

030628
24.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

**“ AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA REGION REPLICADORA
DEL PLASMIDO SIMBIOTICO DE *Rhizobium etli*, CEPA CFN42 “**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL RAMIREZ ROMERO

Cuernavaca, Morelos

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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, bajo la dirección del Dr. José Guillermo Dávila Ramos

Para el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM

A mi papá, quien me enseñó a seguir siempre adelante

A mi mamá, pues su amor que no conoce distancias

**A mis hermanos Ricardo, Eduardo, Arturo y Armando,
por su humildad y valentía**

A Yadira, quien le da vida a este inmenso amor

**A Juan, Carmen, Joel, Mamis, Fabiola, Genaro,
Sergio, Gamma y José, con quienes comparto
la más profunda amistad**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Guillermo Dávila Ramos por el apoyo recibido y por la confianza que deposito en mí para que llevara a cabo este trabajo.

Así mismo, quiero extender mi más entusiasta reconocimiento al Dr. David Romero por ofrecerme siempre su ayuda desinteresada, su enorme paciencia, su intensa amistad, y por compartir su filosofía de la vida. Sinceramente, ¡ GRACIAS !.

Hago extensivo mi agradecimiento a las Dras. Esperanza Martínez, Alejandra Covarrubias, al Dr. Xavier Soberón, y nuevamente al Dr. David Romero por sus atinadas observaciones durante la revisión de esta tesis.

Agradezco también al Dr. Miguel Angel Cevallos, a la Dra. Ma. de Lourdes Girard, al Dr. Patrick Mavinguí y al Dr. Jaime Martínez por su paciencia y disposición durante la discusión de este trabajo.

También quiero agradecer a mi amiga Adriana Corvera, a mi amigo Charly y a mi compañera Alma Córdova por su ayuda durante la realización de la parte burocrática de este trabajo.

Finalmente, agradezco el valioso apoyo que me brindaron José, Sergio, Paty, Gamma, Lupita, Araceli y Jesús en " todo ". " Muchas gracias amigos ".

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1. Origen de Replicación	3
2.2. Fijación Biológica del Nitrógeno	8
3. ANTECEDENTES	9
4. OBJETIVOS	10
5. MATERIAL Y METODO	
5.1. Cepas utilizadas	11
5.2. Plásmidos empleados	13
5.3. Condiciones de crecimiento de los microorganismos	15
5.4. Conjugación Bacteriana	15
5.5. Transformación Genética	16
5.6. Estabilidad de Plásmidos	16
5.7. Purificación de DNA total	17
5.8. Purificación de DNA plasmídico por Lisis Alcalina	17
5.9. Restricción de DNA mediante endonucleasas	18
5.10. Técnica de DNA recombinante	18
5.11. Obtención de patrones plasmídicos mediante la Técnica de Eckhardt Horizontal	18
5.12. Transferencia del DNA a filtros de Nylon	19
5.13. Marcado Radiactivo del DNA	20
5.14. Southern Blot	20
5.15. Determinación del número de copias de plásmidos	21
5.16. Secuenciación automática de DNA	21
5.17. Análisis de la Secuencia de DNA	22
6. RESULTADOS	
6.1. Obtención de la genoteca del pSim movilizable por conjugación	23
6.2. Construcción de las cepas <i>recA</i> -	25
6.3. Selección del cointegrado que porta a la región replicadora del pSim de CFN42	26
6.4. Subclonación de la región replicadora del pSim de CFN42	28
6.5. Estabilidad de las clonas que se comportaron como replicones en <i>Rhizobium etli</i>	30
6.6. Evaluación del número de copias del pSim y de pH3	32
6.7. Obtención de la secuencia de pHY	33
6.8. Análisis de la secuencia de pHY	33
6.9. Análisis de las posibles proteínas codificadas por pHY	40
6.10. Análisis de la presencia de regiones replicadoras similares a la del pSim de CFN42 en otras cepas del género <i>Rhizobium</i>	45
7. DISCUSION	47
8. CONCLUSIONES	56
9. REFERENCIAS	57
10. APENDICES	
10.1. APENDICE I: Preparación de medios de cultivo	63
10.2. APENDICE II: Preparación de los reactivos para conjugación bacteriana	64
10.3. APENDICE III: Preparación de los reactivos para transformación genética	64
10.4. APENDICE IV: Preparación de los reactivos para purificación de DNA total	64
10.5. APENDICE V: Preparación de los reactivos para purificación de DNA plasmídico	65
10.6. APENDICE VI: Preparación de los reactivos para electroforesis de DNA	65
10.7. APENDICE VII: Preparación de los reactivos para Eckhardt horizontal	65
10.8. APENDICE VIII: Preparación de los reactivos para southern blot	66

RESUMEN

La región del DNA responsable de la replicación esta formada por un sitio en el que da comienzo la síntesis del DNA, conocido como origen de replicación (**ori**), y por los elementos que controlan el inicio de la replicación, la partición y el número de copias del replicón. Esta región es indispensable para el replicón y ha sido estudiada en cromosomas y plásmidos pertenecientes a diversos géneros bacterianos sin embargo, para el caso del género *Rhizobium*, solo 5 regiones replicadoras han sido identificadas y ninguna corresponde a plásmidos simbióticos (**pSim**). Dada la importancia que tiene la región replicadora del DNA para el mantenimiento del replicón en la población celular, el presente trabajo se desarrolló con la finalidad de aislar y caracterizar la región replicadora con el **ori** del **pSim** de la cepa CFN42 de *Rhizobium etli*.

Para lograr este objetivo, se clonó la menor secuencia de replicación autónoma del **pSim**. La clona obtenida (pH3) mide 5.6 kb y contiene todos los elementos necesarios para la replicación, el control del número de copias, la incompatibilidad y algunos de los elementos relacionados con la estabilidad del plásmido simbiótico.

La caracterización de las funciones de replicación de pH3 demostró que el número de copias es de 1 a 2, similar al del **pSim** y que la estabilidad de pH3 es muy alta, encontrándose un porcentaje de pérdida por generación menor al 0.01 %.

El análisis de la secuencia de pH3 mostró la presencia de 3 marcos de lectura abierta que codifican para 3 proteínas relacionadas con la replicación, llamadas RepA, B y C, presentando una alta identidad (mayor al 70 %) con las proteínas Rep de *Agrobacterium rhizogenes*. Adicionalmente, en una zona no codificante que es rica en AT, localizada río abajo del extremo 3' de *repC*, se encontró una secuencia 89 % idéntica al consenso del **oriT** del plásmido pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta secuencia está rodeada por 6 secuencias GATC y por 8 directas repetidas ricas en GC. La presencia de estos elementos señalan que en esta zona puede encontrarse el **ori** del **pSim**, aunque aún no contamos con evidencia funcional que lo demuestre.

El análisis evolutivo de las proteínas Rep de Rhizobiaceas relacionan a Rep A, B y C del **pSim** de CFN42 con las mismas proteínas de *Agrobacterium rhizogenes*, *Rhizobium leguminosarum* y con *Agrobacterium tumefaciens*. Por otra parte, ensayos tipo Southern Blot muestran que en los plásmidos simbióticos de todas las cepas de *Rhizobium etli* examinadas, existen secuencias similares a la región replicadora del **pSim** de CFN42, y que en la cepas pertenecientes a otras especies de *Rhizobium*, solo se encontro señal positiva en un plásmido críptico de *Rhizobium tropici*, cepa CFN299.

Finalmente, la información generada describe por primera vez el aislamiento y la caracterización molecular de la mínima región de replicación autónoma de un plásmido simbiótico

INTRODUCCION

La división celular es uno de los eventos más importantes en la vida de los organismos, debido a que asegura la transmisión, de una generación a otra, de la información genética. En condiciones óptimas, dos terceras partes del ciclo de vida de cualquier microorganismo están relacionadas con la división celular y tal función, solo se lleva a cabo si el DNA se ha replicado (Alberts, B., et al., 1989).

El proceso mediante el cual una molécula de DNA se duplica en dos moléculas con la misma cantidad y calidad de información que la original se define como replicación del DNA (Lehninger, A. L., 1978). A su vez, cualquier molécula capaz de replicarse de manera autónoma constituye un replicón (Lewin, B., 1994).

La replicación genética presenta varias características, entre las principales tenemos: a) control de la frecuencia de inicio de la replicación; b) fidelidad en el proceso de copia; c) capacidad de corregir errores; d) coordinación de la replicación con la división celular; e) mecanismos que aseguren su segregación a células independientes; f) control del número de copias del replicón, etc (Watson, J. D., et al., 1987). Para cumplir con estas condiciones, una serie de enzimas han evolucionado trabajando en conjunto desapareando, replicando y corrigiendo posibles errores. Estos eventos comienzan en un sitio particular del DNA, llamado origen de replicación (**ori**) (Mathews, Ch. K. y van Holde, K. E., 1990).

Un **ori** es una secuencia indispensable para el replicón pues sin él, no hay posibilidad de perpetuar la información contenida en éste. Se ha observado que alrededor del **ori** se agrupan los elementos que controlan la frecuencia de inicio de la replicación, el número de copias del replicón, y en ocasiones los elementos responsables de la partición, formando una región encargada de la replicación del DNA (Willetts, N., 1985).

El **ori** juega un papel central durante la replicación del DNA. Diversos estudios llevados a cabo con enterobacterias señalan que para este grupo de organismos, existen tres tipos de **ori** que difieren en el número y disposición de elementos estructurales. Tal clasificación agrupa a los **ori's** conocidos como tipo **oriC** de *Escherichia coli*, **oriC** de *Pseudomonas aeruginosa* y **oriC** de *Bacillus subtilis* (Cleary, J. M., et al., 1982; Yoshikawa, H. y Ogasawara, N., 1991).

Por otra parte, debe destacarse que existe gran cantidad de información relacionada con la estructura y función de **ori's** enterobacterianos, mientras que otros tipos de **ori** son poco conocidos. Dada esta limitante, la mayoría de la información que aquí se presenta esta referida a enterobacterias. Una breve descripción de los conocimientos actuales se presenta a continuación.

ORIGEN DE REPLICACION

Como se mencionó con anterioridad, la replicación comienza en una secuencia muy específica del replicón conocida como origen de replicación (**ori**). Se sabe que para el caso de bacterias, el número de **ori**'s que pueden coexistir en una misma molécula de DNA varía de 1 a 3; sin embargo, uno de ellos se usa preferencialmente (Inuzuka, N., Inuzuka, M. y Helinski, D. R., 1980; Perlman, D. y Rownd, R. H., 1976). Mutaciones en los **ori**'s de diferentes plásmidos impiden su replicación (Linder, P. G., Churchwaed, G. y Caro, L., 1983), y es aceptado que el control del inicio de los eventos de replicación se localiza en este sitio, a nivel de la interacción entre el **ori** y las proteínas de inicio de la replicación (Kües, U. y Stahl, U., 1989). Por otra parte, el modo de reproducción del replicón depende de la naturaleza de las interacciones que ocurren en el **ori** durante el inicio de la replicación (Lewin, B., 1994).

Un **ori** es una región formada por zonas de secuencia constante y separadas por segmentos de tamaño definido en el que el orden de los nucleótidos es variable. Las regiones de secuencia constante son sitios de unión a proteínas (Fuller, R. S., Funell, B. E. y Kornberg, A., 1984).

Hasta el año de 1995, las secuencias reportadas en el GenBank relacionadas con un **ori** bacteriano sumaban 78. El análisis de las secuencias relacionadas con **ori**'s cromosomales demostró que estas regiones comparten las siguientes características: a) zonas ricas en Adenina (A) y Timina (T) de entre 12 y 16 nucleótidos de largo, las cuales contribuyen a la replicación sirviendo como el lugar en donde se desestabiliza la doble cadena de DNA (Singer, M. y Berg, P., 1991); b) secuencias de unión a las proteínas de inicio de la replicación, las cuales tienen un tamaño que varía entre 7 y 13 nucleótidos de largo y sirven de blanco a proteínas que desestabilizan la doble cadena de DNA lo que facilita su desdoblamiento (McEachern, M. J. Filutowicz, M. y Helinski, D. R., 1985); y c) secuencias de regulación del inicio de la replicación, que miden de 16 a 22 nucleótidos y también son ricas en A y T (Bramhill, D. y Kornberg, A., 1988).

Adicionalmente, muchos **ori**'s poseen varias secuencias GATC que son el blanco para la acción de la enzima Dam, encargada de la metilación del DNA (Hiraga, S., 1993). En este tipo de **oris**'s, la metilación de las secuencias GATC contribuye al control del inicio de la replicación (Campbell, J. L. y Kleckner, N., 1990).

La organización estructural de los **ori** conocidos sigue un patrón similar al que presenta el **oriC** de *Escherichia coli*. Este locus mide 245 pb y presenta los siguientes elementos: a) cuatro secuencias repetidas directas e invertidas (R1-R4) ricas en A y T de 9 nucleótidos de largo (nonámeros), cuyo consenso es: TTAT(C/A)CA(C/A)A; b) tres secuencias repetidas directas de 13 nucleótidos de largo (tridecámeros, posicionalmente identificadas como L, M, y R), ricas en A y T cuyo consenso es: GATCTnTTnatTt; y c) once secuencias GATC (Smith, D. W., et al., 1991).

El **oriC** está localizado en el minuto 83.5 del cromosoma de *Escherichia coli* y se encuentra delimitado por el tridecámero L y por el nonúmero R4. Su organización (Figura 1) presenta a los tres tridecámeros situados en tandem en el extremo 5' del **oriC**. El tridecámero L esta separado del tridecámero M por 3 nucleótidos y éste a su vez del tridecámero R por 2 nucleótidos. Siguiendo al tridecámero R, y separado por 12 nucleótidos se encuentra el nonúmero R1. A 96 residuos de R1 se encuentra R2. Después de R2, a 26 nucleótidos esta R3 y finalmente, a 30 nucleótidos de R3, en el extremo 3' del **oriC** está R4 (Kornberg, A. y Baker, T. A., 1992).

El inicio de la replicación en el **oriC in vitro** (Figura 2), comienza con la interacción de los nonúmeros con varias proteínas DnaA (de 20 a 40 moléculas), mismas que interaccionan de manera cooperativa formando un complejo que constituye el elemento central alrededor del cual el DNA se enrolla (Marczynski, G. T. y Shapiro, L., 1993).

La interacción de DnaA con los nonúmeros provoca el desdoblamiento de la doble cadena a nivel de los tridecámeros (con los que también interactúa DnaA) (Figura 2, Num.1). Simultáneamente, la proteína DnaB interacciona con DnaC formando un complejo (Figura 2, Num.2), que desplaza a DnaA de los tridecámeros para comenzar a desdoblar al DNA. A continuación, DnaB activa a DnaG para que comience con la síntesis del RNA primario necesario para la fase de elongación de la nueva cadena de DNA (Figura 2, Num. 3) (Baker, T. A. y Wickner, S. H., 1992).

En adición a las proteínas mencionadas, la generación de DNA de cadena sencilla es el blanco para la unión de las proteínas SSB, HU e IHF que impiden tanto la renaturalización como el daño a la cadena (Figura 2, Num. 3) (Marians, K. J., 1992).

Por otra parte, además de controlar la frecuencia de inicio de la replicación, muchos **ori's** participan en las funciones de segregación de las cadenas hijas que se encuentran ancladas a la membrana celular (Firshein, W. y Gelman, I., 1981; Kusano, T., et al., 1984). Este anclaje provee de un sitio para localizar la síntesis de DNA y un eventual mecanismo para segregar a las moléculas replicadas, mediante la extensión de la membrana celular (Koch, A. L., et al., 1981).

Se sabe que para el caso del cromosoma de *Streptococcus pneumoniae* y el de *Bacillus subtilis*, el sitio de anclaje a la membrana se localiza dentro del **ori** de estos replicones (Firshein, W., 1972; Laffan, J. y Firshein, W., 1988). Por lo que respecta a *Escherichia coli*, se cuenta con evidencia que señala a dos proteínas de membrana, una de 60 kDa (Jacq, A., et al., 1983) y otra de 10 kDa (Jacq, A., et al., 1989) como candidatas para regular la segregación del cromosoma ya que se unen específicamente al **oriC**. Adicionalmente, la proteína DnaA tiene la capacidad de unirse a la membrana celular por lo que se propone su participación en el control de la segregación del cromosoma (Sekimizu, K., Yung, B. Y. y Kornberg, A., 1988; Siccardi, et al., 1971).

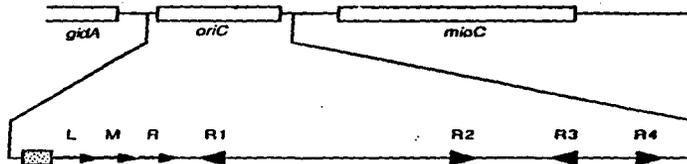


FIGURA 1: Organización estructural del *oriC* de *Escherichia coli* (Tomado de Marians, K. J., 1992).

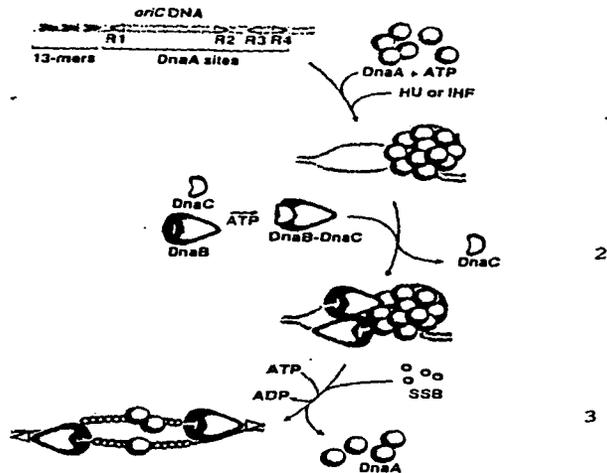


FIGURA 2: Mecanismo mediante el cual, el DNA es desnaturizado durante la replicación (Tomado de Baker, T. A. y Wickner, S. H., 1992).

Finalmente, Ogden y colaboradores han demostrado que cuando el **oriC** se encuentra hemimetilado, éste se une a la membrana, proporcionando así un mecanismo de control del inicio de la replicación (Ogden, G. B., Pratt, M. J. Schaechter, M., 1988), aunque su participación en la segregación no es clara (Norris, V., 1993).

Además del cromosoma, existen plásmidos cuyo número de copias es pequeño (1 a 10 por célula) y cuyos mecanismos de segregación son muy eficientes y se basan en la unión de su **ori**, o de *loci* adyacentes, a la membrana celular. Ejemplos de plásmidos con este tipo de segregación son RK2, RI y pSC101 (Ingmer, H y Cohen, S. N., 1993; Mei, J., Benashski, S. y Firshein, W., 1995).

Por otra parte, una función más asociada al **ori** es la regulación del número de copias. Esta regulación se observa principalmente sobre plásmidos bacterianos y en ocasiones es responsable del fenómeno llamado incompatibilidad.

