



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y Posgrado del Colegio de
Ciencias y Humanidades

TRANSFORMACION GENETICA DE *Neurospora crassa* CONSTRUCCION Y UTILIZACION DE PLASMIDOS RECOMBINANTES

T E S I S

Que para optar por el título de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P r e s e n t a :

OSCAR RODRIGUEZ SANCHEZ

1 9 8 4

28290
T.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

La desgarradura del intelectual
es un tema que suele desvelar
a intelectuales poco desgarrados
pero de todos modos
hay desgarraduras

y desgarraduras

no es lo mismo sentirse desgarrado
entre la clara vocación y el borroso deber
que entre el deber y la comodidad

entre la tortura y el miedo a flaquear
que entre las ganas de flaquear y el laurel

entre la primera y la segunda patria
que entre la patria y el invasor
pero en especial no ha de meterse
en el mismo capítulo ni en el mismo saco
a aquel poeta que se sienta desgarrado
entre la fundación ford

y la agencia central de inteligencia
y aquel otro cuya desgarradura viene
de que su pellejo y no su estilo
ha sido efectivamente desgarrado
por las atroces herramientas de
algún verdugo criollo
adiestrado en albrook o en okinawa.

Mario Benedetti.

Hay hombres que luchan un día
y son buenos
hay otros que luchan un año
y son mejores
hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos
pero, hay quienes luchan toda la vida
esos son los imprescindibles.

Bertolt Brecht.

Dedico esta tesis al esfuerzo humano
y amor de toda mi familia,
por su lucha inquebrantable
por su confianza.

A mis padres, por su amor, por la
sonrisa a la vida y por su actitud
de cambio.

A mis hermanas por su amor y alegría,
a César por su apoyo y rectitud.

A las familias Mergold-Love y López-Valdivia
por su apoyo, crítica y por aceptarme.

Al pueblo.

A mi querida "Wild Type"
(Magie) por enseñarme la
naturaleza de la vida.

"Lo que engaña a los hombres no es la experiencia, madre de todas las artes y las ciencias, sino la imaginación, que les promete lo que la experiencia no puede dar. Dicensiendo la mentira de la verdad, las experiencias nos enseñan a tender hacia lo posible, no a contar, por ignorancia, con lo inalcanzable, a fin de que si nos engañamos con nuestras ilusiones, no nos abandonemos a la desesperación".

Leonardo de Vinci.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Enrique González, al Dr Mario Castañeda, al Dr. Guillermo Dávila, a la Dra. Alejandra Covarrubias y a los licenciados Mario Rocha y David Romero, por su gran apoyo y contribución en mi formación académica, así como por su amistad, crítica y charlas filosóficas. A mis amigos inquebrantables, que me descubrieron el valor de la amistad (Víctor, Diana, Gerardo, Héctor, Francisco, Erick, Raúl, Arturo Mora y Carlos Rosas y a los señores Gerardo, Pablo, Marcela, Lupe, Esther y Eugenia). A mis compañeros de generación Margga, Marcela, Alma, Jaime y especialmente a Edna, Alberto, Nora y Lorenzo (miembro honorario) por sus pláticas de la vida, alegría y reventones académico-sociales compartidos. A Memo-Susanita y Bernardo-Susi por su hospitalidad, al "Mongol Team" (Jaime Padilla, Jesús Aguirre y Jorge Verduzco) por compartirme su actitud a la vida así como a Ricardo, María Elena y Laurita. A Irene, Martha, Paty y la "terrible" Vichido por su cariño y sonrisa. A los compañeros de las casitas (Marco, Jordi, Hiram, Jorge, Mario, Enrique, Alejandrita, Margarita, Irma y Brenda) por su compañía.

Al. "Central Core" (Lupita, Gloria, Gina, José y agregados culturales) por los reventones (especialmente a Alicia). Al personal que nos ayuda en el laboratorio con el material, el café y las instalaciones (Mary, Don Juanito, Lino, Arturo, Fausto y especialmente a Carmelita), a Rosy, Paty y Lupita por su cariño. A todas las personas que laboran en el CIFN y a las sesiones de guitarra.

"Esta al fin me engulle
y mientras por su esófago paseo
voy pensando en que vendrá
pero se destruye
cuando llego a su estómago
y planteo con un verso una verdad"

S. Rodríguez.

TRANSFORMACION GENETICA DE

Neurospora crassa

CONSTRUCCION Y UTILIZACION

DE

PLASMIDOS RECOMBINANTES

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION
SOBRE FIJACION DEL NITROGENO U.N.A.M. BAJO LA DIRECCION DEL
DR. J. GUILLERMO DAVILA RAMOS, A QUIEN AGRADEZCO SU PACIENCIA
, CRITICA, ENSEÑANZA Y AMISTAD.

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1-11.
MATERIALES Y METODOS	11-21
RESULTADOS	21-26
FIGURAS	26-36
TABLAS	36-42
DISCUSION Y CONCLUSIONES	42-52
BIBLIOGRAFIA	52-57
AGRADECIMIENTOS.	

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

Uno de los avances más importantes en la biología, fué identificar el ácido desoxirribonucléico (DNA) como la molécula portadora de la información genética. Este descubrimiento llevó al planteamiento de la siguiente pregunta: ¿Como se organiza, se expresa y se regula esta información?

Esta pregunta ha sido abordada experimentalmente con dos enfoques. El primero es de tipo fisiológico donde se estudian las señales de comunicación entre el genoma y el citoplasma, y el segundo, es de tipo estructural en el cuál se analiza la organización del genoma.

Los organismos procariontes son de fácil manejo en el laboratorio, y tienen un contenido bajo de DNA, estas característi--cas han facilitado el estudio de la regulación y la expresión genética en estos organismos. La posibilidad de avanzar en el conocimiento del genoma eucarionte depende de un modelo experimental de manejo sencillo en el laboratorio.

Neurospora crassa (*N.crassa*) es un modelo experimental eucarionte sencillo que forma parte del grupo de hongos llamados ascomi--cetos, es un organismo aeróbico que presenta diferentes estadios de diferenciación a lo largo de su ciclo de vida (Fig.1), su reproducción puede ser de tipo sexual o asexual y no es patógeno - para plantas o animales.

