. en Palacios et. al. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Press Publisher pp 19-30
16. Demont, Nathalie., et. al. (1994). The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factor N-acylated by (W-1)-hydroxylated fatty acids. EMBO. Vol 13 9:2139-2149.
17. Ditta, Gary. (1986). Tn5 mapping of *Rhizobium* nitrogen fixation genes. Methods in enzymology. 18:519-528.
18. Donald, A., Phillips and Yoram. (1995). Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. Trends Microbiol. vol 3, 2:58-64.
19. Du Pont, M. Gisela. (1994). Clonación del locus que complementa a una mutante de *Rhizobium phaseoli* alterada en el catabolismo de glutamato y la fijación de nitrógeno. Tesis UNAM, Facultad de Química. (Q.F.B.)
20. Durán, Socorro., Du Pont, Gisela., Huerta-Zepeda, A., Calderón, J. (1995) The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. Microbiol. 141:2883-2889.
21. Durán, Socorro., Calderón Jorge. (1995). The role of the glutamine transaminase-w-amidase pathway and glutamine degradation in *Rhizobium etli*. Microbiol. 141:589-595.

22. Durán, Socorro, Luis Sánchez-Linares, Alejandro Huerta-Saquero, Gisela Du Pont, Alejandra Huerta-Zepeda y Jorge Calderón (1996) Identification of Two glutaminases in *Rhizobium etli*. *Biochem. Gen* 34 453-465
23. Dusha, Iona, et al (1989) The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (nodABC) are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol Gen Genet* 219 89-96
24. Dusha, I., Kondorosi, Adam (1993) Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 240 435-444
25. Earhard, D W., Atkinson, E. M. and Long, S. R. (1992). *Science*, 256 998-1000
26. Fisher, Hans-Martin (1994) Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58:352-386
27. Flores, Samaniego, Olivera, B., González, Alicia (1993) Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 175(23) 7705-7706
28. Friedman, Alan M., Long, Sharon R., et al (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18 289-296
29. Kanh, et al (1985) A model for nutrient exchange in the *Rhizobium* legume symbiosis. *En Nitrogen fixation Research Progress*, De Evans, H. J., Bottomley P. J. Newton W. J. Martinuss Nijhoff, pp 193-199.
30. Krieg, Noel R. editor. *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Williams and Wilkins, London 1984. pp 235.
31. Halper, Y, S (1988) Control of transport and utilization of nitrogen sources in bacteria. In *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*. pp 21-59. edited by Sánchez-Esquivel S. Boca Raton. CRC Press.

32. Hardy, R. W., Havelka U. D. (1976) Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis in soybean. En symbiotic nitrogen fixation in plants. Vol. 1. International biology program series. De. Nutman, P. S., Cambridge University Press. London p 421-439.
33. Hennecke, Hauke. (1990) Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum* soybean symbiosis. FEBS. 268, 2 422-426.
34. Hennecke, Hauke. (1993) The role of respiration in symbiotic nitrogen fixation. en Palacios et al. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Press Publisher. pp 55-64.
35. Inoue, Hiroaki, Nojima, Hiroshi, Okayama, Hiroto. (1990) High efficient transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96 23-28.
36. Kim, Jongsun, Rees, Douglas C., (1994) Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. Biochem, 33.
37. Kouchi, Hiroshi, Fukai, Katsuhiko, Kihara, Akihiro. (1991) Metabolism of glutamate and aspartate in bacteroids isolated from soybean root nodules. J Gen Microbiol. 137 2901-2910.
38. Leigh, J. A., and Coplin, D. L. (1992) Ann rev Microbiol. 46 307-346.
39. Long, Sharon R. (1989) Rhizobium-Legume Nodulation. Life Together in the Underground. Cell 203-2144.
40. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. O. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
41. Martinez-Romero, Esperanza, Caballero-Mellado, Jesus, (1996). *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. Critical Reviews in Plant Sciences. 15. 113-140.