La incompatibilidad se refiere a la imposibilidad que presentan dos o más replicones para ser heredados establemente en la misma línea celular en ausencia de presión selectiva (Novick, R. P., 1987). Esta incapacidad para coexistir es una consecuencia directa de la presencia de elementos comunes de regulación de la replicación o de la partición (Couturier, M., et al., 1988).

Cuando dos plásmidos poseen los mismos mecanismos de inicio de la replicación, éstos no pueden distinguir entre ambos tipos de replicones y por lo tanto, actúan sobre ellos regulando su número como si se tratara únicamente de uno de ellos. Así, el número de copias será la suma de ambos tipos de replicones (que a su vez, es el mismo que tienen cada replicón por separado). Como la división de la bacteria distribuye al azar a los plásmidos, es probable que haya células hijas con un mayor número de plásmidos de un tipo y, si se considera que estas moléculas son normalmente seleccionadas al azar para servir como sustrato de la replicación (Bazaral, M. y Helinski, D. R., 1970), se deduce que el plásmido con mayor número de copias en una célula dada tendrá mayor probabilidad de ser seleccionado para la replicación en el nuevo ciclo y con ello, eventualmente se diluirán de la población las células que tengan el segundo tipo de replicón (Nordström, K. y Austin, S. J., 1989).

La incompatibilidad puede ser mediada a través del inicio de la replicación o mediante los mecanismos de partición. Para el primer caso, existen dos alternativas: a) Regulación por RNA. Consiste en la síntesis de pequeñas moléculas de RNA que actúan como un transcrito antisentido el cual regula negativamente la replicación del plásmido.

Esta pequeña molécula regulatoria es transcrita de una región que traslapa con la región codificadora para una proteína de iniciación de la replicación (como se presenta en los plásmidos pT181, R1, NR1) o sobre el RNA primero necesario para que dé comienzo la síntesis de DNA

(como se observa en ColE1, RSF1030). Dado que el RNA regulador se expresa en dirección opuesta al transcrito de inicio de la replicación, las dos moléculas pueden hibridizar, limitando así el inicio de la misma (Lewis, K. B. y Helinski, D. R., 1993); b) Regulación por iterones. Un iterón es una secuencia rica en A y T que puede encontrarse en el *ori* o adyacente a éste.

Los iterones son sitios de unión a proteínas de inicio de la replicación y se ha encontrado que los plásmidos regulados por este mecanismo tienen iterones en la región que codifica para su proteína de iniciación. De esta manera, cuando se alcanza cierta concentración intracelular de la proteína, ésta se une a los iterones localizados en la región codificante, lo que impide que la RNA polimerasa transcriba al gen, limitando con ello la cantidad de proteína que da inicio a la replicación (Nordström, K., 1990).

Por lo que respecta a la incompatibilidad mediada por segregación, ésta se establece cuando dos plásmidos usan los mismos sistemas de unión a proteínas de la membrana celular; lo cual produce la segregación aleatoria de los plásmidos y con ello el paulatino desbalance de la distribución de éstos en la población (Austin, S. y Nordström, K., 1990).

Como se puede observar de lo antes expuesto, la clonación y caracterización de la región encargada de la replicación del DNA resulta relevante, pues genera información relacionada con las propiedades básicas del replicón. Aunado a lo anterior, tal información puede contribuir al entendimiento del comportamiento del replicón en la naturaleza, y adquiere mayor interés cuando la región replicadora está asociada a secuencias con funciones metabólicas o ecológicas importantes (i. e. como lo es la fijación biológica del nitrógeno) (Nuti, M. P., et al., 1979).

FIJACION BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

Se denomina fijación biológica del nitrógeno al proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico es reducido enzimáticamente a amoníaco, forma que es asimilada por distintos organismos, de entre los que destacan las plantas (van Kammen, A., 1995).

La habilidad para fijar nitrógeno se encuentra restringida a algunos organismos procariontes, los cuales pueden hacerlo en vida libre (*Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter*, *Rhodospseudomonas*), o en simbiosis con plantas. De los fijadores en simbiosis, los mejor estudiados pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, los cuales tienen la habilidad de inducir la formación de nódulos en las raíces de plantas leguminosas donde las bacterias fijan el nitrógeno, debido a la acción de la enzima nitrogenasa (van Rhijn, P. y Vanderleyden, J., 1995).

De entre los fijadores simbióticos, en nuestro país se han estudiado ampliamente a los pertenecientes a la especie *Rhizobium etli*. Esta bacteria fija nitrógeno en simbiosis con las raíces del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). La cepa CFN42 es la bacteria tipo de la especie de *Rhizobium etli* y se caracteriza por tener seis plásmidos, nombrados como **pa**, **pb**, **pc**, **pd**, **pe** y **pf**, cuyos tamaños varían de 120 a 750 kb (Brom, S., et al., 1991).

Los genes **nod** (responsables de la formación del nódulo) y **nif** (que codifican para la nitrogenasa), se encuentran en el **pd** o plásmido simbiótico (**pSim**).

Las características estructurales del **pSim** fueron dilucidadas por Girard y colaboradores, quienes establecieron el mapa de restricción para la enzima BamHI, determinaron la localización de los genes **nod** y **nif** en este mapa, y fabricaron una genoteca de cósmidos de este plásmido (Girard, M. L., et al., 1991). Por su parte, Romero y colaboradores han estudiado diversos tipos de arreglos los cuales se presentan en el **pSim** a alta frecuencia (Romero, D., et al., 1995), sin embargo, de entre las propiedades de interés que faltan por dilucidarse, destacan la localización y caracterización de la región encargada de la replicación, lo cual contribuye al conocimiento de la organización y dinámica del genoma de *Rhizobium*.

ANTECEDENTES

El primer trabajo en que se reporta la clonación de una región replicadora del género *Rhizobium* fue hecho por Neilan y colaboradores, quienes obtuvieron un segmento de 15 kb a partir del plásmido G1027 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* el cual no fue caracterizado estructuralmente (Neilan, J., Heery, D. y Dunican, L. K., 1986). Posteriormente; Mozo y colaboradores clonaron un segmento de 5.4 kb a partir del plásmido críptico pHc23a de *Rhizobium* sp (*Hedysarum*), cepa UPM-Hc23, el cual se comportaba como una Secuencia de Replicación Autónoma (SRA). Los estudios funcionales de este segmento mostraron que podía replicarse en diversos fondos genéticos de Rhizobiaceas, sin embargo no se obtuvo la secuencia nucleotídica (Mozo, T., Cabrera, E. Ruíz-Argüeso, T., 1990). Para el año de 1993, Margolin, W. y Long, S. R., publicaron la secuencia de un *ori* dispensable presente en el megaplásmido b de *Rhizobium meliloti*. Este *ori* mide 0.8 kb y tiene elementos comunes con el *oriC* de *Escherichia coli*.

En 1994 Mercado-Blanco y Olivares publicaron el aislamiento de una SRA de 4.8 kb proveniente del plásmido no simbiótico pRmeGR4a de *Rhizobium meliloti*, cepa GR4. Dentro de esta secuencia se codifica una proteína esencial para la replicación, llamada RepC; y aún cuando se estudió en detalle, no fué localizado el *ori* de la misma (Mercado-Blanco, y Olivares, J., 1994).

Recientemente, se determinó la secuencia de la región responsable de la replicación del plásmido críptico pRL8JI de *Rhizobium leguminosarum*, cepa 3841 (Turner, S. L. y Young, P. W., 1995). Esta secuencia mide 5.0 kb y codifica para tres proteínas involucradas con la replicación, llamadas RepA, RepB y RepC. La última de estas proteínas está relacionada con el inicio de la replicación en tanto que las dos restantes participan en la estabilidad del plásmido. Cabe señalar que la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas tiene una homología mayor al 35 % con las mismas proteínas codificadas por los plásmidos pTiB6S3 de *Agrobacterium tumefaciens* y pRiA4b de *Agrobacterium rhizogenes*. No obstante el análisis en detalle de esta secuencia, el *ori* no fué definido (Turner, S. L. y Young, P. W., 1995).

Para el caso del *pSim* de CFN42, este se localiza dentro de un segmento de 270 kb que se encuentra delimitado por el operón *nifHDKa* y *nifHDKb*. Dicho segmento es capaz de replicarse autónomamente mientras que las 120 kb restantes no se replican (bandas 1 a 25 del mapa en BamHI del *pSim*) (Romero, D., et al., datos no publicados) (Figura 3).

Dado el desconocimiento que existe sobre los mecanismos de replicación, segregación y control del número de copias de plásmidos de *Rhizobium*, y en particular de plásmidos simbióticos, resulta interesante aislar y caracterizar la región replicadora con el *ori* del *pSim* de CFN42. Esta información puede ser usada en estudios de tipo evolutivo, filogenético, de regulación de la expresión genética, etc.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar la región replicadora del **pSim** de *Rhizobium etli*, cepa CFN42

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar al cósmido del **pSim** de CFN42 que porta al **ori**.
2. Obtener la menor secuencia de replicación autónoma (mSRA) que porta al **ori** del **pSim**.
3. Obtener la secuencia nucleotídica de la mSRA.
4. Deducir la organización estructural de la mSRA.
5. Evaluar la estabilidad de la mSRA.
6. Determinar el número de copias de la mSRA relativo al cromosoma.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS UTILIZADAS

En este trabajo se usaron cepas de *Escherichia coli* y de diferentes especies de *Rhizobium*, cuyas características más sobresalientes se enlistan a continuación:

CEPA	CARACTERISTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
<i>Rhizobium etli</i> :		
CFN42	Seis plásmidos, pSim de 390 kb, Str ^R , Nal ^R	Quinto, C. H., et al., 1985
2001	CFN42 pa-, pd-, Str ^S , Nal ^R , Rif ^R	Leemans, J., et al., 1984
CFNX125	CFN42 pa-, <i>recA</i> -, pd/ <i>nif Hc</i> ::GDYN1, Str ^S , Nal ^R , Rif ^R	Romero, D., et al., 1995
CFNX107	2001 <i>recA</i> ::ΩSp ^R , Str ^S , Nal ^R , Rif ^R	Martínez-Salazar, J., et al., 1991
CFNX101	CFN42 <i>recA</i> ::ΩSp ^R , Str ^R , Nal ^R	Martínez-Salazar, J., et al., 1991
BRA5	Cepa silvestre, nodula <i>Phaseolus vulgaris</i>	Piñero, D., et al., 1988
NITRAGIN8251	Cepa silvestre, nodula <i>Phaseolus vulgaris</i>	Piñero, D., et al., 1988
TAL182	Cepa silvestre, nodula <i>Phaseolus vulgaris</i>	Piñero, D., et al., 1988
VIKING1	Cepa silvestre, nodula <i>Phaseolus vulgaris</i>	Piñero, D., et al., 1988
<i>Rhizobium huakuii</i>		
CCBAU2605	Cepa silvestre, nodula <i>Astragalus sinicus</i>	Novikova, N., no publicado
<i>Rhizobium loti</i>		
CIAM1801	Cepa silvestre, nodula <i>Lotus</i>	Novikova, N., no publicado
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		
VF39	Cepa silvestre, nodula <i>Vicia faba</i>	Hynes, M. F., et al., 1988
<i>Rhizobium tropici</i>		
CFN299	Cepa silvestre, nodula <i>Phaseolus vulgaris</i>	Martínez-Romero, E., et al., 1991

CEPA	CARACTERISTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
<i>Rhizobium meliloti</i> 2011	Cepa silvestre, Sm ^R , nodula alfalfa	Casse, F., et al., 1979
<i>Rhizobium</i> spp. CIAT895	Cepa silvestre, nodula <i>Phaseolus vulgaris</i>	Piñero, D., et al., 1988
<i>Escherichia coli</i> :		
HB101	F-, <i>leu proA2, lacY1, rspL20, recA13</i> , Str ^R	Boyer, H. W., et al., 1969
HB101/cGD7	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD102	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD101	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD28	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD47	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD15	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD35	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD45	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD103	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD180	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD170	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD84	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD51	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD32	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD179	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
HB101/cGD183	Lorist 3B + DNA del pSim de CFN42, Km ^R	Girard, M. L., et al., 1991
S17-1	C600::RP-4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	Simon, R., et al., 1983
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Yanisch - Perron, C., et al., 1985

PLASMIDOS

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
VECTORES DE CLONACION		
pSUP202	mob+, Amp ^R , Cm ^R , Tc ^R , ori de ColE1 (suicida en <i>Rhizobium etli</i>)	Simon, R., et al., 1983
pSUP202:lorist 3B	mob+, Amp ^S , Cm ^R , Tc ^R , ori de ColE1. Inserción de un fragmento Pst de 3.3 kb de Lorist 3B	Girard, M. L., et al., no publicado.
pSK+	Amp ^R , lacZ, ori de ColE1	Short, J. M., et al., 1988
COOPERADORES EN CONJUGACION		
pRK2013	tra+, Km ^R , ori de ColE1	Figurski, D. H., et al., 1979
pRK2073	tra+, Sp ^R , Tc ^R ori de ColE1	Lidstrom, M. E., 1991
OBTENCION DE DOBLES RECOMBINANTES		
pMS26	Vector suicida que acarrea el alelo <i>recA::ΩSp/Sm</i> de <i>Rhizobium etli</i>	Martínez-Salazar, J., et al., 1991
PLASMIDOS OBTENIDOS DE LA CLONACION DE DIFERENTES SEGMENTOS DEL pSim		
pB72	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 3.1 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB73	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 1.1 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB74	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 0.87 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB75	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 4.1 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB76	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 1.4 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB77	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 5.9 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB78	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 2.95 kb subclonada del cGD47	Este trabajo

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
pB79	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 16.8 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pB80	pSUP202/Banda BamH1-BamH1 de 3.6 kb subclonada del cGD47	Este trabajo
pH3	pSUP202/Banda HindIII-HindIII de 5.6 kb subclonada de pB79	Este trabajo
pHY	pSK+/Banda HindIII-HindIII de 5.6 kb subclonada de pB79	Este trabajo
pE2	pSUP202/Banda EcoRI-EcoRI de 0.5 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pE7	pSUP202/Banda EcoRI-EcoRI de 4.0 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pE12	pSUP202/Banda EcoRI-EcoRI de 0.4 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pE15	pSUP202/Banda EcoRI-EcoRI de 0.15 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pXA	pSK+/Banda XhoI-XhoI de 1.4 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pXY	pSK+/Banda XhoI-XhoI de 0.9 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pHX4	pSK+/Banda HindIII-XhoI de 3.3 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pS2	pSK+/Banda Sall-Sall de 0.8 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pS11	pSK+/Banda Sall-Sall de 2.0 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pES3	pSK+/Banda EcoRI-Sall de 0.9 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pES6	pSK+/Banda EcoRI-Sall de 0.4 kb subclonada de pHY	Este trabajo

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
pHP16	pSK+/Banda HindIII-PstI de 0.9 kb subclonada de pHY	Este trabajo
pXP4	pSK+/Banda XhoI-PstI de 2.5 kb subclonada de pHY	Este trabajo

CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Las bacterias usadas se cultivaron tanto en medio sólido como en medio líquido. Siempre que se usó medio sólido, *Escherichia coli* fue cultivada en cajas petri con medio LB a 37 °C, en tanto que *Rhizobium etli* fue cultivada en cajas petri con PY a 30 °C (Apéndice I).

Cuando se usó medio líquido, las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en 3 o 5 ml de LB a 37 °C y 250 rpm (Miller, J. H., 1972); mientras que las cepas de *Rhizobium etli* se cultivaron en 3 o 5 ml de PY a 30 °C y 250 rpm (Noel, K. D., et al., 1984).

CONJUGACION BACTERIANA

Los experimentos de conjugación triparental se hicieron de la siguiente manera:

Las células receptoras, donadoras y cooperadoras fueron mezcladas en proporciones 2:1:1 respectivamente, sembradas por gota en cajas con medio sin selección y cultivadas a 30 °C durante 12 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 1 ml de MgSO₄·7H₂O-Tween 40 y se resuspendieron las células con una varilla de vidrio (Apéndice II). A partir de esta suspensión, se hicieron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻³, plateando 100 µl de cada dilución en los medios y las condiciones de selección apropiadas e incubando el cultivo de 2 a 5 días, hasta la aparición de colonias.

TRANSFORMACION GENETICA DE *Escherichia coli* (Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J., 1982)

Preparación de células competentes.

Un cultivo de 100 ml de células en fase exponencial fue centrifugado 10 min a 6 000 rpm y 4 °C. El botón celular se resuspendió en 20 ml de CaCl₂ 100 mM frío incubando en hielo durante 90 min. La suspensión fue centrifugada 10 min a 6 000 rpm y 4 °C. El botón celular obtenido fue resuspendido en 1 ml de CaCl₂ 100 mM frío y dividido en alcuotas al 25 % de glicerol (v/v) que se almacenaron a - 70 °C hasta su uso (Apéndice III).

Transformación.

Se mezclaron 100 µl de la suspensión de células competentes con 0.5 µg del DNA de interés incubando en hielo por 20 min. La mezcla fue incubada a 42 °C durante 2 min para posteriormente reincubar en hielo 5 min más. Se adicionó 1 ml de medio LB y se mantuvo en cultivo con agitación a 37 °C durante 1 hr. Finalmente, se platearon 250 µl en medio selectivo.

ESTABILIDAD DE PLASMIDOS

Según la técnica reportada por Durland, R. H. y Helinski, D. R., 1987; a partir de un cultivo sin selección de células en fase estacionaria, se hicieron diluciones ajustadas a 0.001 de DO_{620 nm} que se cultivaron por 9 y 18 generaciones. De cada intervalo, se tomó una muestra que se diluyó a 10⁻⁶ plateando en medio sin selección, se tomaron 100 colonias aisladas que se replicaron en medio con selección incubando por 12 hrs. Se calculó el porcentaje de pérdida del plásmido mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de pérdida /generación} = [1-(Fr/Fi)^{1/N}] \times 100$$

donde: Fr = Fracción de células resistentes al antibiótico después de N generaciones

Fi = Fracción inicial de células resistentes al antibiótico

N = Número de generaciones

PURIFICACION DE DNA TOTAL (Adaptada de Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J., 1982)

Un cultivo de células en fase exponencial fué centrifugado 2 min a 10 000 rpm, lavado con 1 ml de TE 50:20 (pH=8.0) y nuevamente centrifugado 2 min a 10 000 rpm. El botón celular fué resuspendido por inversión en una mezcla de 400 µl de TE 50:20 (pH=8.0), 50 µl de pronasa (5 mg/ml) y 50 µl de SDS al 10 % en TE 50:20 (pH=8.0). La suspensión se pasó 3 veces por una jeringa con aguja del # 20 y otras 3 veces por una aguja del # 25, se extrajo 2 veces la fase orgánica con 500 µl de una mezcla de Fenol:Cloroformo:Alcohol Iso-amflico (24:24:1) y se recuperó la fase acuosa por centrifugación durante 10 min a 10 000 rpm y 4 °C. Se lavó 1 vez con 500 µl de cloroformo y se separaron las fases por centrifugación. A la fase acuosa se le adicionó 1 ml de etanol absoluto, se incubó durante 2 hrs a - 20 °C, se centrifugó durante 15 min a 10 000 rpm y 4 °C, se descartó el sobrenadante y el DNA fue secado y resuspendido en 500 µl de TE 50:20 (pH=8.0) y 2 µl de RNAsa. (Apéndice IV).

PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO POR LISIS ALCALINA (Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J., 1982)

A partir de un cultivo de células en fase exponencial, se obtuvo por centrifugación el botón celular y se resuspendió con micropipeta en 200 µl de solución I (Apéndice V), en seguida se adicionaron 200 µl de solución II (preparada justo antes de su uso) y se mezclaron por inversión. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min para adicionar 150 µl de solución III que se mezclaron por inversión. El lisado celular fué centrifugado durante 20 min a 10 000 rpm y 4 °C y al sobrenadante se le aplicaron dos lavados con una mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamflico. La fase acuosa obtenida fué lavada dos veces con una mezcla Cloroformo-Alcohol Isoamflico y el lavado fué mezclado con 1 ml de etanol al 100 %. Se incubó 20 min a 4 °C, se centrifugó 20 min a 10 000 rpm y 4 °C. La pastilla de DNA se lavó 3 veces con 1 ml de etanol al 70 % y se secó durante 10 min en el evaporador SAVANT (Speed Vac SVC100). Finalmente, el DNA se resuspendió en 20 µl de TE 10:1 (pH=8.0) y 1 µl de RNAsa (Apéndice V).

RESTRICCION DE DNA MEDIANTE ENDONUCLEASAS

Se mezclaron de 1 a 10 unidades de la endonucleasa de interés (Amersham, Life Science), con de 0.2 a 1 µg de DNA en solución amortiguadora de restricción al 10 % y se incubó a 37 °C durante 1 hr o siguiendo las especificaciones del fabricante.

TECNICA DE DNA RECOMBINANTE

El DNA de interés y el vector de clonación previamente cortados con la enzima de restricción elegida, se mezclaron en diferentes proporciones (dependiendo del tamaño y concentración en la que se encontraban) y se ligaron con T4 DNA ligasa (Amersham, Life Science) (1 u por 1 µg de DNA en solución amortiguadora para ligación al 10 % del volumen total). La reacción se dejó en incubación durante 16 hrs a 16 °C.

OBTENCION DE PATRONES PLASMIDICOS (>100 Kb) MEDIANTE LA TECNICA DE ECKHARDT HORIZONTAL (Wheatcroft, R., McRae, D. G. y Miller, W., 1990)

Esta técnica se describe en dos partes, la preparación del gel y el tratamiento de la muestra.

Preparación del gel.

Se preparó un gel horizontal al 0.75 % de agarosa en TB 1X. Se colocó el gel en una cámara horizontal para electroforesis y se adicionó TB 1X hasta que este llegó al borde del gel (sin cubrir los pozos). A cada pozo se le adicionaron 25 µl de SDS al 10 %/Xilen-cianol y se recorrió el gel (sin muestra) durante 15 min a 100 V con el ánodo en el extremo opuesto al de una corrida normal. Transcurrido este tiempo, se cubrió el gel con TB 1X y se guardó a 4 °C hasta el momento de usarlo (Apéndice VI).

Tratamiento de la muestra.

Se midió la DO_{620nm} de un cultivo de 3 ml de *Rhizobium etli*. De un cultivo con DO_{620nm} de 0.3, se tomó 1 ml y se centrifugó 3 min a 14 000 rpm. El sobrenadante fué extraído con jeringa y el botón celular se resuspendió en 500 μ l de agua fría. La suspensión celular se añadió a otro tubo que contenía 1 ml de N-laurilsarcosinato al 0.3 %, se centrifugó durante 3 min a 14 000 rpm y se resuspendió en 40 μ l de Ficoll al 20 % en TE. Después de 15 min de incubación en hielo, se adicionaron a cada muestra 10 μ l de solución de lisis, se tomaron 25 μ l de la mezcla y se colocaron en el pozo del gel. Se recorrió 30 min a 40 V y 4 °C para finalmente llevar a cabo la corrida de 8 a 20 hrs a 100 V y 4 °C (Apéndice VII).

TRANSFERENCIA DEL DNA A FILTROS DE NYLON (Southern, E. M., 1975)

Una vez realizada la electroforesis del DNA, los geles fueron lavados dos veces durante 15 min y 4 °C con una solución de HCl al 0.25 M. Enseguida, se hicieron dos lavados de 15 min a 4 °C con una solución de NaOH 0.5 M + NaCl 1.5 M y dos lavados de 30 min a 4 °C con una solución de TRIS 0.5 N + NaCl 1.5 M. Los geles así tratados se colocaron sobre un vidrio y se cubrieron con un filtro de Nylon Hybond-N de 0.45 micras (Amersham, Life Science), previamente humedecido en SSC 6X, seguido de 2 filtros Whatman (previamente humedecidos en SSC 6X), 8 capas de papel absorbente y 1 vidrio. Este procedimiento se repitió sobre la cara posterior del gel y finalmente, se colocó sobre el sistema un frasco con aproximadamente 1 lt de agua y se dejó en esta condición durante 16 hrs. Transcurrido el tiempo, se marcaron los carriles del gel en el papel de nylon y se humedeció en SSC 6X. Por último, los filtros de Nylon fueron secados entre papel absorbente y se colocaron en un horno al vacío durante 2 hrs a 80 °C y 15 lb/in² (Apéndice VIII).

MARCADO DEL DNA SONDA CON [α -³²P]dCTP

Se usó el sistema de marcado Megaprime (Amersham, Life Science) que consiste en adicionar al DNA sonda, 5 μ l de primeros y agua hasta alcanzar un volumen de 50 μ l. La mezcla se desnaturalizó 5 min a 95 °C, se centrifugó 20 seg, se adicionó la solución amortiguadora de marcado, 2 μ l de enzima y agua hasta alcanzar un volumen de 100 μ l. Se centrifugó durante 20 min, se adicionó 5 μ l de [α -³²P]dNTP, se mezclaron gentilmente y se incubó 1 hr a 37 °C. La reacción se detuvo por la adición de 5 μ l de EDTA 0.2 M. Finalmente, se desnaturalizó el DNA sonda 5 min a 95 °C, se incubó 5 min en hielo y se adicionó a los tubos con el DNA a hibridizar.

SOUTHERN BLOT (Southern, E. M., 1975)

Prehibridización.

Se colocaron los filtros en tubos a los que se les añadió 15 ml de solución amortiguadora de hibridización rápida (Amersham, Life Science) y se mantuvo en rotación a 65 °C durante 2 hrs.

Hibridización.

Los tubos con los filtros prehibridizados se dejaron enfriar 10 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó la sonda y se dejó en rotación a 65 °C durante 12 hrs.

Lavado.

Se desechó el líquido de hibridización, se enjuagaron los filtros con 50 ml de SSC 2X + SDS 0.1 % y se lavó durante 15 min en rotación y a temperatura ambiente con esta misma solución. Se hicieron 3 lavados de 30 min a 55 °C y en rotación con SSC 0.1X + SDS 0.1 % y finalmente, se lavó 1 vez durante 15 min a 55 °C y en rotación con SSC 0.1X (Apéndice VIII).

Secado.

Se llevó a cabo en un horno a 55 °C durante 10 min.

Exposición.

Se pegaron los filtros en cuadros de cartulina, se cubrieron con Kleen-pack, se fijaron en un cassette para autorradiografía y sobre estos se colocó una película fotográfica (Kodak X-Omat K XK-1). Se dejó durante un tiempo de exposición variable a -70 °C.

Revelado.

En condiciones de obscuridad, la película fotográfica fue sumergida en solución reveladora durante 1 min, se lavó la película con agua, se sumergió en solución fijadora durante 1 min y se enjuagó al chorro de agua.

DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DE PLASMIDOS

El DNA total de células en fase exponencial fue restringido, sometido a electroforesis y transferido a papel de Nylon. Simultáneamente fueron preparadas dos tipos de sondas, una cromosomal y una plasmídica (mismas que fueron ajustadas tanto por tamaño como por concentración), y usadas en experimentos tipo Southern blot.

La intensidad del revelado fue medida por densitometría usando el sistema de análisis de imágenes de geles QGEL, versión 2.72 (QuantiGel Co.).

SECUENCIACION AUTOMATICA DE DNA

La secuenciación de las distintas clonas de DNA fué realizada por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos fluorados (Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R., 1977) usando el kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems Inc.). Los productos de la reacción de secuencia fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y analizados con un secuenciador automático de DNA modelo 373A (Applied Biosystems Inc.). Las regiones en donde no se pudieron obtener subclonas fueron secuenciadas usando primeros diseñados a partir de la secuencia obtenida y usando el programa computarizado Oligo versión 4.0 (Macintosh National Biosciences, Inc.).

ANALISIS DE LA SECUENCIA DE DNA

La secuencia de nucleótidos fue sometida a los análisis computarizados tipo BLASTN, BLASTX (Altschul, S. F., et al., 1990) y FASTA (Person, W. R. y Lipman, D. J., 1988), del paquete de análisis de secuencia GCG versión 8.0 (Genetics Computer Group Inc.). También se hicieron análisis remotos usando los programas MOTIF (Ogiwara, A., no publicado) y PSORT (Nakai, K. y Kanehisa, M., 1991). La construcción de árboles evolutivos se hizo usando el programa UPGMA (Nei, M., 1987) del paquete GeneWorks versión 2.0 (IntelliGenetics, Inc.). Las bases de datos usadas en la búsqueda de homología fueron GenBank y Swissprot.

RESULTADOS

La estrategia para aislar la región responsable de la replicación del **pSim** se basó en un enfoque funcional que consistió en buscar un fragmento de este plásmido, que clonado en el vector pSUP202 (plásmido mobilizable por conjugación y suicida en *Rhizobium*), fuera capaz de replicarse en el fondo genético de la cepa CFN42. Para lograr este objetivo fué necesario contar con una genoteca del **pSim**, transferir cada plásmido a la cepa de *Rhizobium etli*, y evaluar su presencia a través de la técnica de Eckhardt.

Siguiendo esta estrategia, se usó la colección de cósmidos del **pSim** como genoteca, sin embargo, la transferencia de cada cósmido planteaba dos problemas:

1. Debido a que los cósmidos estaban clonados en el vector Lorist 3B (un plásmido estable en *Escherichia coli*, suicida en *Rhizobium etli*, y que carece del *locus mob*), la transferencia directa por conjugación no era posible.
2. Las bacterias de *Rhizobium etli* son recalcitrantes a la transformación genética.

Adicionalmente, si se usaba a la cepa CFN42 como receptora, tendríamos la posibilidad de que los cósmidos recombinaran con el **pSim** nativo, ya que esta cepa tiene un eficiente sistema de recombinación homóloga mediada por el gene *recA*.

Dadas estas dificultades, se procedió a modificar la genoteca de cósmidos existente para que fuera mobilizable por conjugación, y a construir cepas derivadas de la CFN42 que disminuyeran los eventos de recombinación homóloga (cepas *recA*- ó cepas curadas del **pSim**).

OBTENCION DE LA GENOTECA DEL **pSim** MOVILIZABLE POR CONJUGACION

Con la finalidad de generar plásmidos que fueran transferibles por conjugación, las cepas con los cósmidos cGD47, cGD51, cGD84, cGD15, cGD179, cGD170 y cGD102 fueron transformadas con el DNA del plásmido pSUP202::Lorist 3B (pSUP202: mob+, Tc^R, Cm^R más una banda de PstI de 3.8 kb del Lorist 3B). De esta manera, se esperaba que la amplia zona de homología entre los cósmidos y pSUP202::Lorist 3B sirviera de blanco para la recombinación, evento que conduciría a la formación de cointegrados (cGDx-pSUP202::Lorist 3B).

Siguiendo esta estrategia se obtuvieron los 7 cointegrados deseados a una frecuencia del orden de 10^{-5} . Los plásmidos así fabricados, junto con los 8 ya existentes, formaron la genoteca mobilizable conteniendo la totalidad del **pSim** de la cepa CFN42 (Figura 3).

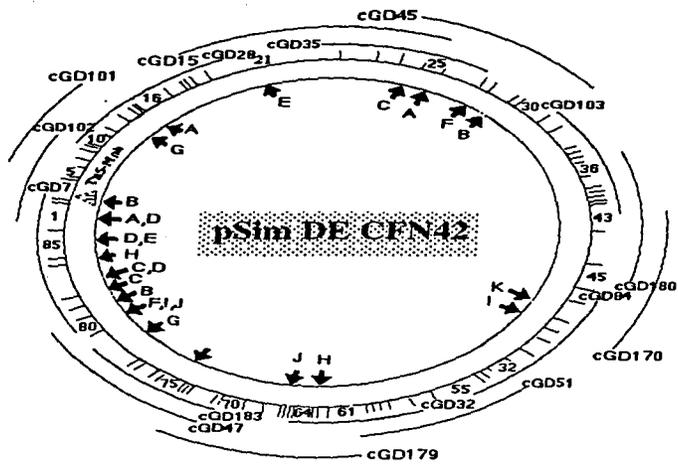


FIGURA 3: MAPA DE COINTEGRADOS DEL pSim DE CFN42

Las flechas internas señalan familias de reiteraciones

CONSTRUCCION DE LAS CEPAS *recA*-

a) OBTENCION DE LA CEPA CFNX107

Para eliminar al máximo los eventos de recombinación homóloga entre los cointegrados y el genoma de CFN42, se construyó una cepa que carece del **pSim**, del **pa** (con el que existen secuencias de homología) y del gene *recA*. Para ello, se cultivó a la cepa CFNX125 (**pa**-, *recA*-, **pd/nifHc::GDYN1**) en medio PY al 10 % en sacarosa. El elemento GDYN1 porta a los genes *sacRB* (que confieren sensibilidad a sacarosa), por lo que si se le hacía crecer en presencia de este azúcar, se esperaba que el **pSim** fuera deletado o curado de la cepa. El evento que se buscó fue este último.

Las colonias que crecieron en estas condiciones fueron clonadas y sometidas a la técnica de Eckhardt, seleccionando aquella que perdió el **pSim**. Finalmente, se realizó una hibridización tipo Southern blot para confirmar la ausencia de este plásmido.

b) OBTENCION DE LA CEPA CFNX101

Con la finalidad de contar con una cepa derivada de la CFN42 que posea una capacidad disminuída para la recombinación homóloga, y que pudiera proporcionar posibles elementos de acción en *trans* para las construcciones usadas, se fabricó la cepa CFNX101 mediante una conjugación biparental entre CFN42 (receptora) y S17-1/pMS26 (donadora). El plásmido pMS26 es suicida en *Rhizobium etli* y porta tanto los genes *sacRB* como al alelo *recA:: Ω Sp/Sm* de *Rhizobium etli*. La selección se realizó en dos etapas, en la primera, se buscó que la zona de homología del plásmido pMS26 recombinara con el gene cromosomal *recA* de la cepa CFN42, seleccionando colonias resistentes a Nal²⁰ y Sp⁵⁰. Las colonias obtenidas (recombinantes sencillas) fueron cultivadas en PY al 10 % en sacarosa, de donde se esperaba un segundo evento de recombinación mediante el cual se perdiera el segmento de *recA* que portaba a los genes *sacRB*. Las colonias que crecieron en estas condiciones (dobles recombinantes) se estiraron en PY Sp⁵⁰-Sacarosa al 10 % (dos veces) y su patrón de plásmidos fue visualizado mediante la técnica de Eckhardt. Una vez que se contó con este material, se procedió como sigue.

SELECCION DEL COINTEGRADO QUE PORTA A LA REGION ENCARGADA DE LA REPLICACION DEL pSim DE CFN42

Con el propósito de localizar la región replicadora del pSim, se hicieron ensayos de conjugación triparental de cada cointegrado con las cepas CFN42 y CFNX107, usando como plásmido cooperador al pRK2073. El medio de selección fué PY Nal²⁰Km³⁰.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, donde se puede observar que de todos los plásmidos movilizados a la cepa CFNX107, sólo el cointegrado cGD47/pSUP202::Lorist 3B fué capaz de replicarse de manera independiente.

Con lo que respecta a las transconjugantes obtenidas entre los diferentes cointegrados y la cepa CFN42, los resultados de la Tabla 1 muestran que 14 de los cointegrados recombinaron con el pSim de la CFN42, y sólo el cointegrado cGD47/pSUP202::Lorist 3B se mantuvo como un plásmido que además fue incompatible con el pSim.

TABLA 1. RESULTADOS DE LA CONJUGACION ENTRE LOS COINTEGRADOS DEL pSim Y LAS CEPAS CFNX107 Y CFN42

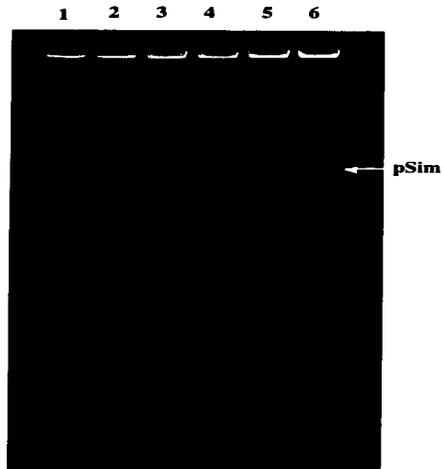
CEPA	No DE COINTEGRADO														
	7	101	28	15	35	45	103	180	32	47	51	84	179	170	102
CFNX107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CFN42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	R	R	R

(-) No replicó

(+) Replicó

(R) Recombinó

El análisis por Eckhardt del comportamiento del cointegrado cGD47/pSUP202::Lorist 3B se muestra en la Figura 4. La presencia de una banda de tamaño similar a la del cointegrado demuestra que en este fragmento del pSim se encuentra el ori, sin embargo, no sabíamos si el cointegrado estaba completo o si se había desintegrado. Para contestar esta interrogante, se hicieron ensayos de conjugación triparental en los que se usaron a las transconjugantes de CFNX107 y de CFN42 como donadoras, a la cepa HB101 como receptora, y al plásmido cooperador pRK2073. De estos experimentos no se obtuvo transferencia alguna.