Este hongo se puede cultivar fácilmente en el laboratorio, - ya que sus requerimientos nutricionales están bien definidos (1) Utiliza monosacáridos como glucosa, fructosa, manosa, xilosa y - algunos disacáridos como sacarosa, maltosa, celobiosa ó trehalo--sa. La fuente de nitrógeno puede ser suministrada como amonio, urea, nitrato, purinas o aminoácidos y también requiere algunas - sales, además de la vitamina biotina. *N.crassa* crece en un rango--de temperatura de 5°C hasta 42°C y en cuanto a la acidez del me-

dio, esta puede variar entre pH 4.0 y pH 7.5 (1). Además se puede restringir el crecimiento del hongo a forma colonial si se -- cultiva con pequeñas cantidades de glucosa y fructosa en presencia de sorbosa (2). Otra posibilidad de manejo en este hongo, es que se pueden fusionar liposomas a las hifas de una mutante que carece de pared (3), así como microinyectar soluciones y organelos (4,5).

Estas características han hecho a este ascomiceto un modelo experimental atractivo para el estudio de la expresión y de la -- regulación genética en organismos eucariontes y ha sido objeto -- de estudio con enfoques experimentales de tipo fisiológico, bioquímico, genético y de microscopía (6-9).

En el laboratorio del Dr. Jaime Mora y en nuestro laboratorio, *N.crassa* ha sido utilizada como modelo experimental para el estudio del metabolismo nitrogenado y se ha abordado este estudio con enfoques experimentales distintos (10-16). Estos enfoques abarcan estudios fisiológicos que se han correlacionado con actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de amonio en condiciones de crecimiento de limitación ó de exceso de nitrógeno en el medio (glutamino sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa). Una de las enzimas más estudiadas en este laboratorio es la glutamino sintetasa, en la cuál se ha podido relacionar los estados oligoméricos de la enzima y las subunidades polipeptídicas que la forman, con las distintas condiciones de crecimiento del hongo. Cuando el nitrógeno es limitante -- en el medio, glutamino sintetasa se estructura en un tetrámero -- constituido principalmente por el polipéptido α , y cuando el nitrógeno se encuentra en exceso, la enzima se estructura en un octámero formado principalmente por la subunidad β . También se ha estudiado la expresión de glutamino sintetasa a nivel de la producción del ácido ribonucléico (RNA) mensajero específico y se -- han aislado mutantes que afectan esta regulación metabólica.

Una alternativa para estudiar la organización, la expresión y la regulación genética, como es el caso en el metabolismo nitrogenado, es desarrollar un sistema de transformación genética.

En particular, en nuestro laboratorio estamos interesados - en implementar esta metodología en *N. crassa*, ya que esta metodología permite, desde identificar y aislar genes involucrados en una función, así como la modificación *in vitro* de esta información y su introducción de nuevo a la célula, con la finalidad de analizar su efecto *in vivo*.

La transformación genética (transformación) consiste en la introducción de un fragmento de DNA a una célula. Fue descubierta en pneumococos (17), y se ha desarrollado en organismos que no son competentes naturales, este desarrollo incluye diferentes condiciones de transformación, DNA de diferentes fuentes, así como distintas cepas receptoras (Tabla I y II).

Un sistema de transformación depende de los siguientes parámetros: 1) Condiciones de transformación y susceptibilidad de la cepa receptora, 2) vehículo molecular y 3) estabilidad del fragmento introducido.

La combinación de las técnicas de recombinación *in vitro* de ácidos nucleicos (18) con los sistemas de transformación, ha sido ampliamente utilizadas para el aislamiento y el análisis tanto estructural como fisiológico de una gran cantidad de genes de organismos procariontes y eucariontes (9-45. ver Tablas I y II).

En *N. crassa* estas metodologías se han desarrollado recientemente, pero la eficiencia de transformación es muy baja comparada a la que se obtiene en otros organismos (Tabla I y II). Esta baja eficiencia dificulta el aislamiento e identificación de genes provenientes de un banco genético, en el caso de identificar el gene por complementación de una función, en una cepa mutante - afectada en este gene y que se le introduce por transformación.

Condiciones de transformación y susceptibilidad de la cepa receptora.

Una de las mayores limitantes para la introducción de DNA en *N. crassa*, es la pared celular. Cuando se utiliza DNA total co-

mo donador, la eficiencia de transformación varía entre .05 y .02 transformantes por microgramo de DNA utilizado (46.47).

Se ha desarrollado un procedimiento más reciente, basado en la tendencia de cepas inos⁻ (cepas que requieren inositol para crecer, ya que se requiere para la síntesis de pared) y mutantes osmóticas a formar esferoplastos (células sin pared) a partir de tubos germinales en medios de alta osmolaridad (48), sin embargo, este método no ha sido realmente explorado para el caso de plásmidos recombinantes, pero al parecer la entrada del DNA depende específicamente de la cepa receptora.

Mary E. Case en la Universidad de Georgia (EUA), ha reportado un método de transformación (38) (basado en el método de transformación que se utiliza en levadura (26)) que no requiere que la cepa receptora sea mutante en pared. Este método consiste en la formación de esferoplastos a partir de conidias germinantes (mediante la enzima glusulasa), las cuales se transforman en presencia de agentes permeabilizantes de membrana como cloruro de calcio (CaCl_2) y dimetil sulfoxido (DMSO). El DNA utilizado es previamente tratado con heparina, que es un polianión que inhibe la acción tanto de ribonucleasas como de desoxirribonucleasas..

Este método se utilizó durante el estudio de la regulación genética del grupo de genes inducibles del ácido quínico (qa) (49). Estos estudios impulsaron el desarrollo del sistema de transformación en *N.crassa* (34-40,50-55) y la mayor eficiencia reportada es de 1×10^3 a 1×10^4 transformantes por microgramo (μg) de DNA. Sin embargo, el 90% de las transformantes no son viables (abortivas) (39), lo cuál reduce la eficiencia de transformación drásticamente.

Vehículo molecular.

Los vehículos moleculares de clonación, son plásmidos que permiten la integración de DNA de cualquier organismo en sitios

localizados para enzimas de restricción en su propio DNA. Estas moléculas híbridas pueden ser introducidas a cualquier célula - por experimentos de transformación, con la posibilidad de ser - funcionales.

Estabilidad del fragmento introducido.

El primer caso donde se estudió la estabilidad del DNA in--
troducido a esferoplastos de *N.crassa*, es el reportado en los ex--
perimentos de transformación realizados con el gene qa-2⁺ de *N. -*
crassa. (38)

La estabilidad de un fragmento de DNA introducido a una cé--
lula se puede conseguir de dos manera, la primera es a través de--
la integración en el genoma y la segunda, depende de si el frag--
mento contiene una secuencia que le permita su replicación autóno--
ma (ars).