42. Mendoza, Alberto, et. al. The Enhancement of Ammonium Assimilation in *Rhizobium etli* Prevents Nodulation of *Phaseolus vulgaris*. MPMI 8:584-592.
43. Merrick, M. J., (1993). Organization and regulation of nitrogen fixation genes. en Palacios et al. New Horizons in Nitrogen Fixation Kluwer Academic Press Publisher pp 43-54.
44. Mora, J. (1990). Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. Microbiol Rev 54:293-304.
45. Newton, William E, (1993) Nitrogenases: distribution, composition, structure and function. en Palacios et al. New Horizons in Nitrogen Fixation Kluwer Academic Press Publisher pp 5-18.
46. Paul, E. A.; Clark, F. E. Soil microbiology and biochemistry. Academic press inc. USA 1989. capitulos 6 y 10.
47. Patriarca, E. J., et. al (1993). The *ntfBC* genes of *Rhizobium leguminosarum* are part of a complex operon subject to negative regulation. Mol Microbiol 9: 569-577.
48. Poupot, Rémy, et al. (1993) Nodulation Factors from *Rhizobium tropici* Are Sulfated or Nonsulfated Chitopentasaccharides Containing an N-Methyl-N'-acetylglucosaminyl Terminus. Biochem. 32:10430-10435.
49. Prentki, H., Krisch, M., (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29:303-313.
50. Prent, S. (1993). Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants? en Palacios et al. (eds), New Horizons in Nitrogen Fixation Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
51. Raghanvendra, Julini., Cooper, James., (1994) Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. J Bacteriol. vol 176: 17 5409-5413.

52. Rastogi, Vipin K., Watson, Robert J., (1991). Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic fixation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 173:2879-2887
53. Recourt, Kees, et. al. (1989) Accumulation of a nod Gene Inducer, the Flavonoid Naringenin, in the Cytoplasmic Membrane of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* Is Caused by the pH-Dependent Hydrophobicity of Naringenin. *J. Bacteriol.* 171:4370-4377.
54. Reli'c, B., et. al. (1994) Nod Factor of *Rhizobium* are a Key to the Legume Door. *Molecular Microbiol.* 13:171-178.
55. Rees, Douglas C., et. al. Structures and Functions of the Nitrogenase Proteins, in Palacios, R. et. al. *Horizons in Nitrogen Fixation*, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 1993 pp 83-88
56. Reults, Bradley L., et al. (1995). Suppression of the Fix phenotype of *Rhizobium meliloti*, exoB mutants by LpaZ is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* Vol 177 15:4289-4296.
57. Ronson, Clive W., et. al (1987). *Rhizobium meliloti* nra (rhoN) gene is required for diverse Metabolic Functions. *J. Bacteriol.* 169:2424-2431.
58. Salminen, S. O., Stroeter, J. G., (1987) Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 169:495-499.
59. Schultze, Michael, Kondorosi, Ádám (1995). What Makes Nodulation signals host-plant specific?, *Trends. Microbiol.*, 3: 370-373.
60. Segovia, L., Young, P. W., Martinez-Romero E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
61. Simon, R. (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the "in vivo" constructed Tn5-mob transposon. *Mol and Gen. Genet.* 196:413-420

62. Stadtman, E. R. (1973). Note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. in *The enzymes of glutamine Metabolism*. edited By. Prusiner S. and Stadtman R. Academic Publisher, New York. pp 1-6.
63. Vijn, Irma. et. al. (1993) Nod Factor and Nodulation in Plants, *Science*, 260:1764-1765.
64. Wang , Shui-Ping , Stacey, Gary. (1990) . Ammonia regulation of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Gen Genet.* 223:329-331.
65. Yarosh, O. K., Charles, T.C., and Finan, T.M. (1989). Analysis of C₂-dicarboxylate transpot genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 3(6):813-823.