CARRIL	NOMBRE DE LA TRANSCONJUGANTE
1	CFNX107
2	CFNX107/cos47
3	HB101/cos47
4	HB101
5	CFN42/cos47
6	CFN42

FIGURA 4: ECKHARDT DE LAS TRANSCONJUGANTES QUE CONTIENEN AL cos47

Debido a la imposibilidad de movilizar a cGD47/pSUP202::Lorist 3B hacia *Escherichia coli*, se decidió averiguar si el cointegrado se encontraba íntegro o si había perdido parte de su información. Para ello, se obtuvo DNA total de las cepas transconjugantes y se les aplicó un análisis tipo Southern blot. Como sonda se usaron, en marcajes separados, tanto el cGD47 como el pSUP202::Lorist 3B.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5, donde se puede observar que el cGD47 se encontraba completo, en tanto que el pSUP202::Lorist 3B no se encontraba en la bacteria transconjugante, lo que explicaba la imposibilidad de movilizarlo hacia *Escherichia coli*.

SUBCLONACION DE LA REGION REPLICADORA DEL pSim DE CFN42

Debido a que el cGD47 mide 39.82 kb (9 bandas del mapa de restricción en BamHI del pSim), se procedió a subclonarlo realizando ensayos de restricción con esta enzima, y ligando las bandas obtenidas con el pSUP202. Se obtuvieron 9 clonas (pB72 a pB80) que fueron movilizadas a las cepas CFNX107 y a CFN42 mediante conjugación triparental, usándose como plásmido cooperador al pRK2013. El medio de selección fue PY Nal²⁰ Cm²⁰

El análisis de las transconjugantes mediante la técnica de Eckhardt demostró que sólo el pB79 se replicó en el fondo genético de CFNX107 (Figura 6, carril 2).

Con la finalidad de probar que pB79 era un replicón, y que no había sufrido rearrreglos que afectaran las funciones de movilización y replicación en *Escherichia coli*, se hicieron ensayos de conjugación triparental en los que la cepa donadora fue la transconjugante CFNX107/pB79, y la cepa receptora HB101. El plásmido cooperador fue pRK2013 y el medio de selección LB Cm²⁵.

Los resultados obtenidos de estos ensayos demostraron que CFNX107/pB79 fue capaz de donar el plásmido pB79 a la cepa receptora con una frecuencia de 10^{-3} . Ensayos de restricción de estas transconjugantes mostraron el patrón característico de pB79.

Por otra parte, cuando se analizó el comportamiento de las transconjugantes de CFN42, no se pudo observar ningún plásmido que correspondiera al tamaño esperado, y dada la resistencia a los marcadores de selección de las colonias obtenidas, se dedujo que las clonas recombinaron con el genoma de *Rhizobium etli*.

Con base a estos resultados, y considerando que la banda 79 mide 16.8 kb, se procedió a subclonarla usando como vector a pSUP202. En adición, debido a la alta frecuencia de recombinación observada entre las clonas del cGD47 y la cepa CFN42, se decidió usar en los subsecuentes ensayos a la cepa CFNX101 (cepa *recA*-) como receptora en conjugación.

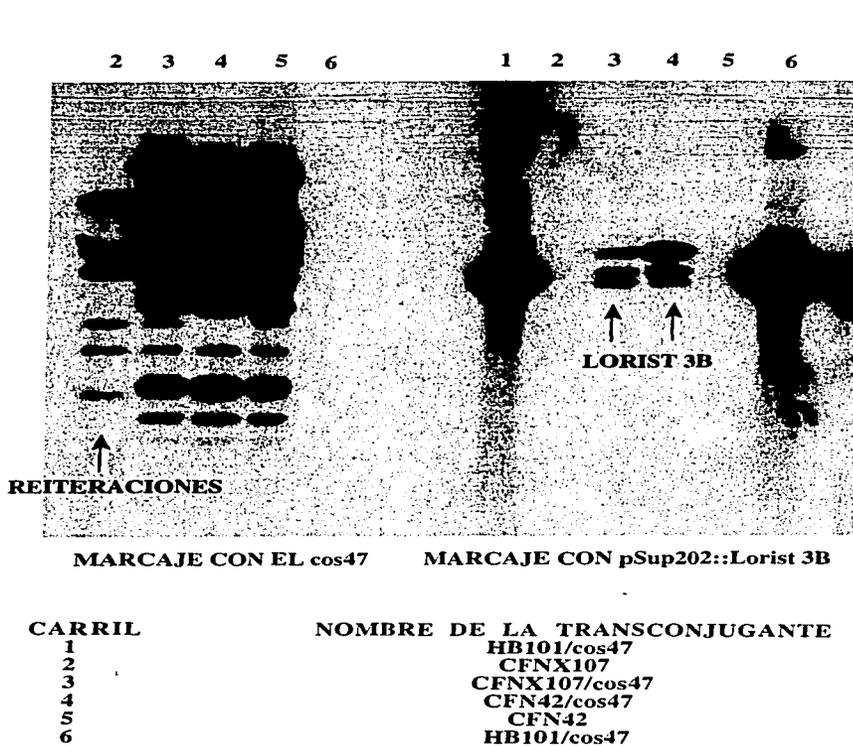


FIGURA 5: SOUTHERN BLOT DE LAS TRANSCONJUGANTES QUE CONTIENEN AL cos47

Siguiendo las estrategias antes descritas, se encontró que un segmento de HindIII de 5.6 kb (clona pH3), tenía una frecuencia de conjugación del orden de 10^{-3} en el fondo genético de CFNX107 y de CFNX101. El análisis de las transconjugantes mediante la técnica de Eckhardt demostró que se comportaba como replicón en ambas cepas (Figura 6, carriles 3 y 4) y que esta clona fue incompatible con el **pSim** de CFNX101.

Por otra parte, fue posible movilizar a pH3 desde *Rhizobium etli* hacia *Escherichia coli* con una frecuencia del orden de 10^{-3} , y su análisis de restricción no mostró alteraciones.

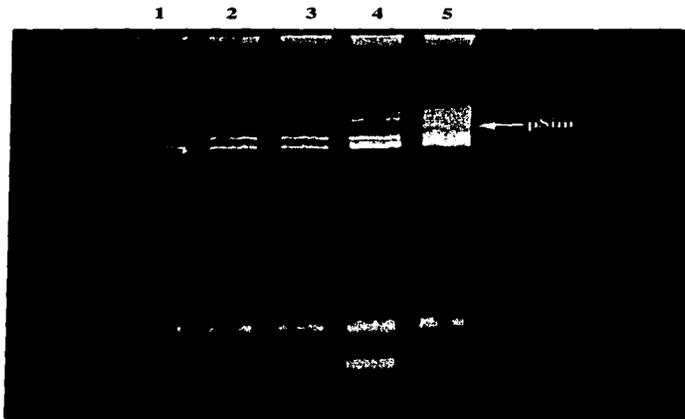
Considerando el tamaño moderado de esta clona, se procedió a deducir su mapa de restricción, mismo que se muestra en la Figura 7. La posterior subclonación con las enzimas EcoRI, PstI y XhoI en pSUP202, y su movilización a *Rhizobium etli*, no generó ningún fragmento más pequeño que se replicara en ninguna de las cepas usadas como receptoras (Figura 7).

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que las funciones esenciales para la replicación están contenidas en pH3 sin embargo, desconocíamos si la capacidad de segregación había sido alterada o si habíamos modificado la regulación del número de copias. Para dar respuesta a estas interrogantes, se procedió a determinar su estabilidad y su número de copias.

ESTABILIDAD DE LAS CLONAS QUE SE COMPORTARON COMO REPLICONES EN *Rhizobium etli*

Con el fin de establecer la eficiencia con la que replicaban y segregaban las tres subclonas del **pSim** de CFN42 que se comportaron como replicones, se evaluó su porcentaje de pérdida por generación en ausencia de presión selectiva, encontrándose que durante 18 generaciones el cGD47 fue completamente estable, en tanto que el pB79 y pH3 mostraron un porcentaje de pérdida menor a 0.04 % por generación (Tabla 2). De lo anterior, se deduce que pH3 posee *loci* relacionados con la estabilidad del plásmido, pero que hay elementos adicionales en cGD47 que aumentan dicha estabilidad.

V
W



CARRIL	NOMBRE DE LA TRANSCONJUGANTE
1	CFNX107
2	CFNX107/pB79
3	CFNX107/pH3
4	CFNX101/pH3
5	CFNX101

FIGURA 6: ECKHARDT DE LAS DIFERENTES TRANSCONJUGANTES QUE CONTIENEN AL ori DEL pSim

TABLA 2. PORCENTAJE DE PERDIDA POR GENERACION DE LAS DIFERENTES SUBCLONAS DEL pSim DE CFN42

GENERACION	TRANSCONJUGANTE / SUBCLONA DEL pSim				
	CFN42 cGD47	CFNX107 cGD47	CFNX107 pB79	CFNX107 pH3	CFNX101 pH3
9	< 0.001	< 0.001	0.034	0.038	0.038
18	< 0.001	< 0.001	0.019	< 0.001	0.037

- Los datos se calcularon de acuerdo a Durland, R. H., et al., 1982.
- Los datos son la media de tres experimentos independientes.

EVALUACION DEL NUMERO DE COPIAS DEL pSim Y DE pH3

Para determinar si pH3 mantiene el número de copias característico del pSim, el DNA total de CFN42 y de las transconjugantes de pH3 fue cortado con la enzima HindIII y marcado simultáneamente con dos sondas, una de 1.4 kb que hibridiza con pH3 (corresponde a la clona pXA), y una de 1.2 kb que hibridiza con el gene cromosomal de *recA*. Asumiendo que la intensidad de la señal obtenida con el marcador cromosomal representa el número de copias del cromosoma, la comparación de esta señal con la de pH3 nos indica el número de copias de pH3 con respecto al cromosoma. Los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 3, donde se aprecia que el pSim de CFN42 tiene un número de copias entre 1 y 2 con respecto al marcador cromosomal. Para el caso de pH3, esta subclona también mantiene un número de copias entre 1 y 2 con respecto al marcador cromosomal, lo que sugiere que los elementos de regulación del número de copias del pSim estan presentes en pH3.

TABLA 3. RELACION ENTRE LOS VALORES DE DENSITOMETRIA DEL GENE *recA* Y DE LA REGION REPLICADORA DEL pSim DE CFN42

<i>locus</i>	CONTROL	TRANSCONJUGANTES	
	CFN42	CFNX101/pH3	CFNX107/pH3
<i>recA</i>	102 020	132 468	96 576
ori DEL pSim	165 101	152 430	127 213
RELACIONES			
	1.61	1.15	1.31

- Los datos fueron tomados de películas fotográficas que no fueron expuestas a saturación.
- Los valores fueron corregidos considerando la diferencia de tamaño entre ambos locus.
- Las unidades de densitometría se expresan en pixeles.

OBTENCION DE LA SECUENCIA DE pHY

Para facilitar la obtención de DNA en cantidad adecuada para su secuenciación automática, se subclonó la banda que contiene al **ori** del **pSim** de CFN42 en el vehículo pSK+, debido a que este plásmido tiene un número de copias elevado. La clona obtenida corresponde a pHY, misma que fué subclonada, secuenciando cada subclona al menos 4 veces. Los segmentos de los que no se logró obtener subclonas fueron secuenciados usando primeros diseñados a partir de los extremos de las secuencias que flanquean a estas zonas.

La organización de los genes encontrados se muestra en la Figura 7 y la secuencia obtenida se presenta en la Figura 8.

ANALISIS DE LA SECUENCIA DE pHY

La secuencia obtenida de pHY mide 5 615 nucleótidos y presenta un contenido de GC de 55.9 %. Analizando con mayor detenimiento esta secuencia, se encontraron 17 zonas ricas en AT (con un porcentaje superior al 50 %), destacando dos regiones, la primera de 150 pb con el 58.7 % de AT (nucleótidos 4 134 a 4 184), y la segunda de 50 pb, con el 60 % de AT (posición 5 405 a 5 455).

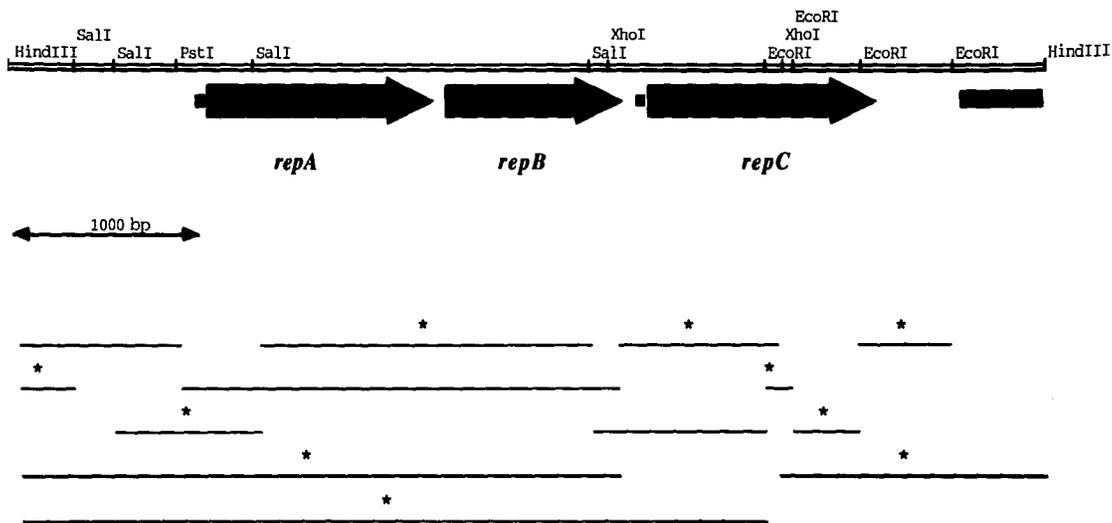


Figura 7: MAPA FISICO DE pHY

- Las flechas indican la posición de los tres márcos de lectura abierta que tienen homología con los genes *rep*
- Los cuadros indican la posición de los posibles sitios de unión a ribosoma
- La barra negra indica la zona en la que se propone se encuentra el origen de replicación del *pSim* de CFN42
- Las líneas delgadas representan las subclonas obtenidas a partir de pHY
- El asterisco señala a las subclonas que fueron movilizadas a *Rhizobium etli* para probar su capacidad de replicación autónoma

SECUENCIA DE pHY

AAGCTTCATCCTTCGTGGCGCACCCGGTTCGAACCGAACAGACCAACAATCCGAGTCGCACCGAGAAGGAT 70
GACGGCAACTAGATCGGGTAGTTGGGGCGCCGCAACATCAGAAAGGCTCAGCGTTTGTGGACCGCTGCCT 140
GCGATGGCGGTGGTGGAAACGATCTTCTCTGGCTGCCCAAGCGCGGGAGAGGCCATTCGACCGTAGCAA 210
GAGTTCGCTCGAACCTGATATCCGTTACCGCCAACGACTTCGCTGAGACCACCTCCAGGCCACATTCTAC 280
GATGCCGGGAACAAGGTCAGCGTTGGCTCGTGAACGGAACATCTCCCTTCCCTTCCCTTCCACTCTTC 350
GAGGTGTCGACGCCAAAACCGAAGAATCTCTAGACCATCAGGGGATGGCGTTTCAGCGGCCCTTCGGG 420
GAGAAGAAGACGGAAAAATACGTCTACCAGCATGGTCGGTCCCATCGCAAGACAAATCGCGTGCACATCCT 490
CCAAGTGTCCAGCCCGCGGTGACATCCAGGATGGCAGTCGGGGCGAGAGCGTCCAAACCCCATCTGCCT 560
CGCACTCGTGCACTACTTCTACATACCAAGTGCAGTGGAAAAGATCCTCGCACGTAGCCTATGATCGTC 630
CTGAAGCAGCTACGCTTCGTAGTAAATTTTGGTGTGCGAGATCGCGAATACCTGCATGAATTTCTCCGCC 700
GCCGTTAGGGCGCCGGAACTCTGCACGAATGGAAATCGGGCGTCCGTTGTCGAATGCTTACGGTTTGTG 770
CGAGTGAGTCGGCCCAAGCGGATCACCGACTTTGCCGAGGTCTCTGCTTTTCGTCTAAATCGCCGGGGC 840
ACATTTGTAGGATTCACAATAAAACACACCATGACCAATCGGTACCGGGTCTCTCTAAGTCGACGGATA 910
TAAACGGAAAAATCCATTTACTCTACGTTCGGGTTTATCCACGTTAGCCTTTGTTAACCTAAAACCCC 980
TTGGTCAAAATGAAGGATCGGGCGCTAATAGATAGTGGGGAACTTTAGCGCTTTCGCGGAAAGTACCC 1050
CCCCAACTCAGGAAATGGATTGAGATGGCGAAAACCCGACGAAACACAGCCCGGTCGTGCAAGGGTTG 1120
ACCGCATTGATGGAGCGTCAATGCTGACGCTCTCTCCAGCCAACCTCAAGCACATCATCTCAAGGTCTTCC 1190
CGCCGACGTCGGAAAAGGGCATTCGATCCTTTGCACCGTCAGAAGCCTCAAAAATGCTTGGCATCGGTGA 1260
GTCCTTATCTTAGACAAATGCTTCGGAAATGCCTGAACTGAACTGAACTGATGAGCCCTGGCGGTGACGC 1330
ACGTTACGATCGAAGATAATTCATTTCAATCCGTAAGCACCTGGACCTGATTTGGCCGCGGGAACCCGCGTT 1400
ACTGCCCCATCTCGTACGGGGAGGAGGTTCAAGTCGCTTCGGGTGATGAATTTCAAAGCGCGTCCGG 1470
CAAGACGACGACAGCCGGCATCTGATACAGTACCTGGCAAATGGGTGGTTACCGATTCTCGGAATTGAT 1540
CTTGATCCCAAAGCAAGCCTTTCCGACTCTTCGGGAGTCAGCCAGAAATGACGTTGGTCCGAACGAAA 1610
CACTCTATGGCCGCATCCGGTATGATGATGAGCAGGTCCCAATCGAGCAGGTTGTCGAGGAACGTACAT 1680
CCCGGATCTTCACTAAATCCCTGGCAATCTTGAACGATGGAGTTGAGCACGATACCCGCGCGCGCTT 1750
ATGAACCGGAAGGAAGGTGACACGCTTTTTTACGGTCGGATCAGTCAGGTCATCGAAGACATCGCGGACA 1820
ACTACGATGTCGTGTTATCGATTGCCCTCCCAACTTGGCTATCTCACGCTTTCAGCTCTGACCGCCGC 1890
AACCTCGATCCTCGTCAACCGTCCATCCCCAGATGTTGGATGTAATGTCGATGAACCAGTTCTGGCGATG 1960
ACCTCGAATCTCCTTCGGGAAATCGAGAACCGAGCGCCAGTTCAAGTTCAAATGGAATGCGCTACCTCG 2030
TCACTCGTTTTGAACCGAGCGATGGCCCGCAGAACCAGATGGTGGGCTATCTGCGTTCGATCTTCGGCGA 2100