En *N.crassa* existen dos enzimas quinato deshidrogenasa involu--
cradas en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos, una es --
biosintética codificada por el gene arom-9 y la otra es catabóli--
ca y está codificada por el gene qa-2. La enzima catabólica cata--
liza la conversión del ácido deshidroquinico en ácido deshidrosi--
quinico. Una cepa doble mutante (arom-9 y qa-2) es incapaz de cre--
cer en medio mínimo, ya que es auxótrofa de aminoácidos aromáti--
cos (51) .

Plásmidos con DNA de *N.crassa* introducidos por transformación
fueron capaces de complementar una mutante aroD6 de *Escherichia coli*
(*E.coli*) que es auxótrofa de aminoácidos aromáticos por carecer de
la enzima quinato deshidrogenasa biosintética (56). A partir de -
estas transformantes se aislaron plásmidos que contenían el gene--
qa-2 de *N.crassa* el cuál se identificó como producto protéico en un
sistema de minicelulas. Posteriormente, se analizaron más plásmi--
dos que contenían, además del gene qa-2 , los demás genes del gru--
po qa (54) y se caracterizó más esta complementación en *E.coli* -
(53,55)

Con los plásmidos identificados por este método se completó por transformación diferentes cepas mutantes de *N.crassa* en la vía del ácido quínico y se caracterizaron seleccionando el fenotipo qa-2⁺ (38,49-52).

El análisis de estabilidad de estas transformantes obtenidas con el gene qa-2⁺ (38) dió resultados similares a los reportados para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) (26), es decir, la frecuencia con la que se encontraron los distintos re-reglos genómicos que resultan en la estabilidad del DNA introducido, fué similar.

Para el análisis de estabilidad se utilizaron dos parámetros, el primero fué el estudio de la frecuencia de segregación del fenotipo qa-2⁺ en las transformantes y el segundo, fué la localización dentro del genoma de *N.crassa* del gene qa-2⁺.

En el 100% de las transformantes analizadas, el gene qa-2⁺ segregó mendelianamente, esto sugiere que la información introducida, es capaz de recombinar y segrega con alguno de los cromosomas de *N.crassa* ó es capaz de replicarse autónomamente. Al analizar las transformantes, se describieron tres tipos de integración del gene qa-2⁺ en el genoma. El primero es denominado sustitutivo, en el cuál el alelo qa-2⁺ reemplaza al alelo qa-2⁻ y está representado por el 32.2% de las transformantes analizadas. El tipo denominado adyacente, se caracteriza por la integración del gene qa-2⁺ a un lado del gene qa-2⁻ con la inactivación del gene qa-4 (Fig.2). Sólo se han analizado dos transformantes con éste tipo de integración y una de ellas posee secuencias del vehículo molecular. El último tipo, llamado inserción no ligada, se encuentra en alrededor del 60.7% de las transformantes analizadas, en este caso la inserción se realiza fuera de la región qa en el genoma y el 20% de las transformantes que integran de esta manera el gene qa-2⁺, contienen secuencias del vehículo molecular (40).

Este tipo de enfoque experimental se ha utilizado para el -

aislamiento de otros genes de *N.crassa*, como es el caso del gene trp-1 complementando una mutante trpC de *E.coli* (43,44), de pyr-4 complementando en este caso una mutante pyrF de *E.coli* (42) y del gene estructural de la nitrato reductasa, también por complementación en *E.coli* (45). Con las clonas identificadas por este método, se transformaron cepas mutantes para estos genes en *N.crassa*, logrando complementarlas (42,44). El aislamiento del gene que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa, se llevó a cabo utilizando un detector sintético. El gene así identificado se utilizó para transformar una cepa mutante por delección de este gene en *N.crassa* y se logró complementarla (41).

El análisis de las transformantes obtenidas para los otros genes (41-45) no se ha caracterizado tanto, como en el caso del gene ga-2, pero en el caso del gene que codifica para la glutamato deshidrogenasa, el 50% de las transformantes, es del tipo de integración no ligada (41).

Eficiencia de transformación en Neurospora crassa.

Con el objeto de aumentar la eficiencia de transformación en *Neurospora crassa*, se han realizado enfoques experimentales diversos.

Desde el punto de vista fisiológico de la cepa receptora, se siguen ensayando diversas condiciones (M.E. Case, comunicación personal). Utilizando enfoques de tipo molecular, la investigación se dirige hacia la obtención de vehículos moleculares de clonación que contengan un ars funcional en *N.crassa*, este enfoque sigue el realizado en levadura, donde se ha obtenido un aumento en la eficiencia de transformación al utilizar secuencias de replicación autónoma (ars).

En levadura se han aislado ars al clonar al azar fragmentos de DNA de genoma, en un vehículo molecular conteniendo el gene leu-2⁺ y transformando una cepa leu-2⁻. Las clonas que contienen un ars, se identificaron por el número de transformantes obteni-

das (1×10^4 transformantes por μg de DNA) y por su alta inestabilidad mitótica en ausencia de presión selectiva (57). Similarmente se clonó DNA de *N.crassa* al azar en el vehículo molecular que contiene el gene leu-2⁺ y se transformó con este a *S.cerevisiae* (57). Las secuencias ars identificadas en levadura, no incrementan la eficiencia de transformación en *N.crassa* (M.E. Case, -comunicación personal)

En *S.cerevisiae* se encontró un plásmido mitocondrial cuyo origen de replicación funcionaba en plásmidos que contenían el gene leu-2⁺ aumentando la eficiencia de transformación hasta 1×10^4 -transformantes por microgramo de DNA (58). Estas transformantes también son muy inestables mitóticamente.

Con el descubrimiento de plásmidos mitocondriales en *Neurospora crassa* (59,60), se realizaron experimentos similares a los de levadura, utilizando el gene ga-2⁺ como marcador de selección (61). En este experimento se logró mantener extracromosomalmente el gene ga-2⁺ debido al origen de replicación del plásmido mitocondrial, aunque no se ha analizado su estabilidad mitótica.

Otro enfoque experimental que se está intentando en *N.crassa* para aislar un ars, es a través de la clonación de centrómeros, los cuáles al estar clonados en plásmidos, permitan la estabilización de estos. Estos experimentos también están basados en experimentos realizados en levadura (62).