AAATGTCCTCAATTTTCCGATGCTCAAGACGACCGCGTTCGGACGCTGGCCTGACGAATCAAACCCTC 2170
TTTGAGGTTGAGCGCGGACAGTTTCACGCGCTCGACCTATGATCGGGCCTTAGAGGGGATGAACGCGACA 2240
ACGACGAGATCGAACTCTAATCAAAAAGCATGGGGTAGAACCATGAGTCGGGAAGCACCTCCTTGAC 2310
GTCACCACGGACGCGCCCGACAGCTCATCAGCTGCTGAACACAGAGCGGCAAAAGACTCGCTCCATGCCGC 2380
TTCTCGGCGTGACCAGAAAAGAACGAGATCCAGCGACGAAGGTGATTGCAAAACATCGGTAAACGGTTGGC 2450
AGAACAAAATGTCGTTTGTATCGTCCGCGAGAAGATGGAGCGGCGCTCTCGCCGGAGGTACGGCCGTGTTT 2520
GTGTGAAAGACCTTCTCAATCGAGCCGTCCTTCGTTTCAGGGGTCGCATGCAAGGGGATATCGGACGGACT 2590
TCTTGTATCCATCCGGGAGCAAGGACAAGCAGGTGCCAATCCTTGTGAGACCTCATCCGTTAAACCCGGC 2660
CACCTACCAAGTTGCCTTTGGACACCGCCGGCTGCGCCGCGTTCGAGACTAGGACTGCCGGTCAAGGGC 2730
GTTGTTTCGAGACTTGTGCGACGAGCAGTTGGTTGTCGCACAGGGTCAGGAAAACAATGAGCGCGAAGACC 2800
TCACCTTCATCGAAAAGGCACGTTTCGCACACAAGCTAAACAAGCAGTTTCACGAGAAATCGTCATCGC 2870
GGCTATGTCAAATCGATAAAAAGCAACTTGTGCAAGATGCTCC TGCTGTTGACCCCTCCCTCTGAAATG 2940
ATCGATGCCATCCGGCCCGCTCCAGGCCGTTGGACGCCCAAGTTGGCAGCAATFGCCAGAGCTGGTTGAGA 3010
AAGCATCGCCTCCGGCAGGCCGTGGCAAAATATGCTGCCTCGGAGGAGGTCAGCCGCTGCCGCTGTCGGA 3080
GCGGTTCAAGGCAGTGCATCGACCACTTGAACCCGCGTCGGACTGCGCGCGGGTTGCCAGACGTCCTGTCC 3150
ACCCCGAATGGCGACAGGCTTGCAGCAGTACGCAGAGCAAGAGCAAGCTAGA AATTACCATTGACAGGA 3220
AAGCCACGCGGATTCGCGGCTTTCGTA CTGAGCATTGTCGCGCTTACCAGGAGCATCGCGCAA 3290
GCATCAACGGAAACAGGGAGTGTAAACCGCAAAGAAAAGAGCTCCC TCAACGTCCGCGTCGTGGAAGCC 3360
CTTCGTCTCTGTAGCAAGAACAAGATCGCATTCTCGAATCCTCGTCAAGAGTCTTTGGCGCCGTTTT 3430
GGTGAGCGAATTTCTTTGCTGCTGAAAGGTGAGAGACAATGCAGTCGGGGAATGTAGCGACGCCGTTTC 3500
GGGCGGCGGCAATGACGCTTGCCTCGTGC GCGGCCAGGCCAATGGAATCAAGCATGGAAAAGCTG 3570
CCGATAAGTGAAAGTGTGGAGAGGACGCTTCCGCCGCGATGGAAC TTGCTCAAGAATCCAGGTCGGAA 3640
CAGTCTTGGCGTCTTGATGCGCTATTGAGCTTTCAACCCGAAAAGGAGTTGCGT CAGGAGGCACAGCTG 3710
ATCGTCTTCCCGTCGAATGCTCAGCTTGCCTTCGGGCGCATGGGATGTCGGGGCGCTCAAACGTTTTCGG 3780
GGGCATATTTACCATTTCTGTTGGAGTCGGGGTGTATCGTCCGTAAGGATAGCGCCAATGGCAAGCGCTT 3850
CTCCCGCAAGGGCGACGATGACCGATCGAGAATGCTTTTGGCTTCGACCTGTCGCCCCCTCTGGCCGGA 3920
TCGGAAGAGTTGGCGATGTTGGCGCAAAGAGTGGCGCCGAGAGACCTCGCTCAGGAAAAGCCAAAGAGA 3990
GCCTTACAATTTGCCGCGGAGTGTTCGCAAACTTATTACTGCTGCAATGGTCGAGGGCGCCGAGGACGA 4060
TTGGAAGACGACCGAGGACATCTACATTTTCGCTCGCGAGCAGAATTCGGCGGTTCCGACCTTGAAGGG 4130
GTCACTAGCGTCTCAAATGAAATGGAGATGCTCCGCTGAGGAAGTCTTAATCGTTTGGAAAACCTCGAGA 4200
ATGCTGAAAAAATTAGCACCAATGCTGCTCATATCGAGCAGCACATACAGAATTCAAAACCCGAATCCGT 4270

```

AAATGAATCTGAACCACGCTCCGAAAAGGAGCAGGGGGCAAAGCGAGCTTGAGCCTTCAGCCGAAGAAT 4340
GAATCGCAAAGGGCGTTCCCTTGGGATTTGGTGTCAAGCGGTGCCCGATGATCAGCGACTATGCACCGC 4410
GCGGCGTGGGAAGCTGGCGAGATCTGATGTCTACCGCTGTGGTGGTTTCGATCTATGCTGGGGTAAGCCC 4480
TTCCGCCTACCAGGATGCCTGCGAGGCGCTAGGACCGGAGAATGCTGCCGTGGCAATTGCGTGCATCCTG 4550
GAAAGGGCTAACTTCATCAACTCTCCTGGAGGCTA TCTGCGGGATCTAACCGCGCGAAGTGAGCGCGGTG 4620
AATTCAGCTTGGCCCCGATGATAATGGCGTTGTTGAAGGCCAACGGGCAAGGCCGTTTGAGGGCTGGGTA 4690
AGTGC GGCTGATCGTTATTCCTGCGGTTGAGGATTTCCGGTTGTGGTCAGCTGACCACCAGCTAACCTCT 4760
TGGAAAACACCAACTTTCAAAGGCGGCTGTGCGAGGCATGTGCCGGTTACCGTCTGGCTCCCGAGCCA 4830
AATGACGCCTCTTAGGGGAACAGTAGACCGTGATCTCAATACGAAACCGCCCAAGGTCGCGCACGAACAA 4900
GACCAGGAGCGAAGTCTTTCGCCCGAATGGGAGGCGCCTTTTCATCAATTTCATGGCACCGCGCCGCCAAA 4970
TCGCAAGGCGCGCGGCTGTGCGCGCTAATCGCGAGTGGGGGATGGCGCCGATGGATAGGACGCAATAGG 5040
AACAACTACCTGCTGCCATCCGCGAGCGCCGGAATCTACGGGGCTGATTCGCGGCGGCACCTTCCACAACAC 5110
TGGGAGAAATTCACACCGCTATCTTGGGGCAGGTTGACGCAATGAGCCACTCGACCCCTATGGTCTTTTGAC 5180
CAGGCAAGAATGTCATTGAGGTTGACTTTGGTGCCTGTGTCGGAGAGATCATTGCGAGTTTCGAGCGAGG 5250
CGACGACCGGAGATCGAGGTTCCCGGGATCGCCCGGAGGCTATTCGCGTTCGCTCATCGACGATGTTGA 5320
GCACCGGAACCCCTTCCGTAAGCGAACTTGCAGGCACGCGCGCACCGATCCTGCGCAACCGCAAGGCT 5390
CTGCCCGCTGGTCGCTGGAATTTGTTCTGTGACCAAAAGCAAAATGATCCAGTGGAAACATTTCTCCACCGAA 5460
CGACTGAGGCATATACCTATCTCGCAAGGCCAGCCATCGGCACAGTATTTGAGTCCGTTGAAGAAGGTG 5530
ATGGGTCCAGGCGGCTTGGAGGAGGCATAGCCGTTCCAGCCCGAGTTTGGCGACGATCCAGCGGCC 5600
AGGCGAGCGAAGCTT 5615

```

FIGURA 8: SECUENCIA DE pHY

- Los Márcos de Lectura Abierta se denotan con flechas en tono claro
- Las secuencias directas e inversas repetidas son señaladas con flechas negras
- Las secuencias que son blanco para la metilación se muestran en negritas (**GATC**)
- Las secuencias de unión a ribosoma se marcan con letra Arial subrayada
- La secuencia con identidad al oriT de *Agrobacterium tumefaciens* se denota con un semicírculo (**GATCCTGCC**)

El siguiente análisis se realizó con el programa FASTA, donde se comparó toda la secuencia de pHY con la sección de la base de datos del GeneBank que comprende secuencias bacterianas. Los resultados obtenidos señalan un porcentaje de identidad del 77.8 (en 3 863 pb) con el plásmido pRiA4b de *Agrobacterium rhizogenes*, y del 57.4 % (en 1 352 pb) con el plásmido pTiB6S3 de *Agrobacterium tumefaciens*. Estas secuencias corresponden a las regiones que codifican para las proteínas RepA, RepB y RepC, todas relacionadas con la replicación de plásmidos. Además, cabe mencionar que un elevado porcentaje de identidad (91.6 %) se presentó entre un segmento de 155 nucleótidos de pHY (del nucleótido 3 316 al 3 470), y la región intergénica del plásmido pRiA4b. Con respecto al resto de las secuencias registradas por el FASTA, porcentajes de identidad menores al 70 % se encontraron entre pHY y pequeñas regiones (menores a 110 pb) de diferentes secuencias relacionadas con la replicación del DNA. Un dato adicional es que la gran mayoría de las regiones de pHY ricas en AT, se encontraron en las zonas que tienen identidad con secuencias codificantes.

Debido a que el análisis tipo FASTA señaló alta identidad con tres genes, se decidió buscar Marcos de Lectura Abierta (MLA) usando el programa TESTCODE, encontrándose la presencia de 3 MLA con alta probabilidad de ser codificantes debido a que presentan pocas regiones de incertidumbre. El primer MLA se extiende del nucleótido 1 076 al 2 287 (1 212 pb, MLA1), el segundo del 2 288 al 3 312 (1 026 pb, MLA2) y el tercero del nucleótido 3 471 al 4 688 (1 218 pb, MLA3). Por otra parte, al evaluar el uso de codones con el programa CODONPREFERENCE (usando una matriz construida por el Dr. Dávila a partir de regiones codificantes de *Rhizobium*), se encontró que los 3 MLA detectados nuevamente mostraron alta probabilidad de codificar proteínas, ya que el programa muestra 3 zonas bien definidas con escasos codones “ raros “ para *Rhizobium*.

Con base a los datos anteriores, y considerando que los tres MLA encontrados se parecen a secuencias que codifican para proteínas relacionadas con la replicación de plásmidos de *Agrobacterium*, se decidió aislar las secuencias y compararlas por separado con otras secuencias que codifican para proteínas Rep de Rhizobiaceas. De esta comparación (Tabla 4) destaca que las mayores identidades se presentan con los genes de *Agrobacterium rhizogenes*, las menores con las secuencias *rep* de *Rhizobium meliloti*, y la identidad con las secuencias *rep* de *Agrobacterium tumefaciens* y de *Rhizobium leguminosarum* fueron intermedias a las anteriores pero similares entre ellas.

TABLA 4. ANALISIS DE IDENTIDAD DE LOS MARCOS DE LECTURA ABIERTA DE pHY MEDIANTE EL PROGRAMA BLASTN

MLA	TAMAÑO	% DE IDEN	GENE CON EL QUE SE ENCONTRO IDENTIDAD
1	1 212 pb	81 60 57	repA del plásmido pRia4b de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> repA del plásmido pRL8JI de <i>Rhizobium leguminosarum</i> repA del plásmido pTiB6S3 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
2	1 026 pb	76 47 49 32	repB del plásmido pRia4b de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> repB del plásmido pRL8JI de <i>Rhizobium leguminosarum</i> repB del plásmido pTiB6S3 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> repB del plásmido pRmeGR4a de <i>Rhizobium meliloti</i>
3	1 218 pb	73 59 52 51	repC del plásmido pRia4b de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> repC del plásmido pRL8JI de <i>Rhizobium leguminosarum</i> repC del plásmido pTiB6S3 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> repC del plásmido pRmeGR4a de <i>Rhizobium meliloti</i>

Además de los MLA, se encontraron 9 secuencias con el 100 % de identidad a las secuencias consenso para los sitios de unión a ribosoma, 8 con la secuencia AAGGT y 1 con la secuencia AAGGAA. De estas secuencias, una de ellas se encuentra 8 nucleótidos antes del codón de inicio de MLA3 (AAGGT, posición 3 457 a 3 462). Cabe mencionar que una secuencia muy parecida a un sitio de unión para ribosoma fue encontrada 11 nucleótidos antes del codón de inicio de MLA1. Tal secuencia es CAGGAA (posiciones 1 059 a 1 064) (Figura 8).

Los resultados encontrados hasta este punto corresponden a secuencias con alta probabilidad de ser codificantes, sin embargo, aunque puede suponerse su participación en la replicación dados los resultados hasta aquí descritos, no son secuencias que definan a un **ori**. Debido a lo anterior, se procedió a buscar elementos involucrados en la estructura de un **ori**.

En este sentido, los elementos que siempre se presentan en un **ori** son las secuencias directas e inversas repetidas ricas en AT, mismas que se localizan en regiones no codificantes. La búsqueda de tales elementos en pHY sólo condujo a 1 secuencia con las características mencionadas. Esta se localizó en las posiciones 3 391 a 3 397 y 3 440 a 3 446, con 7 nucleótidos de largo y con un porcentaje de AT del 71.4 % (Figura 8). Debido a este resultado, y tomando en cuenta que *Rhizobium etli* es una bacteria con un contenido de GC superior al que se encuentra en Enterobacterias, se pensó que las diferencias en el contenido de AT podrían generar un sesgo que hace poco probable la presencia de tales secuencias, así que se decidió buscar en las regiones no codificantes de pHY, secuencias directas repetidas e inversas repetidas ricas en GC. Los resultados de esta búsqueda mostraron 10 directas repetidas y 10 inversas repetidas. Tres inversas repetidas

de 7 a 9 nucleótidos de largo se encuentran antes del codón de inicio de MLA1 (del nucleótido 530 al 1 035). Tres inversas repetidas se localizan entre MLA2 y MLA3 (del nucleótido 3 305 al 3 336) y tienen una extensión de 7 a 9 nucleótidos (Figura 8). Por otra parte, las 10 directas repetidas y las 4 inversas repetidas restantes se localizaron después del codón de término de MLA3, sobresaliendo que 8 directas repetidas y 2 inversas repetidas se encuentran del nucleótido 5 138 al 5 604. El tamaño de tales secuencias varía de 7 a 8 nucleótidos (Figura 8).

Además de las secuencias repetidas, la búsqueda de posibles sitios para la unión y/o actividad de proteínas de replicación, condujo a la localización de la secuencia GATCCTGCC (posición 5 584 a 5 592), que tiene el 89 % de identidad con el origen de transferencia (**oriT**) del plásmido pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens*. Es importante señalar que esta secuencia se encontró en una zona cuyo contenido de AT es superior al 50 % y además, que esta rodeada por 6 secuencias GATC, que son blanco de acción de enzimas de metilación (Figura 8).

Finalmente, un último resultado relacionado con la secuencia de nucleótidos fue el hallazgo de una región que mostró identidad con el extremo 5' del gene *tral* de *Agrobacterium tumefaciens* (57.6 % en 672 pb localizadas de la posición 1 a la 672, no incluye la región reguladora). El gene *tral* codifica una proteína relacionada con el corte de una de las cadenas del DNA a nivel del **oriT**, por lo que su presencia en esta región resultaba interesante sin embargo, dado que los análisis con los programas TESTCODE y CODONPREFERENCE no mostraron alta probabilidad de que se tratara de un MLA, no fué analizado con detenimiento.

ANÁLISIS DE LAS POSIBLES PROTEÍNAS CODIFICADAS POR pHY

Debido a que las secuencias de DNA de los tres marcos de lectura mostraron alta identidad con el DNA que codifica para proteínas Rep de Rhizobiaceas, se decidió deducir la secuencia de aminoácidos a partir de cada marco de lectura de pHY. Este análisis mostró que el MLA1 codifica para una proteína de 404 aminoácidos (RepA), MLA2 para una proteína de 342 aminoácidos (RepB) y MLA3 para una de 406 aminoácidos (RepC) (Figura 9). Cuando la secuencia de cada proteína fue alineada con las proteínas Rep de Rhizobiaceas (Tabla 5) se encontró que las mayores identidades se presentaron con las proteínas de *Agrobacterium rhizogenes*, que las menores con las proteínas de *Rhizobium meliloti*, y que los porcentajes de identidad con las proteínas de *Rhizobium leguminosarum* y *Agrobacterium tumefaciens* fueron intermedios a las anteriores pero similares entre sí.