Por otra parte, en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, se describió el aislamiento de un ars proveniente de la región que codifica para el RNA ribosomal, el cuál promueve replicación autónoma del plásmido que lo contiene (21). En *S.cerevisiae*, con el objetivo de introducir el gene leu-2⁺ en la región genómica que codifica para genes ribosomales, se construyeron plásmidos conteniendo este gene y los genes ribosomales, dichos plásmidos alteraron la frecuencia de transformación (63).

Los genes ribosomales en levadura se encuentran en *tandem* en

unidades de 9 kilobases (Kb). Esta unidad contiene el precursor para el RNA ribosomal 5S y los precursores para el RNA ribosomal 35S (25,18 y 5.8S) además de una región de 2 Kb de función-desconocida. Los vehículos moleculares que contenían además del gene leu-2⁺, la región de los precursores del RNA 35S ribosomal, transformaban a una eficiencia de 100 a 200 transformantes - por μg de DNA, estas transformantes son muy estables y el gene leu-2⁺ está contenido en la región del genoma que codifica para los genes ribosomales. Cuando el gene leu-2⁺ se encontraba clonado en un vehículo molecular que contenía la región de 2 Kb, - el número de transformantes es de 10 000 por μg de DNA, siendo transformantes muy inestables. La región de 2 Kb está muy cercana al gene 5S ribosomal. Estas transformantes tienen un fenotipo muy similar al observado en transformaciones realizadas con un vehículo molecular que contiene un ars. Como control de los experimentos se utilizó un vehículo que sólo contiene el gene leu-2⁺ y su eficiencia es de 1 transformante por μg de DNA.

La utilización de los genes ribosomales en levadura ha dado buenos resultados para aumentar la eficiencia de transformación. Este enfoque no ha sido reportado para *N.crassa*.

N.crassa tiene un genoma haploide de 2.7×10^7 pares de bases- de las cuales el 90% es DNA de secuencia única, el 2% es secuencia invertida repetida y el 8% restante lo constituye DNA que codifica para RNA ribosomal (64). Dentro de los genes ribosomales, se encuentra el gene 5S (65), del cuál existen varias familias ($\alpha, \beta, \beta', \gamma, \delta$) que comparten una alta homología entre si y una característica de esos genes en *N.crassa* es su localización reiterada y dispersa en el genoma (100 copias aproximadamente por genoma) (66).

El análisis de las transformantes obtenidas en *N.crassa*, - sugiere que la limitante principal en la eficiencia de transformación, es la capacidad de integrar la información genética en el genoma de la célula receptora, los datos que apoyan esta li-

mitante son los siguientes: el primero es que todas las transformantes estables no segregan mitóticamente el fenotipo qa-2⁺ y que el gene qa-2⁺ está localizado en el genoma, el segundo dato, es que de todas las transformantes obtenidas el 90% son abortivas, las cuáles presentan una morfología defectuosa y una incapacidad para crecer en el mismo medio selectivo al rescatarse la colonia. Estas transformantes se han explicado como células que logran aceptar el DNA, pero que no lo pueden estabilizar.

Nuestra hipótesis es que si se logra estabilizar la información introducida, entonces la eficiencia de transformación aumenta. Este incremento en la estabilidad se puede lograr mediante la recombinación homóloga de una secuencia portada en el vehículo molecular o por la existencia de un ars funcional que permita la replicación extracromosomal del vehículo. Si se incluye un gene 5S ribosomal de *N.crassa* en un vehículo molecular, tiene la ventaja de ser un gene altamente homólogo con los demás genes 5S ribosomales dispersos en el genoma, con lo que se aumenta el número de sitios posibles de recombinación. Por otra parte, los datos reportados en levadura, sugieren la posibilidad de que exista una secuencia ars cercana al gene 5S ribosomal de *N.crassa* (este gene tiene 80% de homología con el de levadura (66)) y pueda ser utilizado por el vehículo que lo contiene. El gene qa-2⁺ se puede utilizar como marcador de selección.

El objetivo de este trabajo consiste en aumentar la eficiencia de transformación genética en *Neurospora crassa*, a través de la construcción de plásmidos recombinantes, los cuales puedan ser utilizados como vehículos moleculares de clonación.

Para la realización de estos experimentos, se siguió la siguiente estrategia:

- 1) Se utilizó como cepa receptora la doble mutante qa-2⁻, y arom-9⁻ auxótrofa de aminoácidos aromáticos.
- 2) El método de transformación se ensayó en las condiciones de-

nuestro laboratorio y utilizando como control , un plásmido que contiene el gene qa-2⁺ (pRC57) cuya eficiencia es de 8 transformantes estables por microgramo de DNA (61).

3) Se construyó un vehículo molecular que contiene el gene qa-2⁺ y un gene 5S ribosomal de *N.crassa*, clonados en el plásmido pBR322.

4) Se transformó y se comparó la eficiencia de transformación de ambos plásmidos, evaluando por el número de transformantes estables que se obtienen por microgramo de DNA.

5) Se analizó la frecuencia de segregación mitótica del fenotipo qa-2⁺ de las transformantes obtenidas.

6) Se analizó la localización del gene qa-2⁺ en las transformantes.

La metodología utilizada para realizar estos experimentos se encuentra desarrollada en la parte de MATERIALES Y METODOS. Comentarios necesarios en el desarrollo de los experimentos se encuentra en la sección de RESULTADOS y finalmente, se discute la posibilidad de utilizar el plásmido construido aquí, como vehículo molecular de clonación en *N.crassa* y su posible estabilidad extracromosomal.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Todas las técnicas utilizadas para la realización de éste trabajo se encuentran reportadas en el Manual de Cold Spring Harbor (18) y en Genetic and Microbiological Research for *Neurospora crassa* (67).

*Microorganismos utilizados.*CEPAS DE *E. coli* K-12.

CEPA	GENOTIPO	SEXO	PLASMIDO	REFERENCIA
RR1 <u>rec A</u> ⁻	<u>galK2</u> , <u>lacY1</u> , <u>leuB6</u> , <u>proA2</u> <u>thl1</u> , <u>hsdS</u> , <u>recA1</u> , <u>rpsL20</u>	F ⁻	-	(68)
MC1061	<u>leuB6</u> , <u>proA2</u> , <u>str</u> ^r	F ⁻	-	*
SK2881	<u>leuC</u> , <u>aroD6</u> , <u>hsdR4</u> , <u>recA1</u> <u>endA1</u> , <u>sbcB15</u>	F ⁻	-	(50)
AB1360	<u>argE3</u> , <u>his4</u> , <u>proA2</u> , <u>aroD6</u>	F ⁻	pRC57	(55)
ECX-1	<u>leuB6</u> , <u>proA2</u> , <u>str</u> ^r	F ⁻	pDR1	éste trabajo
ECX-2	<u>leuC</u> , <u>aroD6</u> , <u>hsdR4</u> , <u>recA1</u> <u>endA1</u> , <u>sbcB15</u>	F ⁻	pDR3	éste trabajo
ECX-4	<u>galK2</u> , <u>lacY1</u> , <u>leuB6</u> , <u>proA2</u> , <u>thl-1</u> , <u>hsdS</u> , <u>recA1</u> , <u>rpsL20</u>	F ⁻	pVK88	en el laboratorio.
SK2886	<u>leuC</u> , <u>aroD6</u> , <u>hsdR4</u> , <u>recA1</u> <u>endA1</u> , <u>sbcB15</u>	F ⁻	pMSK332	(50)

* Donada por la Dra. Alejandra Covarrubias.

CEPAS DE *N. crassa* DERIVADAS DE LA CEPA SILVESTRE 74 A.

CEPA	GENOTIPO	PLASMIDO	REFERENCIA
M246-89601-2A	<u>qa-2</u> 246, <u>arom-9</u> M6-11, <u>inos</u> 89601.	-	(38)
NCX-11, 13, 23, 62 y 105.	<u>qa-2</u> 246, <u>arom-9</u> M6-11, <u>inos</u> 89601 .	pDR3	éste trabajo
NCX-131, 132, 141, 150, 161 y 169.	<u>qa-2</u> 246, <u>arom-9</u> M6-11, <u>inos</u> 89601.	pRC57	éste trabajo

Plásmidos

PLASMIDO	CRACTERISTICAS RELEVANTES.	REFERENCIA
pRC57	Contiene los genes <u>qa-2</u> ⁺ y <u>qa-4</u> de <i>N. crassa</i> clonados en el plásmido pBR3222, además confiere <u>re</u> sistencia a ampicilina en cepas de <i>E. coli</i> (Fig.6).	(61)
pBR322	Vehículo molecular de clonación. Confiere resistencia a tetraciclina y ampicilina en cepas de <i>t. coli</i> . (Fig.3).	(69)
pVK88	Contiene los genes <u>qa-2</u> ⁺ , <u>qa-4</u> ⁺ y un fragmento de <u>qa-3</u> de <i>N. crassa</i> , clonados en el plásmido pBR322 y confiere resistencia a tetraciclina en cepas de <i>E. coli</i> . (Fig.5)	(56)
ptB051	Contiene un gene <u>5S</u> ribosomal de <i>N. crassa</i> clonado en el pBR322 y confiere resistencia a ampicilina en cepas de <i>E. coli</i> . (Fig.3)	*
pDR1	Subclonación del gene 5S ribosomal de ptB051 en el pBR322, confiere resistencia a ampicilina en cepas de <i>E. coli</i> . (Fig.3).	éste trabajo
pDR3	Subclonación del gene <u>qa-2</u> ⁺ y <u>qa-4</u> de pVK88 en pDR1, confiere resistencia a ampicilina en cepas de <i>E. coli</i> . (Fig.5).	éste trabajo

* Donado por el Dr. Robert L. Metzenberg.

Antibióticos.

AMPICILINA.- Se utilizó a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

CLORANFENICOL.- Se utilizó a una concentración de 140 $\mu\text{g/ml}$.

TETRACICLINA.- Se utilizó a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

Medios de crecimiento

MEDIOS DE CRECIMIENTO DE *E.coli*.

MEDIO COMPLETO.- Se utilizó medio Luria, que contiene en g/l :

10g de Peptona de casína.

5g de Extracto de levadura.

10g de NaCl.

1.5 ml de NaOH 1N.

Para el caso de medio sólido se utilizó Bacto-agar al 2%. Todos los crecimientos se realizaron a 37°C y cuando fueron en líquido, los cultivos se agitaron a 250 rpm.

MEDIO MINIMO.- Este medio contiene por litro:

10 ml CaCl_2 10 mM.

10 ml MgSO_4 100 mM

100 ml Sales M9 10X.

0.2 ml B1 al 0.01%.

10 ml del aminoácido necesario preparado al 2%. Cuando se requirió medio sólido se agrego 2% de Bacto-agar. Estos crecimientos se incubaron durante 48 horas a 37°C.

Las sales M9 10X contienen por litro:

70 g Na_2HPO_4

30 g KH_2PO_4

5 g NaCl

10 g NH_4Cl

MEDIOS DE CRECIMIENTO DE *N.crassa*

Los medios de crecimiento, están reportados en Genetic Microbiological Research Techniques for *N.crassa* (67). El medio utilizado contiene por litro: 250 ml de Fries 4X

15 g Sacarosa.

Si se requiere medio sólido se agrega Bacto-agar al 2%. En este trabajo los crecimientos se realizaron durante 7 o 13 días a 25°C, 80% de humedad y luz-continua.

El Fries 4X contiene por litro:

20 g Tartrato de amonio.

4 g KH_2PO_4

4 g NH_4NO_3

2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

0.4 g CaCl_2

0.4 g NaCl

0.4 ml Biotina (.05 mg/ml)

0.4 ml Elementos traza.

Los elementos traza, contienen por cada 100 ml:

5 g Acido cítrico.

5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

1 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

0.25 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

0.05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

0.05 g H_3BO_3 .

0.05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Todos los crecimientos se realizaron agregando 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mio-inositol y con 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno de los siguientes aminoácidos L-fenilalanina, L-triptofano y L-tirosina y con 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido para-aminobenzoico, cuando fué necesario.

Endonucleasas de restricción.