RepA DE pHY

MAKTAANTAP	VVEGLTALME	RHADALSSQL	QAHHLKVFPF	TSEKGIERSFA	50
PSEASKLLGI	GESYLROQTAS	EMPELNVSMS	PGGRTFTTIE	DIHSIRKHL D	100
LIGRGNRRYL	PHRRTGEEVQ	VVWVMNFKGG	SGKTTTAAHL	VOYLAMRGYR	150
FSRIDLDPQA	SLSALFGSQP	ETDVGPNETL	YGAI RYDDEQ	VPIEQVVRGT	200
YIPDLHLIPG	NLELMEFEHD	TPRALMNRKE	GDTLFYGRIS	QVIEDIADNY	250
DVVVIDCPPQ	LGYLTL SALT	<u>AATSTILVTVH</u>	PQMLDVMSMN	QFLAMTSNLL	300
REIENAGA QF	KFNWMRYLVT	RFEP SDGPQN	QMVGYLRSIF	GENVLNFPML	350
KTTAVSDAGL	TNQT LFEVER	GQFTRSTYDR	ALEAMNADND	EIETLIKKAW	400
GRTT					404

RepB DE pHY

MSRKHL LDVT	TDAPDSSSAA	EHRAAKTRSM	PLLGVT RKER	DPATKVIANI	50
GNALREQNVR	FDRAEKMERR	LAGGQAVFVL	KTF SIEPSFV	QGS HARGYRT	100
DFLYPSASKD	KQVPI LVRPH	PLNPRYQVA	FGHRR LRAVS	ELGLP KVAVV	150
RDLSDEQLVV	AQQQENNERE	DLTFIEKARF	AHKL N KQFPR	EIVTAAMSID	200
KSNLSKMLLL	VDPLPSELID	AIGAAPGVGR	PSWQQLAELV	EKASFPAGAA	250
KYAASEEVQA	LPSSERFKAV	IDHLKPRRTA	RGLPDVLSTP	DGDRLAQVTO	300
SKSKLEITID	RKATP DFAAF	VLEHLSALYQ	EHRAKHQ RKQ	GV	342

RepC DE pHY

MQSGNVATPF	GRRPMTLALV	<u>RROAAMEIKH</u>	<u>GKAADKWKVL</u>	ERTLP PPRWNL	50
LKNP GPNSLA	VLDALLSFHP	ETELRQEAQL	IVFPSNAQLA	LRAHGMSG AQ	100
TFAGAYL PFL	LESGLIVRKD	SANGKRFSRK	GDDDDQIENAF	GFDLS PLLAR	150
SEELAML AQ R	VAAERASLRK	AKESLTICRR	DVRKL LITAAM	VEGAEDD WKT	200
TEDIYISLAS	RIPRVPTLEG	VTSVLNEMEM	LREEVLNRLE	NLENAEKIST	250
NAAHIEQH I Q	NSKPESVNES	EPRSEKEQGA	KASLSLQPKN	ESQRAFFLGL	300
VLKACPMISD	YAPRGVGSWR	DLMSTAVVVR	SMLGVSPSAY	QDACEALGPE	350
NAAVAIACIL	ERANFINS PG	GYLRDLTRRS	ERGEFQLGPM	IMALLKANGQ	400
GGLRAG					406

FIGURA 9: SECUENCIA DEDUCIDA A PARTIR DE LOS TRES MARCOS DE LECTURA ABIERTA ENCONTRADOS EN pHY

- El motivo YLTL SALT AATSTILVTV probablemente puede unirse a la membrana interna bacteriana
- El motivo RROAAMEIKHGKAADKWKVL tiene identidad del 61 % con el sitio de unión para ATP presente en proteínas implicadas en la replicación

TABLA 5. ANALISIS DE IDENTIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LOS TRES MARCOS DE LECTURA ABIERTA DE pHY MEDIANTE EL PROGRAMA BLASTX

PROTEINA DE pHY	TAMAÑO	% DE IDEN	PROTEINA CON LA QUE SE ENCONTRO IDENTIDAD
RepA	404 aa's	92	RepA del plásmido pRiA4b de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
		54	RepA del plásmido pRL8JI de <i>Rhizobium leguminosarum</i>
		54	RepA del plásmido pTiB6S3 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
RepB	342 aa's	70	RepB del plásmido pRiA4b de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
		34	RepB del plásmido pRL8JI de <i>Rhizobium leguminosarum</i>
		32	RepB del plásmido pTiB6S3 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
		10	RepB del plásmido pRmcGR4a de <i>Rhizobium meliloti</i>
RepC	406 aa's	69	RepC del plásmido pRiA4b de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
		49	RepC del plásmido pRL8JI de <i>Rhizobium leguminosarum</i>
		36	RepC del plásmido pTiB6S3 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
		20	RepC del plásmido pRmcGR4a de <i>Rhizobium meliloti</i>

Con la idea de encontrar indicios que condujeran a definir la función que tienen cada una de las posibles proteínas en la replicación, se buscaron motivos funcionales en la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas, usando el programa MOTIFS. Los resultados de este análisis no demostraron similitud con ningún dominio, sin embargo, usando el programa FITCON se encontró que RepC de pHY contiene una secuencia de 18 aminoácidos que tiene el 61 % de identidad con la secuencia RQTALADIKQGKTADKWK (presente en proteínas dependientes de ATP que se unen a DNA, como DnaA), misma que se extiende del aminoácido 21 al 38 (Figura 9).

Por otra parte, al buscar con el programa PSORT señales relevantes en la secuencia de aminoácidos de cada proteína, se encontró que RepA de pHY posee una secuencia transmembranal de 17 aminoácidos (del 263 al 279), que la posibilita para unirse a la membrana interna de la bacteria (Figura 9). Para el caso de RepB y RepC de pHY, estas mostraron alta probabilidad de corresponder a proteínas citoplásmicas.

Un análisis más consistió en establecer una filogenia de las proteínas Rep de Rhizobiaceas, para ello, se realizaron alineamientos entre cada familia de proteínas. Cabe aclarar que en este análisis se decidió excluir a las secuencias de *Rhizobium meliloti* debido a que en estudios previos encontramos que tienen poca identidad con las proteínas Rep de *Agrobacterium rhizogenes*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. Para el caso de la filogenia de RepA, se observó que la mayoría de las secuencias se encuentran muy conservadas. El segmento menos conservado es pequeño y se encuentra en el extremo amino terminal. Con lo que respecta a RepB, el alineamiento muestra que estas proteínas también están bastante conservadas. El extremo amino y carboxilo resultaron muy variables, mientras que la región conservada se extiende en la parte central de las proteínas y comprende alrededor de 124 aminoácidos. Finalmente, el alineamiento con las proteínas RepC mostró que tales proteínas están relativamente conservadas. Hay dos zonas conservadas cercanas a los extremos amino y carboxilo de las proteínas, y dos regiones menos conservadas tanto en el centro de las proteínas como en el extremo carboxilo terminal.

A partir de estos alineamientos, se fabricó el dendograma para cada proteína mediante el programa UPGMA. Los árboles así obtenidos se muestran en las Figuras 10, 11 y 12. Para el caso de las proteínas RepA (Figura 10), se observa que la proteína de *Agrobacterium rhizogenes* y *Rhizobium etli* son las más cercanamente emparentadas. A su vez, las proteínas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum* están emparentadas entre sí y separadas de las primeras por las mismas distancias evolutivas.

Para el caso de las proteínas RepB, el árbol obtenido (Figura 11) nuevamente relaciona cercanamente a las proteínas de *Agrobacterium rhizogenes* y *Rhizobium etli*, mientras que RepB de *Agrobacterium tumefaciens* se relaciona con RepB de *Rhizobium leguminosarum*. Estas dos últimas proteínas se encuentran a la misma distancia evolutiva de las proteínas de *Agrobacterium rhizogenes* y *Rhizobium etli*.

En cuanto a RepC, las proteínas de *Agrobacterium rhizogenes* y de *Rhizobium etli* son las más cercanamente emparentadas y éstas a su vez, se relacionan más cercanamente con la proteína de *Rhizobium leguminosarum* y finalmente, con la proteína de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 12).

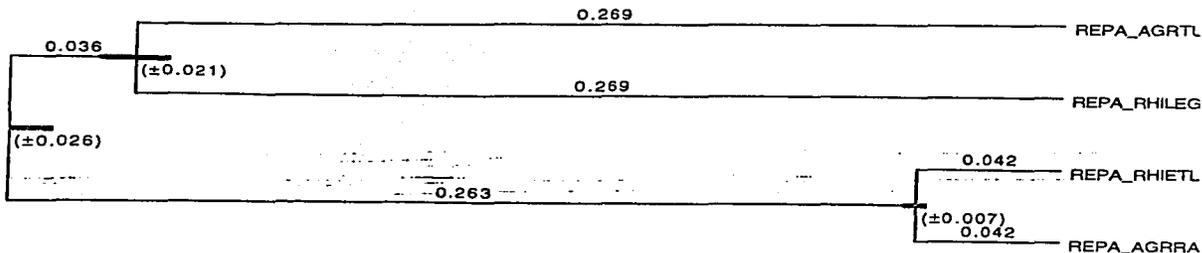


FIGURA 10: ANALISIS EVOLUTIVO DE LAS PROTEINAS RepA DE Rhizobiaceas

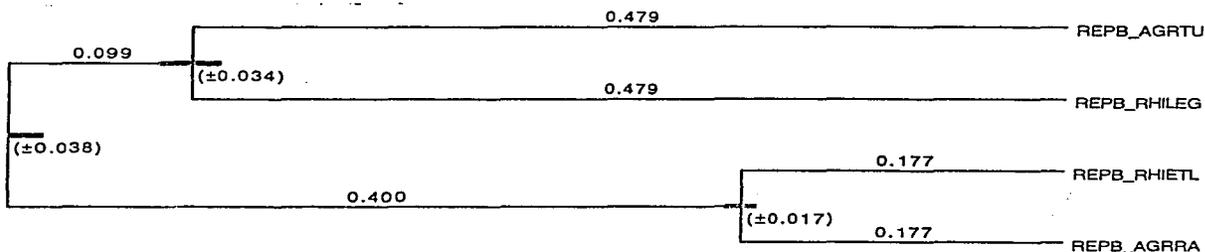


FIGURA 11: ANALISIS EVOLUTIVO DE LAS PROTEINAS RepB DE Rhizobiaceas

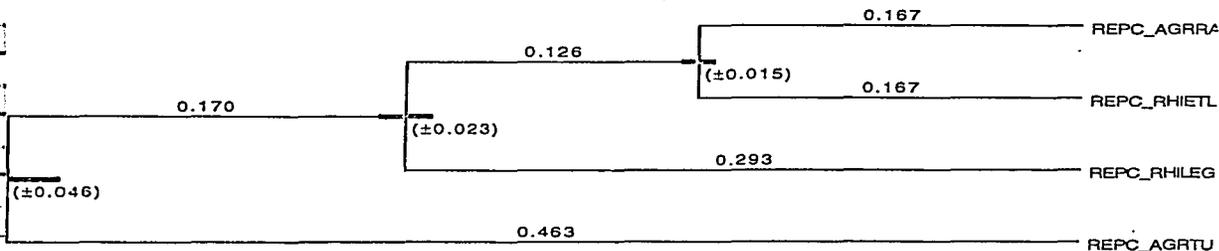
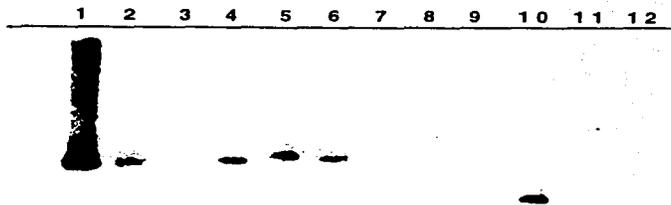


FIGURA 12: ANALISIS EVOLUTIVO DE LAS PROTEINAS RepC DE Rhizobiaceas

ANALISIS DE LA PRESENCIA DE REGIONES REPLICADORAS SIMILARES A LA DEL pSim DE CFN42 EN OTRAS CEPAS DEL GENERO *Rhizobium*

Con la finalidad de establecer si la menor región replicadora del pSim de CFN42 tiene homología con las secuencias de otros plásmidos de Rhizobiaceas, se llevo a cabo un ensayo Southern blot, en condiciones de alta severidad, en el que se hibridizó el inserto de pH3 con los perfiles plasmídicos de diferentes cepas de *Rhizobium etli* y de diferentes especies de *Rhizobium* provenientes de distintas regiones geográficas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13, donde se observa que únicamente 5 de las 11 cepas usadas hibridizaron con el inserto de pH3. Cuatro de las señales obtenidas corresponden al plásmido simbiótico de otras cepas de *Rhizobium etli* (Figura 13, carriles 2, 4, 5 y 6), mientras que la restante pertenece a un plásmido no simbiótico de la cepa CFN299 de *Rhizobium tropici* (Figura 13, carril 10).



CARRIL

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12

ESPECIE Y NOMBRE DE LA CEPA

- Rhizobium etli*, CFN42
- Rhizobium etli*, BRA5
- Rhizobium* spp., CIAT895
- Rhizobium etli*, NITRAGIN8251
- Rhizobium etli*, TAL182
- Rhizobium etli*, VIKING1
- Rhizobium huakuii*, CCBAU2605
- Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, VF39
- Rhizobium loti*, CIAM1801
- Rhizobium tropici*, CFN299
- Rhizobium meliloti*, 2011
- Rhizobium etli*, 2001

FIGURA 13: SOUTHERN BLOT DE DIFERENTES CEPAS DEL GENERO *Rhizobium* EN EL QUE SE USO COMO DETECTOR AL INSERTO DE pH3

DISCUSION

Para localizar y aislar la región replicadora del **pSim** de CFN42 se procedió a construir cointegrados entre los cósmidos que cubren al **pSim** y un vehículo movilizable. La transferencia por conjugación de estos cointegrados y el análisis del perfil de plásmidos de las transconjugantes mediante la técnica de Eckhardt señalarían la región del plásmido capaz de replicarse autónomamente.

El uso de esta estrategia presentó varios problemas. Primero, la construcción de los cointegrados se llevó a cabo en cepas de *Escherichia coli* **recA**⁻, lo que reduce la eficiencia con la que recombinan las moléculas de cósmidos y pSUP202::Lorist 3B. Segundo, cuando los cósmidos y el pSUP202::Lorist recombinan, el plásmido generado cuenta con dos orígenes de replicación. Si en estas circunstancias ambos **ori**'s son activos, de acuerdo a Helinski, esta condición combierte al plásmido en una molécula muy inestable, pues se puede provocar replicación abortiva (Helinski, D. E., 1994). Lo anterior puede explicar el por qué de las bajas eficiencias con las que se obtuvieron los cointegrados.

Los resultados obtenidos de la movilización de los 15 cointegrados a las cepas CFNX107 y CFN42 demuestran que únicamente el cointegrado cGD47/pSUP202::Lorist 3B es capaz de replicarse en estas cepas.

Este resultado concuerda con las observaciones previas en las que se encontró que la región del **pSim** delimitada por las bandas 26 a 85 del mapa en BamHI (270 kb) puede replicarse, mientras que el resto del **pSim** no (bandas 1 a 25) (Romero, D., et al., 1995).

Por otra parte, el cGD47 además del **ori**, tiene todos los elementos relacionados con la incompatibilidad, a juzgar por los resultados obtenidos con CFN42, en donde se encontró que el cointegrado cGD47/pSUP202::Lorist 3B eliminó al **pSim**, mientras que los demás cointegrados recombinaron con el **pSim**.

La única explicación que existe para el fenómeno de incompatibilidad observada es que, tanto cGD47/pSUP202::Lorist 3B como el **pSim** se replican con el mismo **ori**. Si el **pSim** tuviera otro **ori**, ambos plásmidos podrían replicarse en el mismo fondo genético. Por otra parte, si existiera otro **ori** en **pSim**, podríamos recuperar más de un cointegrado en *Rhizobium etli*. Adicionalmente, el hecho de que los restantes 14 cointegrados recombinaran con el **pSim** apoya la hipótesis de la ausencia de otro **ori**, y la posibilidad de que un segundo **ori** hubiera sido interrumpido durante la construcción del banco de cósmidos la hemos descartado pues, como se observa la Figura 3, existen regiones traslapantes entre diferentes cointegrados que reducen esta posibilidad. Por todo lo anterior, consideramos que el cGD47/pSUP202::Lorist 3B porta al **ori** del

pSim y que este plásmido solo tiene un **ori** funcional.

El análisis de los resultados obtenidos con la cepa CFNX107 apoya que el **ori** del **pSim** se encuentra en el *cos47* y que no existen elementos de acción en *trans*, fuera de este cósmido, que participen en la replicación del **ori**. La ausencia de transconjugantes de los 14 cointegrados restantes en la cepa CFNX107 apoya la idea de un **ori** único.

Con lo que respecta a los experimentos realizados para evaluar la integridad del cointegrado, se encontró que el cósmido cGD47 estaba completo en tanto que el plásmido pSUP202::Lorist 3B se perdió. Este resultado explica la imposibilidad de transferencia del cointegrado de las transconjugantes a la cepa HB101. Tal rearreglo puede explicarse considerando que CFN42 es una cepa *recA+*, y que el cointegrado tiene dos secuencias de 3 kb en repetición directa, mismas que pueden ser blanco para un evento de recombinación homóloga intramolecular, que de ocurrir, podría conducir a la separación y pérdida de pSUP202::Lorist del fondo genético de *Rhizobium etli*.

La subclonación de los fragmentos de BamHI del cGD47 y su transferencia a la cepa CFNX107 demostró que únicamente pB79 es capaz de replicarse en la cepa usada. La posibilidad de que esta clona hubiera sufrido alteraciones en su estructura fue descartada movilizándola de las transconjugantes a HB101, y evaluando su patrón de restricción. Dado lo anterior, se concluyó que la región replicadora conteniendo al **ori** del **pSim** se encuentra en la banda 79.

Contrastando con los datos antes descritos, ninguna otra de las subclonas del cGD47 fue capaz de replicarse en CFN42, pero sí de recombinar con el **pSim**. Si comparamos a las cepas usadas como receptoras en conjugación, veremos que la principal diferencia es que CFN42 es *recA+* y que tiene al **pSim**, mientras que CFNX107 no. El hecho de que en CFNX107, pB79 se replica y en CFN42 no, señala que la eficiencia con la que se replica pB79 no es lo suficientemente elevada como para superar al evento de recombinación. Lo anterior puede deberse a que, fuera de la banda 79, se encuentran elementos que contribuyen a la eficiencia con la que se estabiliza el **ori** del **pSim**. A este respecto, se sabe que para plásmidos como el F y el NR1, el **ori** está en un *locus* separado de los elementos de estabilidad, mismos que optimizan la segregación plasmídica (Gerdes, K. y Molin, S., 1986; Loh, S. M., Cram, D. S. y Skurray, R. A., 1988; Tabuchi, A., et al., 1988). La ausencia de estos elementos disminuyen drásticamente la eficiencia con la que se estabilizan los plásmidos en cuestión.

La falta de elementos de estabilidad, aunada al hecho de que CFN42 es una cepa *RecA+*, pudieron conducir a compensar las deficiencias en estabilidad con un evento de recombinación entre el **pSim** y pB79. Este evento puede ser muy probable dada la gran zona de homología existente entre estos plásmidos. De esta recombinación, resultaría que el **pSim** tendría dos

origenes de replicación idénticos y muy cercanos entre sí, y de acuerdo a Helinski (Helinski, D. E., 1994), tales regiones provocan inestabilidad plasmídica mediada por replicación abortiva. Para contener con ello, probablemente una segunda recombinación que escindiera uno de los **ori** y mantuviera al gene de resistencia al antibiótico podría asegurar la estabilidad del **pSim**.

Dadas estas eventualidades, se esperaba que en una cepa *recA*- hubiera una mayor probabilidad de observar unidades de replicación autónoma después de transferirle nuevos plásmidos que porten al **ori**. Tal hipótesis se vio confirmada cuando se transfirieron subclonas de pB79 a CFNX107 y a CFNX101, encontrándose para ambos casos que sólo la subclona pH3 se replicó. Además, se observó que en CFNX101, pH3 fué incompatible con el **pSim**. Adicionalmente, los resultados de movilización de pH3 a partir de las transconjugantes, y su análisis de restricción, mostraron que la estructura de este plásmido no había sufrido alteraciones. Considerando todos estos resultados, se concluyó que la región replicadora con el **ori** del **pSim** se encuentra en esta banda.