ENZIMA	SECUENCIA RECONOCIDA	SOLUCION AMORTIGUADORA	
		ALMACENAMIENTO	REACCION
<i>Bam</i> H1	G [↓] G A T C C C C T A G [↑] G	20 mM KH_2PO_4 , pH 7.5 0.5 mM EDTA (Na_2)	20 mM Tris-HCl, pH 8. 7 mM MgCl_2

		1 mM DTT	100 mM NaCl
		50% glicerol	
		500 µg/ml BSA	
<i>BglII</i>	A↓G A T C T T C T A G, A↑	50 mM Tris-HCl, pH 7. 150 mM KCl 1 mM EDTA (Na ₂) 50% glicerol 500 µg/ml BSA	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM MgCl ₂ . 50 mM NaCl 1 mM DTT
<i>EcoRI</i>	G↓A A T T C C T T A A G↑	10 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2. 0.5 mM EDTA (Na ₂) 300 mM NaCl 0.2% Tritón X-100 5 mM β-mercaptoetanol 500 µg/ml BSA.	100 mM Tris-HCl, pH 7.4 5 mM MgCl ₂ 2 mM β-mercaptoetanol 50% glicerol. 500 µg/ml BSA
<i>HindIII</i>	A↓A G C T T T T C G A, A↑	1 mM EGTA 200 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 0.5 mM EDTA (Na ₂) 50% glicerol 500 µg/ml BSA	20 mM Tris-HCl, pH 7.4 7 mM MgCl ₂ . 600 mM NaCl
<i>PstI</i>	C T G C A↓G G, A C G T C↑	10 mM Tris-HCl, pH 7.4 50 mM NaCl 0,2 mM EDTA (Na ₂) 1 mM DTT 50% glicerol 0.15% Tritón X-100	20 mM Tris-HCl. pH 7.5 10 mM MgCl ₂ 100 µg/ml BSA

↑ Sitio de corte de la enzima, dentro de la secuencia de seis pares de bases de reconocimiento. Todas las enzimas se almacenan a -20°C y todas las reacciones se realizan a 37°C.

Purificación de DNA de plásmido.

Estos métodos de purificación están basados en que los plásmidos utilizados pertenecen al tipo llamados relajados, por lo cuál su replicación no está acoplada a la replicación del cromosoma bacteriano y existen en varias copias por célula. Estos plásmidos pueden ser amplificados hasta cientos de veces, si se inhibe la síntesis de proteínas. Los métodos de purificación aquí utilizados, pueden llevarse a cabo en plásmidos de menos de 25 Kb.

PURIFICACION DE DNA DE UN LITRO DE CULTIVO.

Con éste método se obtiene DNA en el orden de miligramos y consiste en:

- 1) Crecimiento de la cepa portadora a 37°C, con agitación de 250 rpm hasta fase exponencial en medio completo más el antibiótico.
- 2) La amplificación del plásmido se realizó con 140 mg de cloranfenicol incubándose 16 horas más en las condiciones antes mencionadas.
- 3) Las células se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en sacarosa 25% en Tris-HCl 200 mM, pH 8, donde fueron lisadas con mezcla lítica 15 minutos en hielo y 180 mg de lisozima, seguidas de un tratamiento con RNasa (10 mg).
- 4) Los desechos celulares son retirados por centrifugación y las proteínas se extrajeron con la mezcla fenol:cloroformo:iso-amílico (49:49:2). La separación del DNA de plásmido del cromosomal y RNA se realizó sometiendo la mezcla a un gradiente isopícnico al equilibrio de cloruro de cesio/bromuro de etidio (CsCl/BrEt).
- 5) El DNA se cuantifica , leyendo su absorbancia a 260 nm y se usó la relación 1 D.O.= 50 µg de DNA. El DNA se almacenó en el amortiguador Tris-HCl 10 mM, EDTA (Na₂) 1 mM, pH 8 a 4°C. (amortiguador de almacenamiento).

MEZCLA LITICA / 100 ml:

0.3 ml Tritón X-100 (10%)
7.5 ml EDTA(Na₂) 250 mM, pH 8
1.5 ml Tris-HCl 1M ,pH 8.

GRADIENTE CsCl/BrEt

Se sometió a centrifugación durante 36 horas a 36 000 rpm, 20°C-25°C.
ROTOR: SW 55
BrEt: 30 µl de una solución 10 mg/ml.
CsCl: 4.4 g
DNA: 4.2 ml en amortiguador de almacenamiento (Hasta 500 microgramos por gradiente).

PURIFICACION DE DNA DE 50 ml DE CULTIVO.

Esta técnica se realiza como el caso anterior, pero se realizó la amplificación durante 12 horas en presencia de 15 mg de espectinomicina y antes de hacer la extracción de proteínas, las células lisadas se trataron con 100 µl de una solución de pronasa (5mg/ml).

MICROENSAYO DE PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO.

Estos métodos se utilizaron para la identificación de clones:

PURIFICACION DE DNA DE 3 ml DE CULTIVO.- Esta técnica se realizó como en el caso de 1 litro, pero omitiendo la amplificación y el gradiente.

PURIFICACION DE DNA DE 1 ml DE CULTIVO. En este procedimiento, las células se resuspendieron en sacarosa 8% en Tris-HCl 50 mM, EDTA(Na₂) 50 mM, Tritón X-100 al 5%, pH 8 y se agregó 20 microlitros de una solución de lisozima de 10 mg/ml.

Cuando los plásmidos se utilizaron para transformar *N.crassa*, se sometieron

a tres gradientes de CsCl/BrEt purificando exclusivamente la forma super-enrollada del plásmido.

Transformación genética

TRANSFORMACION GENETICA DE *E. coli* CON PLASMIDOS.

Esta técnica consiste en crecer las células receptoras hasta una concentración de 5×10^8 células/ml, se concentraron por centrifugación y después se pusieron en contacto con el DNA transformante en presencia de CaCl_2 30 mM en hielo, durante una hora, seguidas de un choque de calor de 70 segundos a 42°C . Las células sometidas a este tratamiento son cultivadas en medio completo durante 2 horas y luego se inoculan los medios selectivos, incubándose a 37°C por 24 horas si el medio es completo y hasta más de 48 si el medio es mínimo.

TRANSFORMACION GENETICA DE *N. crassa* CON PLASMIDOS.

El método es el reportado por M. E. Case (39) y se desarrolló como sigue:

- 1) Se inocularon 5 matraces con medio sólido de crecimiento más aminoácidos-aromáticos y mio-inositol durante 13 días a 25°C , 80% de humedad y luz continua. Se inocularon 2×10^6 esporas a una concentración de 5×10^6 esporas/ml en medio de germinación, incubándose a 25°C , durante 4 horas, con agitación de 150 rpm.
- 2) Las células se concentraron por centrifugación, se lavaron con agua y se resuspendieron en 1M sorbitol, seguidas de una incubación de 1 hora con gluculasa al 3% a 30°C y con agitación de 100 rpm.
- 3) Después de este tratamiento se resuspendieron y se lavaron con 1M de sorbitol y se conservaron en hielo en 1M sorbitol, 10 mM MOPS, 50 mM CaCl_2 , pH 6.3.
- 4) El DNA que se utilizó para transformar se resuspendió en 50 microlitros de heparina (5 mg/ml en 10 mM MOPS, 50 mM CaCl_2 , pH 6.3) incubándose 20 minutos en hielo.
- 5) A las células ya tratadas, se les añadió 5 microlitros de DMSO y 50 microlitros de PEG 4000 al 40% en MOPS 10 mM, CaCl_2 50 mM, pH 6.3.
- 6) El DNA ya tratado se puso en contacto con las células durante 30 minutos en hielo y se agregó 2.5 ml de la mezcla anterior de PEG, incubándose 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 4 ml de sorbitol 1M y se inoculó con 1 ml de esta mezcla a 50 ml de medio de regeneración, el cual se vació en 4 cajas de Petri con medio selectivo sólido y se incubó 3 días a 30°C .
- 7) Para cuantificar la formación de esferoplastos se tomó también 1 ml de la mezcla de transformación y se hicieron diluciones convenientes para inocular medios de regeneración con y sin sorbitol, vaciándose en medio sólido completo e incubándose 3 días a 30°C , al cabo de los cuales, se contó el número de colonias que aparecen tanto en células que estuvieron en presencia de sorbitol como en ausencia.

MEDIO DE GERMINACION

Fries 0.5X

Sacarosa 1.5%

inositol 50 microgramos por mililitro.

PABA	2.5	"	"	"	"
Fen	80	"	"	"	"
Tir	"	"	"	"	"
TrP	"	"	"	"	"

MEDIOS DE TRANSFORMACION

REGENERACION	SOLIDO
Sorbitol 1M	
Fries 1X	Fries 1X
Fructosa 0.05%	Fructosa 0.05%
Glucosa 0.05%	Glucosa 0.05%
Sorbosa 1%	Sorbosa 1%
inositol 50 μ g/ml	Inositol 50 μ g/ml
Agar 2.8%	Agar 2.8%

MEDIOS/FORMACION DE ESFEROPLASTOS

Sorbitol 1M		
Fries 1X	Fries 1X	Fries 1X
Fructosa 0.05%	Fructosa 0.05%	Fructosa 0.05%
Glucosa 0.05%	Glucosa 0.05%	Glucosa 0.05%
Sorbosa 1%	Sorbosa 1%	Sorbosa 1%
Inositol 50 μ g/ml	Inositol 50 μ g/ml	Inositol 50 μ g/ml
PABA 2.5 "	PABA 2.5 "	PABA 2.5 "
Fen 80 "	Fen 80 "	Fen 80 "
Tir " "	Tir " "	Tir " "
Trp " "	Trp " "	Trp " "
Agar 2.8%	Agar 1.5%	Agar 1.5%

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Esta se realizó en Tris-Acetatos 1X, pH8.1, en geles de 3 mm de grosor con agarosa al 0.8% durante 1 hora a voltaje constante de 150 v. Se utilizó como mínimo de DNA 0.2 μ g y como máximo 10 μ g. La tinción se realizó en bromuro de etidio 5 μ g/ml durante 5 minutos. Como marcador de la electroforesis se utilizó los colorantes azul de bromofenol y xilencianol y como marcador de peso molecular interno se utilizó el DNA del fago λ fragmentado con la enzima *HindIII*.

La solución amortiguadora Tris-Acetatos 10X, contiene por litro:

48.4 g Trizma-base.

16.4 g Acetato de sodio anhidro

7.4 g EDTA (Na₂)

El pH se ajustó a 8.1 con ácido acético glacial.

Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Después de identificar por electroforesis en un gel de agarosa la zona en la cuál se encuentra el fragmento deseado de DNA, este se obtiene cortando del gel con un bisturí la zona del gel en la cuál migró y se colocó dentro de un tubo ependorff. Se congeló y descongeló varias veces, seguido de una filtración por fibra de plástico. La solución filtrada se extrae con la mezcla fenol:cloroformo:isO-amílico y se precipitó con acetato de sodio en etanol. El DNA se guardó en el amortiguador de almacenamiento. La agarosa que se utilizó en este tipo de experimentos es de bajo punto de fusión y la electroforesis se realizó a 4°C, a voltaje constante de 75 v, durante 2 h.

Ligado de fragmentos de DNA.

Este método se realizó, utilizando la relación 1 de vehículo molecular por cada 10 de pasajero y se llevó a cabo como sigue:

- 1) El DNA del vehículo y del pasajero en la relación anterior se resuspendieron en 23 μ l de agua y se agregó 3 μ l de solución amortiguadora de sales de ligasa 10X. Incubándose a 65°C durante 5 minutos y después 5 minutos en hielo
- 2) Se agregó 3 μ l de la solución amortiguadora de adiciones de ligasa 10X y 1 μ l de ligasa T4 (1.5 unidades), incubándose a 14°C durante 12 horas.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE SALES DE LIGASA 10X

Para 2.5 ml:

60 μ l de KCl 2.5 M

125 μ l Tris-HCl 2M, pH 7.5.

250 μ l MgCl₂ 1M

250 μ l DTT 100 mM.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE ADICIONES DE LIGASA 10X.

Para 2.5 ml :

333 μ l ATP 75 mM

0.4 g DTT

250 μ l de espermidina 100 mM

Purificación de DNA de micelio.

- 1) Cultivos de células de 26 horas a 28°C, con agitación de 250 rpm, se filtraron a través de papel Whatman 41 y se lavaron con agua y acetona después se maceraron en hielo seco y se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM, EDTA(Na₂)-1 mM, SDS 4%, pH 8 por cada 125 mg. Agitándose suavemente por 10 minutos.
- 2) El lisado es tratado con la mezcla fenol:cloroformo:iso-amílico e incubado 1 hora con proteinasa K a 30°C a una concentración de 0.5 mg/ml.
- 3) Los desechos celulares se separaron por centrifugación y el sobrenadante se sometió a una segunda extracción de proteína. El RNA se digiere con RNasa y el DNA se almacenó en amortiguador de almacenamiento.

Para la purificación de DNA de micelio de las cepas transformantes se realizó como se mencionó anteriormente y simplemente se escaló la técnica para iniciar con 50 ml de cultivo y la lisis se realizó en 500 microlitros.