Por otra parte, el hecho de que pH3 fuera incompatible con el **pSim** señala que los determinantes de incompatibilidad se encuentran en esta clona y que al menos algunos elementos de estabilidad también están presentes. Este resultado demuestra que en un fondo *recA*-, los eventos de recombinación entre las subclonas y el **pSim** son poco frecuentes, así que para que la bacteria transconjugante pueda sobrevivir en el medio de selección, resulta más sencillo que la clona introducida se mantenga como unidad de replicación autónoma, comportamiento que conduce a la pérdida del **pSim**.

El experimento en el que se transfiriera a la banda 79 a CFNX101 no se practicó, sin embargo consideramos que no afecta a las conclusiones propuestas hasta el momento pues, como se observó en el experimento antes descrito, en ausencia de *recA* las clonas que contienen al **ori** podían estabilizarse como plásmidos, y debido a que pB79 se replicó en CFNX107, esperaríamos que también lo hiciera en CFNX101.

La subclonación del inserto de pH3 y la posterior movilización de estas subclonas a las cepas CFNX107 y CFNX101 no generaron transconjugantes, lo cual sugiere dos posibilidades:

- 1) Que el **ori** fuera cortado por estas enzimas, o
- 2) Que la replicación o la estabilidad del **ori** dependieran del producto de secuencias codificantes u otro tipo de secuencias que fueron interrumpidas por acción de estas enzimas.

Cualquiera que fuera la razón, las pruebas practicadas indican que este es el menor segmento de replicación autónoma que se puede obtener del **pSim**. Su tamaño resulta ser grande (5.6 kb) sin embargo, no difiere demasiado de los conocidos para otras secuencias de replicación de plásmidos de bacterias emparentadas, mismos que fluctúan entre 4,844 y 5,024 kb (Nishiguchi,

R., Takanami, M. y Oka, A., 1987; Tabata, S., Hooykaas, P. J. J. y Oka, A., 1989; Mercado-Blanco, J. y Olivares, J., 1994; Turner, S. L. y Young, P. W., et al., 1995).

Ya que no se logró subclonar una secuencia más pequeña que se replicara en las cepas usadas, se evaluó la estabilidad de pH3, y de las otras clonas de replicación autónoma, en sus respectivos fondos genéticos. Los resultados obtenidos demostraron que la estabilidad de todas las clonas es muy elevada, lo cual constituye un elemento adicional que sugiere que los elementos relacionados con la replicación, y al menos algunos relacionados con la segregación plasmídica se encuentran en estas secuencias.

En adición, el número de copias del **pSim** y de pH3 resultó ser de 1 a 2 copias para ambos, lo cual demuestra que los elementos de regulación del número de copias se encuentran intactos y presentes en pH3. El hecho de haber encontrado un bajo número de copias para el **pSim** era de esperarse pues, como se ha observado en plásmidos mayores a 100 kb, el número de copias característico de éstos es de 1 a 2 por cromosoma (Kornberg, A. y Baker, T. A., 1992).

Relacionando los resultados de estabilidad con el número de copias de pH3, era de esperarse que un plásmido de bajo número de copias fuera muy estable. Tal estabilidad suele atribuirse a la presencia de un sistema de segregación muy eficiente, que podría involucrar la unión del replicón a la membrana citoplasmática (para asegurar que cada célula hija mantenga una copia del plásmido en cuestión) (Nordström, K. y Austin, S. J., 1989), aunque también existe la posibilidad de que el **pSim** asegure su estancia en la célula a través de mecanismos similares a los sistemas *hok-sok* (usado por el plásmido R1), *par* (del profago P1), *sop* (plásmido F) o mediante los sistemas restricción-modificación (Kulakauskas, S., Lubys, A. y Ehrlich, D., 1995).

Por otra parte, las funciones contenidas en pH3 son suficientes para permitir su replicación en el fondo genético de *Agrobacterium tumefaciens*, tal como lo demostró Rodríguez y colaboradores (Rodríguez, O., et al., datos no publicados).

Conocidas las propiedades hasta aquí mencionadas, se decidió obtener la secuencia de esta región del **pSim**, de la que se obtuvieron 5 615 nucleótidos con un contenido en GC del 55.9 %. Este porcentaje es muy similar al que se ha obtenido en el trabajo de secuenciación del resto del plásmido desarrollado por el grupo del Dr. Guillermo Dávila (comunicación personal).

Cuando se compara la secuencia obtenida con la base de datos del GeneBank a través de un FASTA, destaca el elevado porcentaje de identidad que se presenta entre pHY y el plásmido pRiA4b de *Agrobacterium rhizogenes* (77.8 %), en una zona muy grande de DNA (3 863 pb) que incluye tres regiones codificantes y dos no codificantes de tamaño pequeño (menores a 160 pb). El plásmido de *Agrobacterium* es un replicón críptico que mide 250 kb de las cuales, 4 638 pb corresponden a la menor secuencia de replicación autónoma que se pudo aislar (Nishiguchi, R.,

Takanami, M. y Oka, A. 1987). Al comparar el tamaño de la menor secuencia de replicación autónoma aislada de pRiA4b con el de pHY, resulta notoria la similitud de los mismos, pues sólo difieren en un 20 % (970 pb).

El análisis con los programas TESTCODE, CODONPREFERENCE, y la presencia de secuencias que posiblemente son blanco de unión a ribosoma, antes del codón de inicio de MLA1 y de MLA3, sugieren fuertemente que estas secuencias son transcritas y traducidas.

La comparación por separado de cada MLA muestra que los mayores porcentajes de identidad se encuentran con las regiones codificantes de las proteínas RepA, RepB y RepC de *Agrobacterium rhizogenes* (del 73 al 81 %). Los siguientes valores de identidad se observaron con los genes de RepA, RepB y RepC de *Rhizobium leguminosarum* y *Agrobacterium tumefaciens* (del 49 al 60 %). Finalmente, el menor porcentaje de identidad se encontró con las secuencias que codifican para las proteínas Rep de *Rhizobium meliloti* (del 32 al 51 %).

La información referente a las proteínas Rep las relaciona con la replicación y en particular, para el caso de Rhizobiaceas, con la replicación de plásmidos, la mayoría de ellos crípticos (Mercado-Blanco, J. y Olivares, J., 1994; Turner, S. L. y Young, P. W., et al., 1995). En Rhizobiaceas se desconoce la función que juegan las proteínas Rep sin embargo, se piensa que RepA y RepB participan en el desdoblamiento de la cadena de DNA, y que RepC es la proteína de inicio de la replicación (Tabata, S., Hooykaas, P. J. J. y Oka, A., 1989).

En todos los casos conocidos para Rhizobiaceas, la organización de estos genes es la misma, encontrándose agrupados en un operón que tiene localizado en el extremo 5' al gene *repA* y en el extremo 3' a *repC* (Nishiguchi, R., Takanami, M. y Oka, A. 1987; Turner, S. L. y Young, P. W., et al., 1995). Esta organización también se encontró en pHY, aunque desconocemos si los 3 MLA se transcriben como un operón.

En este punto, quiero mencionar una característica interesante relacionada con el tamaño de los plásmidos de Rhizobiaceas que replican por medio de Rep. El tamaño de todos es grande. Así, en *Agrobacterium rhizogenes*, el replicón pRiA4b es de 250 kb, el de *Rhizobium leguminosarum* es de 83.3 kb (pRL8JI), el de *Agrobacterium tumefaciens* mide 200 kb (pTiB6S3), y el de *Rhizobium meliloti* mide 175 kb (pRmeGR4a). Aún más interesante es el hecho de que las mSRA aisladas de estos replicones varían muy poco en tamaño. Así, para pRiA4b esta mide 4.638 kb, para pRL8JI mide 5.024 kb, en el caso de pTiB6S3 la mSRA mide 4.203 kb y para pRmeGR4a el tamaño es de 4.844 kb (Nishiguchi, R., Takanami, M. y Oka, A., 1987; Tabata, S., Hooykaas, P. J. J. y Oka, A., 1989; Mercado-Blanco, J. y Olivares, J., 1994; Turner, S. L. y Young, P. W., et al., 1995). Con lo que respecta a pHY, el tamaño de la mSRA es de 5.615 kb, mismo que es muy semejante al de los antes mencionados.

El tamaño de los replicones de Rhizobiaceas mencionados, aunado al de las mSRA y a la presencia en estas últimas de genes *rep*, sugieren un mecanismo de replicación similar mediado por las proteínas Rep.

Por otra parte, con base a los datos hasta aquí expuestos, se esperaba que al traducir las secuencias de los 3 MLA de pHY, estas mostrarán identidad con las proteínas Rep de Rhizobiaceas. Esta hipótesis fue confirmada cuando se compararon las secuencias deducidas con las de las proteínas Rep de Rhizobiaceas, encontrándose un comportamiento similar al observado con la secuencia de nucleótidos. Sobresale la elevada identidad encontrada entre las secuencias de pHY y las de las proteínas del plásmido pRiA4b. Estas fueron del 92 % para RepA, 70 % para RepB, y 69 % para RepC.

Relacionando los datos de organización de los tres MLA de pHY, su similitud a nivel de DNA y de proteína con secuencias relacionadas con la replicación, y el hecho de que se encuentran en la mínima secuencia de replicación autónoma aislada del pSim de CFN42, podemos pensar que MLA1 corresponde al gene de *repA*, MLA2 a *repB* y MLA3 a *repC*, y que estos genes cumplen las mismas funciones que se les han atribuido en otras Rhizobiaceas. En este sentido, la búsqueda de motivos en las secuencias polipeptídicas de las tres proteínas mostró que en RepC existe una secuencia de 18 aminoácidos que es 61 % idéntica a la secuencia consenso para el sitio de unión de ATP presente en proteínas que se unen al DNA, tales como DnaA. Este resultado apoya la hipótesis de que RepC es la proteína de inicio de la replicación para el pSim de *Rhizobium etli*.

Con respecto a RepA, se encontró una señal que sugiere que esta proteína se une a membrana plasmática. Aun cuando la proteína RepA de Rhizobiaceas aparentemente participa en el desdoblamiento de la cadena de DNA, la proteína RepA de pHY muestra identidad con otras implicadas en las funciones de partición de plásmidos de *Escherichia coli* (Abeles, A. L., Friedman, S. A. y Austin, S. J., 1985; Mori, H., et al., 1986). Estas proteínas son SopA y ParA, quienes tienen una identidad del 36 y 19 % respectivamente con RepA del pSim. La zona de identidad abarca la misma posición en la que se encontró el motivo de unión a membrana.

Si bien es cierto que los porcentajes de identidad son bajos, y además de que se trata de proteínas de organismos poco emparentados, la coincidencia de dos argumentos que sugieren la función de partición para RepA nos lleva a atribuirle esta posible función.

Para el caso de RepB no se encontraron motivos en su secuencia, por lo que aún se carecen de indicios de su función en la replicación del pSim de CFN42.

Un último punto a discutir con respecto a las proteínas Rep de Rhizobiaceas se refiere a los resultados de su alineamiento. Las regiones conservadas sugieren una fuerte presión de selección que puede deberse a un estricto compromiso funcional. Como puede observarse en las Figuras 10

a la 12, la elevada identidad que existe entre las proteínas de *Rhizobium etli* y las de *Agrobacterium rhizogenes* las relaciona mucho. Un comportamiento similar se observa entre las proteínas Rep de *Rhizobium leguminosarum* y *Agrobacterium tumefaciens*.

El hallazgo de proteínas relacionadas con la replicación del **pSim** es importante sin embargo, no definen a un **ori**.

A este respecto, recordemos que un **ori** se localiza principalmente en zonas no codificantes, que suele ser pequeño (de 200 a 800 pb) y que está formado por secuencias directas e inversas repetidas ricas en AT, secuencias de unión a proteínas de inicio de la replicación, elementos relacionados con la regulación de la replicación, y en ocasiones, secuencias GATC.

La búsqueda de estos elementos a través de todo pHY mostró dos zonas interesantes. La primera corresponde a la región intergénica existente entre **repB** y **repC**, misma que mide 155 pb y presenta 1 secuencia directa repetida de 7 nucleótidos de largo rica en AT (71.4 %), y 3 secuencias inversas repetidas de 7 a 9 nucleótidos de largo ricas en GC. Es importante mencionar que esta región tiene una identidad del 91.6 % con la secuencia intergénica del plásmido pRiA4b de *Agrobacterium tumefaciens*, y que estudios establecidos por Turner y colaboradores señalan que tal región se encuentra muy conservada entre las SRA conocidas para *Rhizobium* (Turner, S. L. y Young, P. W., et al., 1995).

Si relacionamos la presencia de 4 secuencias repetidas, en una pequeña región no codificante altamente conservada, y que se localiza entre dos genes relacionados con la replicación, puede pensarse que tal región tiene una función biológica fuertemente seleccionada, así que la posibilidad de que la zona intergénica entre **repB** y **repC** corresponda al **ori** del **pSim** resulta atractiva.

La segunda región en la que podría estar localizado el **ori** del **pSim** se encuentra en los últimos 556 nucleótidos de pHY, en donde existe una elevada densidad de secuencias directas repetidas (8), más 1 inversa repetida, todas ricas en GC y de 7 a 9 nucleótidos de largo. Aún más sugestivo es el hecho de que esta zona tiene un contenido de AT superior al 50 % y que en ella se localizó una secuencia que es 89 % idéntica al consenso del **oriT** del plásmido pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens* (Cook, D. M. y Farrand, S. K., 1992), misma que esta rodeada de 6 secuencias GATC.

Secuencias de 7 nucleótidos, como las que forman las secuencias repetidas de pHY, pueden encontrarse cada 16.38 kb si la distribución es al azar. De la misma manera, secuencias de 4 nucleótidos, como las del sitio de metilación (GATC), se localizarían cada 256 nucleótidos. Tomando en cuenta la baja probabilidad de encontrar una región con 8 secuencias repetidas de 7 nucleótidos de largo, que además se extiende en una región cuyo contenido de AT es mayor al

50 % y que tenga tal densidad de secuencias GATC, pensamos que en esta región se encuentra el **ori** del **pSim**. Ninguna otra zona de **pHY** conjunta los elementos mencionados, lo cual también apoya la hipótesis descrita. A pesar de que sospechamos que el **ori** del **pSim** se encuentra en la región antes citada, no contamos con elementos contundentes que señalen que esta zona corresponde al **ori** sin embargo, consideremos los siguientes datos:

a) En esta región existe una secuencia similar a un **oriT** el cual se sabe, puede sostener la replicación de plásmidos de 100 kb (como el F de *Escherichia coli*), mediante un sistema de replicación por círculo rodante (Kornberg, A. y Baker, T. A., 1992).

b) Algunas proteínas Rep de Enterobacterias y Staphylococcus participan en la replicación por círculo rodante.

Aunque los anteriores argumentos se basan en datos obtenidos con bacterias diferentes a *Rhizobium*, pueden apoyar la hipótesis de que el **ori** del **pSim** se encuentra de la posición 5 368 a 5 376 del inserto de **pHY**, y que probablemente se replica por círculo rodante.

Si esta hipótesis es correcta, el **pSim** es el plásmido más grande que replica por círculo rodante hasta ahora descrito.

Por otra parte, al usar como sonda al inserto de **pH3** sobre los perfiles plasmídicos de diferentes especies de *Rhizobium*, se encontró que secuencias homólogas a la región replicadora del **pSim** de CFN42 están presentes en plásmidos simbióticos de diferentes cepas de *Rhizobium etli*, mientras que en otras especies, solo se encontró señal con un plásmido críptico de la cepa CFN299 de *Rhizobium tropici*. Este resultado concuerda con observaciones previas en las que se encontró que los diferentes cósmidos del **pSim** de CFN42 hibridizan con los plásmidos simbióticos de cepas de *Rhizobium etli* de diferentes regiones geográficas (Rodríguez, O., Girard, M. L. y Dávila, G., 1993). Si consideramos ambas observaciones y las relacionamos con la reciente demostración de que el **pSim** de la cepa TAL182 es incompatible con el **pSim** de CFN42 (Vázquez, H. datos no publicados), podemos sugerir que todos los **pSim** de *Rhizobium etli* analizados poseen la misma región replicadora.

No obstante, el hecho de que se haya obtenido hibridización con un plásmido críptico de la cepa CFN299 de *Rhizobium tropici*, y la homología encontrada a nivel de secuencia con plásmidos de otras Rhizobiaceas, señala que las secuencias similares a la región replicadora del **pSim** de CFN42 no son exclusivas de la especie *Rhizobium etli*. Esta conclusión se ve apoyada por los datos obtenidos por Turner y colaboradores, quienes analizaron las secuencias de **repC** de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* y de *Sinorhizobium*, encontrando una gran diversidad genética en tales secuencias (Turner, S. L., et al., 1996). Adicionalmente, Burgos y colaboradores también identificaron secuencias de **repC**, y secuencias río arriba de **repC**, en

diferentes cepas de *Sinorhizobium* y en el **pSim** de la cepa CFN299 de *Rhizobium tropici* (Burgos, P. A., Velázquez, E. y Toro, N., 1996). Los anteriores datos sugieren que al menos las secuencias **repC** podrían ser características de las Rhizobiaceas, y que descienden de un ancestro común.

Finalmente, la evidencia presentada en este trabajo es muy sugestiva, y puede ser usada para posteriores estudios, como los que se enlistan a continuación:

- a) Establecimiento del tipo de replicación del **pSim**
- b) Dilucidación del proceso evolutivo del **pSim**
- c) Evolución de las proteínas Rep de *Rhizobium*
- d) Alteración del número de copias del **pSim** para evaluar su efecto en nodulación y simbiosis.
- e) Fabricación de vectores moleculares para *Rhizobium*, y otros más.

CONCLUSIONES

1. El **pSim** de CFN42 presenta un solo **ori**, que se localiza en la banda 79 del mapa de restricción de **BamHI**.
2. La menor secuencia de replicación autónoma (**pH3**) obtenida del **pSim** mide 5 615 pb, y contiene a los elementos de regulación del número de copias y al menos, algunos relacionados con la estabilidad.
3. La estabilidad del **cGD47**, **pB79** y **pH3** en *Rhizobium etli* es muy elevada.
4. El número relativo de copias del **pSim** y de **pH3** va de 1 a 2 con respecto al cromosoma.
5. En **pH3** existen 3 regiones relacionadas con los genes **repABC**, involucrados en la replicación de plásmidos de Rhizobiaceas.
6. Las tres proteínas **Rep** de **pH3** muestran porcentajes de identidad muy elevados (del 70 al 90 %) con las del plásmido **pRiA4b** de *Agrobacterium rhizogenes*.
7. Las proteínas **Rep** de **pH3** están emparentadas con las proteínas **Rep** de *Agrobacterium* y de *Rhizobium*.
8. En **pH3** existe una región de aproximadamente 550 pb que tiene alta probabilidad de contener al **ori** del **pSim** de CFN42.
9. La mínima región replicadora del **pSim** de CFN42 se encuentra conservada en los plásmidos simbióticos de las diferentes cepas de *Rhizobium etli* probadas.

REFERENCIAS

- Abeles, A. L., Friedman, S. A. y Austin, S. J. (1985). Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region. *J. Mol. Biol.*, 185: 261-272.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1989). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc; 2a edic; USA, pp. 727-790.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Austin, S. y Nordstrom, K. (1990). Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell*, 60: 351-354.
- Baker, T. A. y Wickner, S. H. (1992). Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 26: 447-477.
- Bazaral, M. y Helinski, D. R. (1970). Replication of a bacterial plasmid and an episome in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 9: 399-406.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 41: 459-472.
- Bramhill, D. y Kornberg, A. (1988). Duplex opening by DnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, 52: 743-755.
- Brom, S., García de los Santos, A., Girard, L., Dávila, G., Palacios, R. y Romero, D. (1991). High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J. Bact.*, 173: 1344-1346.
- Burgos, P. A., Velázquez, E. y Toro, N. (1996). Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in Rhizobia. *MPMI*, 9: 843-849.
- Campbell, J. L. y Kleckner, N. (1990). *E. coli* *oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from *dam* methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell*, 62: 967-979.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. y Dénerié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229-242.
- Clarey, J. M., Smith, D. W., Harding, N. E. y Zyskind, J. W. (1982). Primary structure of chromosomal origins (*oriC*) of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*: Comparisons and evolutionary relationships. *J. Bact.*, 150: 1467-1471.
- Cook, D. M. y Farrand, S. K. (1992). The *oriT* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J. Bact.*, 174: 6238-6246.

- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. y Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microb. Rev.*, 52: 375-395.
- Durland, R. H. y Helinski, D. R. (1987). The sequence encoding the 43-kilodalton *trfA* protein is required for efficient replication or maintenance of minimal RK2 replicons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plasmid*, 18: 164-169.
- Figurski, D. H. y Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1648-1652.
- Firshein, W. (1972). The DNA/membrane fraction of pneumococcus contains a DNA replication complex. *J. Mol. Biol.*, 70: 383-397.
- Firshein, W. y Gelman, I. (1981). Enrichment of DNA polymerase III activity in a DNA membrane complex purified from pneumococcus: The possible existence of subcomplexes. *Mol. Gen. Genet.*, 182: 87-94.
- Fuller, R. S., Funell, B. E. y Kornberg, A. (1984). The *DnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell*, 38: 889-900.
- Gerdes, K. y Molin, S. (1986). Partitioning of plasmid R1. Structural and functional analysis of the *parA* locus. *J. Mol. Biol.*, 190: 269-279.
- Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. y Dávila, G. (1991) Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*. *J. Bact.*, 173: 2411-2419.
- Helinski, D. E. (1994). Simposio Internacional para conmemorar 25 años de actividad profesional del Dr. Rafael Palacios. Cuernavaca, Morelos, México.
- Hiraga, S. (1993). Chromosome partition in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Genetics and Development*, 5: 789-801.
- Hynes, M. F., Brucksch, K. y Priefer, U. (1988). Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. *Arch. Microbiol.*, 150: 326-332.
- Ingmer, H. y Cohen, S. N. (1993). The pSC101 *par* locus alters protein-DNA interactions in vivo at the plasmid replication origin. *J. Bact.*, 175: 6046-6048.
- Inuzuka, N., Inuzuka, M. y Helinski, D. R. (1980). Activity in vitro of three replication origins of the antibiotic resistance plasmid RSF1040. *J. Biol. Chem.*, 255: 11071-11074.
- Jacq, A., Kohlyama, M., Luther, M. y Messer, W. (1983). Recognition sites for a membrane-derived DNA binding protein preparation in the *E. coli* replication origin. *Mol. Gen. Genet.*, 191: 460-465.
- Jacq, A., Kern, R., Tsugita, A. y Kohlyama, M. (1989). Purification and characterization of a low-molecular weight membrane protein with affinity for the *Escherichia coli* origin of replication. *J. Bact.*, 171: 1409-1416.

- Koch, A. L., Mobley, H. L. T., Doyle, R. J. y Streips, U. N. (1981). The coupling of wall growth and chromosome replication in gram-positive rods. *FEMS Microb. Letters*, 12: 201-208.
- Kornberg, A. y Baker, T. A. (1992). *DNA Replication*. W. H. Freeman and Co; 2a edic; USA, pp. 511-552.
- Kües, U. y Stahl, U. (1989). Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microb. Rev.*, 53: 491-516.
- Kulakauskas, S., Lubys, A. y Ehrlich, S. D. (1995). DNA Restriction-Modification systems mediated plasmid maintenance. *J. Bact.*, 177: 3451-3454.
- Kusano, T., Steinmetz, D., Hendrickson, W. G., Murchie, J., King, M., Benson, A. y Schaechter, M. (1984). Direct evidence for specific binding of replication origin of the *Escherichia coli* chromosome to the membrane. *J. Bact.*, 158: 313-316.
- Laffan, J. y Firshein, W. (1988). Origin-specific DNA-binding membrane-associated protein may be involved in repression of initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7452-7456.
- Leemans, J., Soberón, G., Cevallos, M. A., Fernández, L., Pardo, M. A., de la Vega, H., Flores, M., Quinto, C. y Palacios, R. (1984). General organization of *R. phaseoli* *nif* plasmids, p.170. En C. Veeger y W. E. Newton (ed.), *Advances in nitrogen fixation reserch*. Nijhoff, Junk and Pudoc, The Hague, The Netherlands.
- Lehninger, A. L. (1978). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Omega, 2a edic; España, pp. 903-940.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press, USA; pp. 527-602.
- Lewis, K. B. y Helinski, D. R. (1993). Plasmid incompatibility and replication control. En: D. B. Clewell (ed.), *Bacterial Conjugation*, Plenum Press, USA, pp. 223-242.
- Lidstrom, M. E. (1991). Genetic approaches in bacteria with no natural genetic systems. En U. N. Streips y R. E. Yasbin (ed.), *Modern Microbial Genetics*, Wiley-Liss, Inc., USA, pp. 497-512.
- Linder, P. G., Churchward, G. y Caro, L. (1983). Plasmid pSC101 replication mutants generated by insertion of the transposon Tn1000. *J. Mol. Biol.*, 170: 287-303.
- Loh, S. M., Cram, D. S. y Skurray, R. A. (1988). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a third function (Flm) involved in F-plasmid maintenance. *Gene*, 66: 259-268.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Marczynski, G. T. y Shapiro, L. (1993). Bacterial chromosome origins of replication. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 775-782.
- Margolin, W. y Long, S. R. (1993). Isolation and characterization of a DNA replication origin from the 1 700-kilobase-pair symbiotic megaplasmid pSym-b of *Rhizobium meliloti*. *J. Bact.*, 175: 6553-6561.

- Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Annual Rev. Biochem.*, 61: 673-719.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martins, M. F., Antonio, F. A., Graham, P. y Aurelio, P. M. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bact.*, 41: 417-426.
- Martínez-Salazar, J. M., Romero, D., Girard, M. L. y Dávila, G. (1991). Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bact.*, 173: 3035-3040.
- Mathews, Ch. K. y van Holde, K. E. (1990). *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Co; USA, pp. 817-859.
- McEachern, M. J., Filutowicz, M. y Helinski, D. R. (1985). Mutations in direct repeat sequences and in a conserved sequence adjacent to the repeats result in a defective replication origin in plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1480-1484.
- Mei, J., Benashski, S. y Firshein, W. (1995). Interactions of the origin of replication (*oriV*) and initiation proteins (TrfA) of plasmid RK2 with submembrane domains of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 177: 6769-6772.
- Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. (1994). The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of Agrobacterium plasmids. *Plasmid*, 32: 75-79.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Mori, H., Kondo, A., Oshima, A., Ogura, T. y Hiraga, S. (1986). Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J. Mol. Biol.*, 192: 1-15
- Mozo, T. Cabrera, E. y Ruiz-Argüeso, T. (1990). Isolation of the replication DNA region from a *Rhizobium* plasmid and Examination of its potential as a replicon for Rhizobiaceae cloning vectors. *Plasmid*, 23: 201-215.
- Nakai, K. y Kanehisa, M. (1991). Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 11: 95-110
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. USA, pp. 293-298.
- Neilan, J., Heery, D. y Dunican, L. K. (1986). Isolation of replication loci of plasmid origin from *Rhizobium trifoli*. *Biochem. Soc. Trans.*, 14: 478.
- Nishiguchi, R., Takanami, M. y Oka, A. (1987). Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.*, 206: 1-8.
- Noel, K. D., Sánchez, F., Fernández, L., Leemans, J. y Cevallos, M. A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bact.*, 158: 148-155.
- Nordström, K. y Austin, S. J. (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annual Rev. Genet.*, 23: 37-69.

Nordström, K. (1990). Control of plasmid replication-how do DNA iterons set the replication frequency ?. *Cell*, 63: 1121-1124.

Norris, V. (1993). Sequestration of origins of chromosome replication in *Escherichia coli* by lipid compartments: The pocket hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 164: 239-244.

Novick, R. P. (1987). Plasmid Incompatibility. *Microb. Rev.*, 51: 381-395.

Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Prakash, R. K., Schilperoort, R. A. y Cannon, F. A. (1979). Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium plasmids*. *Nature*, 282: 533-535.

Ogden, G. B., Pratt, M. J. y Schaechter, M. (1988). The replicative origin of the *Escherichia coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell*, 54: 127-135.

Piñero, D., Martínez, E. y Selander, R. K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2825-2832.

Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448.

Perlman, D. y Rownd, R. H. (1976). Two origins of replication in composite R plasmid DNA. *Nature*, 259: 281-284.

Quinto, C. H., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. A., Pardo, M. A., Azpiroz, R., Girard, M. L., Calva, E. y Palacios, R. (1985). Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1170-1174.

Rodríguez, O., Girard, M. L. y Dávila, G. (1993). Structure and evolution of the symbiotic genomes of *Rhizobium phaseoli*. En: R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton (ed.), *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 646.

Romero, D., Martínez-Salazar, J., Girard, M. L., Brom, S., Dávila, G., Palacios, R., Flores, M. y Rodríguez, C. (1995). Discrete amplifiable regions (Amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bact.*, 177: 973-980.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.

Sekimizu, K., Yung, B. Y. y Kornberg, A. (1988). The DNA protein of *Escherichia coli*: Abundance, improved purification, and membrane binding. *J. Biol. Chem.*, 263: 7136-7140.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. y Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Reserch*, 16: 7583-7600.

Siccardi, A. G., Shapiro, B. M., Hirota, Y. y Jacob, F. (1971). On the process of cellular division in *Escherichia coli*. IV. Altered protein composition and turnover of the membranes of thermosensitive mutants defective in chromosomal replication. *J. Mol. Biol.*, 56: 475-490.

- Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology*, 1: 784-791.
- Singer, M. y Berg, P. (1991). *Genes & genomes. A changing perspective*. University Science, USA, pp. 74-102.
- Smith, D. W., Yee, T. W., Baird, C., y Krishnapillai, V. (1991). Pseudomonad replication origins: a paradigm for bacterial origins ?. *Mol. Microbiol.*, 5: 2581-2587.
- Southern, E. M. (1975). Detection of sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
- Tabata, S., Hooykaas, P. J. J. y Oka, A. (1989). Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bact.*, 171: 1665-1672.
- Tabuchi, A., Min, Y-N., Kim, C.V. K., Fan, Y-L., Womble, D. D. y Rownd, R. H. (1988). Genetic organization and nucleotide sequence of the stability locus of IncFII plasmid NR1. *J. Mol. Biol.*, 202: 511-525.
- Turner, S. L. y Young, P. W. (1995). The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8JI. *FEMS Microbiology Letters*, 133: 53-58.
- Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Power, R. S., Amarger, N. y Young, P. W. (1996). Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 142: 1705-1713.
- van Kammen, A. (1995). The molecular development of nitrogen fixing root nodules. En: I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov y W. E. Newton (ed.), *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 9-14.
- van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microb. Rev.*, 59: 124-142.
- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A. y Weiner, A. M. (1987). *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Co; 4 edic; USA, pp. 282-311.
- Wheatcroft, R., McRae, D. G. y Miller, W. (1990). Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 3: 9-17.
- Willets, N. (1985). Plasmids. En: J. Scaife, D. Leach y A. Galizzi (ed.), *Genetics of Bacteria*. Academic Press Inc; USA, pp. 165-195.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33: 103
- Yoshikawa, H. y Ogasawara, N. (1991). Structure and function of DnaA and the DnaA-box in eubacteria: evolutionary relationships of bacterial replication origins. *Mol. Microbiol.*, 5: 2589-2597.

APENDICES

APENDICE I

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

	Luria Broth (LB)	Peptone-Yeast (PY)
Peptona de caseína	10 g	5 g
Extracto de levadura	5 g	3 g
Cloruro de sodio	10 g	
Cloruro de calcio 0.7 M		10 ml
Agua tridestilada	cbp 1 lt	cbp 1 lt

En caso de medios sólidos se agregaron 15 g de agar bacteriológico por litro (antes de esterilizar por autoclave).

El CaCl_2 0.7 M se esterilizó en autoclave.

Los medios esterilizados fueron vaciados en cajas petri (aprox.30 ml/caja) dentro de una campana de flujo laminar.

Las bacterias *Escherichia coli* se cultivaron en LB a 37 °C, mientras que *Rhizobium etli* se cultivó en PY a 30 °C.

PREPARACION Y ESTERILIZACION DE ANTIBIOTICOS

<u>Antibiótico</u>	<u>Se prepararon</u>	<u>Se usaron (Conc. Final)</u>
Clorafenicol (Cm)	100 mg/ml en Metanol	100 µg/ml
Kanamicina (Km)	30 mg/ml en agua	30 µg/ml
Acido Nalidíxico (Nal)	20 mg/ml en NaOH 0.1 M	20 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 mg/ml en Etanol al 50 %	10 µg/ml
Espectinomicina (Sp)	100 mg/ml en agua	100 µg/ml
Carbenicilina (Cb)	100 mg/ml en agua	100 µg/ml

Los antibióticos se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 µ (previamente esterilizada en autoclave).

ESTERILIZACION EN AUTOCLAVE

El tiempo de esterilización fué de 30 min y se inicio cuando la cámara alcanzó 1.4 Kg/cm² y una temperatura de 120 °C.

Al terminar el tiempo de esterilización, se bajó la presión en escape lento si había líquidos, y en escape rápido si solo había material sólido.

APENDICE II

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA CONJUGACION BACTERIANA

REACTIVOS

- MgSO₄·7H₂O (10 mM)-Tween 40 (0.01%).
MgSO₄·7H₂O 1.232 g
Tween 40 50 µl
Agua tridestilada 500 ml
Esta solución era esterilizada en autoclave.

APENDICE III

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA TRANSFORMACION GENETICA

REACTIVOS

- Cloruro de calcio 100 mM
Cloruro de calcio 1.1 g
Agua tridestilada 100 ml
Se filtró y esterilizó en autoclave

APENDICE IV

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA PURIFICACION DE DNA TOTAL

REACTIVOS

- TRIS 1 M, pH=8.0.		- EDTA 0.25 M, PH=8.0.	
Trizma Base 121.14 g		EDTA(Na ₂) 93.05 g	
Agua tridestilada 950.0 ml		Agua tridestilada 950.0 ml	
Se ajustó el pH con HCl		Se ajustó el pH con NaOH	
Se aforó a 1 lt		Se aforó a 1 lt	
Se filtró y esterilizó en autoclave		Se filtró y esterilizó en autoclave	

- PRONASA: Se disolvieron 5 mg de Pronasa en 1 ml de TRIS-EDTA (TE) 50:20, pH=8.0 y se digirió 1 hr a 37 °C.

- RNAasa: Se disolvieron 30 mg de RNasa en 1 ml de agua HPLC y se digirió 10 min a 95 °C.

- SATURACION DE FENOL: Se adicionó a una botella de fenol 100 ml de TE 10:1, pH=8.0 y se dejó en agitación hasta que se obtuvo una emulsión.

- MEZCLA FENOL:CLOROFORMO:ALCOHOL ISO-AMILICO: Se mezclaron 24 ml de Fenol, 24 ml de Cloroformo y 1 ml de alcohol iso-amílico. Se almacenó en frasco ámbar a 4 °C.

APENDICE V

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO

REACTIVOS

- Solución I.

Dextrosa 50 mM	2.252 g
EDTA 10 mM, pH=8.0	5.0 ml
Trizma Base 25 mM, pH=8.0	3.125 ml
Agua tridestilada	250 ml

Se filtró y esterilizó en autoclave

- Solución II.

NaOH 10 M	0.1 ml
Agua tridestilada	4.4 ml
SDS al 10 % en agua	0.5 ml

- Solución III.

Acetato de potasio 5 M	60.0 ml
Acido acético glacial	11.5 ml
Agua tridestilada	28.5 ml

APENDICE VI

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE DNA

REACTIVOS.

- Solución Amortiguadora TRIS-Boratos 5X.

Trizma Base 89 mM	53.89 g
Acido Bórico 89 mM	27.51 g
EDTA Na ₂ .2H ₂ O 2mM	3.72 g
Agua tridestilada	1 lt

- Solución Amortiguadora TRIS-Acetatos 10X.

Trisma Base	48.4 g
Acido Acético glacial	11.42 ml
EDTA Na ₂ .2H ₂ O	20 ml
Agua tridestilada	1 lt

APENDICE VII

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA ECKHARDT HORIZONTAL

REACTIVOS

- N-laurilsarcosinato 0.3 %

N-laurilsarcosinato	0.3 g
Agua tridestilada	100 ml

- Ficoll 20 % en TE 10:1

Ficoll (400 000)	2 g
TE 10:1	10 ml

- Solución de lisis

RNAse A	0.4 mg
Azul de Bromofenol	1 mg
TE 10:1	1 ml

- SDS al 10 %/Xilen-cianol

SDS	1 g
Xilen-cianol	5 mg
Agua tridestilada	10 ml

Se calentó a 95 °C durante 10 min.

APENDICE VIII

PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA SOUTHERN BLOT

REACTIVOS PARA TRANSFERENCIA DE GELES A PAPELES DE NYLON

- HCl 0.25 M

HCl	20.4 ml
Agua destilada	cbp 1 lt

- NaOH 0.5 M + NaCl 1.5 M

NaOH	19.99 g
NaCl	87.6 g
Agua destilada	1 lt

- TRIS 0.5 N + NaCl 1.5 M

TRIS	60.57 g
NaCl	87.5 g
Agua destilada	1 lt

pH = 7.4

REACTIVOS PARA MARCAJE RADIOACTIVO

- SSC 20X

Cloruro de sodio	175.2 g
Citrato de sodio	88.2 g
Agua tridestilada	1 lt