Marcaje del DNA de pRC 57 con $\{\alpha^{32}P\}$ CTP.

El marcaje interno con ^{32}P en las moléculas del plásmido se efectuó con el juego Nick translation de New England y se realizó como sigue:

- 1) Se hace una mezcla del DNA de plásmido con nucleótidos no marcados y se le agrega $\{\alpha^{32}P\}$ CTP, incubándose con DNA PolI a 14°C, durante 2 horas y la reacción se para con EDTA(Na₂) 50 mM incubando 5 minutos a 65°C.
- 2) La marca radioactiva no incorporada al plásmido se quita mediante cromatografía en columna de Sephadex G-75.
- 3) Finalmente, se cuantifica la marca incorporada, tomando una alícuota y precipitándola con TCA al 5% en filtros de fibra de vidrio y colocándola en un vial con PPO/Tolueno en el contador de centelleo.

Transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa.

Los geles de agarosa conteniendo el DNA fragmentado con enzimas de restricción, se incubaron durante 10 minutos a 150 rpm en HCl 0.25 N, seguidos de un lavado con agua y neutralizados con NaOH 0.5 N, NaCl 1 M, los geles - así tratados se embeben en Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5M, ph 7.4 incubándose 30 minutos con agitación de 150 rpm. La transferencia a las membranas de nitrocelulosa se realizó durante 12 horas en NaCl 0.9 M, citrato de sodio 0.09 M. Finalmente se secan las membranas a 80 °C durante 2 horas.

Hibridización de membranas de nitrocelulosa con pRC57{ α^{32} P} CTP.

1) PREHIBRIDIZACION.- Se realizó en bolsas de hibridización conteniendo las membranas de nitrocelulosa y se agregó una mezcla conteniendo 0.5 ml de solución Denhart 100X, 0.5 ml de Fosfatos 1M, 1.25 ml NaCl 3M, 0.3 M citrato de sodio, DNA de timo de ternera (50 μ g/ml) pre hervido 10 minutos y se incubó - toda la mezcla durante 2 horas a 65 °C

Denhart 100X contiene: 2% polivinilpirrolidona, 2% ficol y 2% BSA.

2) HIBRIDIZACION.³² Se realizó como en el caso anterior, pero en este caso se agregó pRC57 { α^{32} P} CTP , incubándose por 12 horas a 65°C.

3) LAVADO.- Este se realizó con 0.1 % SDS, 0.3M NaCl, 0.03 M citrato de sodio y con 37.5 mM NaCl, 3.75 mM citrato de sodio, 1% SDS a 50°C. Finalmente se lavaron con 37.5 mM NaCl, 3.75 mM citrato de sodio a 50°C.

Autorradiografía.

Las membranas de nitrocelulosa hibridizadas con pRC57 { α^{32} P} CTP, se expusieron a placas de radiografía a -70°C, durante un día o más, dependiendo de la marca hibridizada. (Se pusieron un millón de cpm. por cada carril).

Segregación mitótica de células transformadas.

Las células transformadas provenientes del medio selectivo (medio mínimo + inositol), se sembraron en tubos con medio selectivo y se cultivaron - a 25°C, 80% de humedad y luz continua durante 7 días. Las esporas provenientes de este crecimiento se inocularon en diluciones convenientes en medio selectivo con sorbosa, con el fin de obtener colonias provenientes de una espora.

Con cada colonia aislada se volvió a obtener esporas al crecer en medio selectivo. Con estas esporas se inocularon medio selectivo y medio completo (medio mínimo + inositol + PABA + aminoácidos aromáticos) en tubos y cultivados como ya se mencionó. Con las esporas obtenidas por este procedimiento se inocularon en diluciones convenientes en medios tanto selectivo como completo, ambos suplementados con sorbosa y se incubaron durante 3 días a 30°C. Finalmente, se contó el número de colonias que creció en cada condición por cepa aislada.

RESULTADOS

RESULTADOS

Construcción de pDR1 y pDR3.

El plásmido pBR322 (69) se utilizó como vehículo molecular de clonación en la construcción de los plásmidos pDR1 y pDR3.

La construcción de pDR1, consistió en una subclonación de un gene 5S ribosomal proveniente del plásmido pTB051 en el vehículo molecular pBR322. El plásmido pTB051 tiene 6.9 Kb y contiene en un ~~f~~ fragmento de 2.6 Kb de DNA de *N.crassa* clonado en el sitio de *Pst*I, un gene 5S ribosomal, el cuál está flanqueado por sitios para las enzimas *Hind*III y *Bgl*II (Fig.3). Con el objetivo de hacer un vehículo molecular más pequeño y con menos sitios múltiples para enzimas de restricción, se fragmentó el DNA de pTB051 con las enzimas *Hind*III y *Bgl*II. Después de fragmentar específicamente pTB051, se aisló el fragmento de 0.55 Kb, identificado por electroforesis en geles de agarosa. Por otra parte, el plásmido pBR322 se cortó específicamente con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y se aisló el fragmento de 4.06 Kb. Los fragmentos de 4.06 Kb y 0.55 Kb se ligaron con la enzima ligasa T4 y con esta mezcla se transformó la cepa MC1061.

La selección de la clona, se realizó en base a los siguientes parámetros:

- 1) La enzima *Hind*III genera extremos cohesivos en los fragmentos, - por lo que se pueden aparear y ligar manteniendo este sitio de reconocimiento en el nuevo vehículo. *Bam*HI y *Bgl*II aunque reconocen distintas secuencias, generan extremos cohesivos del mismo tipo, - que pueden ser ligados, aunque el sitio de reconocimiento para -- cualquiera de las dos enzimas se pierde en el nuevo vehículo.
- 2) Por esta razón la orientación del fragmento insertado en el vehículo es única (*Hind*III -*Hind*III y *Bam*HI -*Bgl*II).
- 3) El plásmido pDR1 conserva el gene que confiere resistencia a - ampicilina y el de tetraciclina resulta inactivado al estar interrumpido por el fragmento insertado.

La cepa receptora MC1061 es hipertransformable y sensible a ampicilina, además de ser auxótrofa de leucina.

4) La selección de la cepa portadora de pDR1 se realizó en medio mínimo más ampicilina y leucina (Fig.4).

5) Las colonias que crecieron en este medio de selección, fueron sometidas a una purificación de DNA de plásmido, y se caracterizó este, por su patrón electroforético de peso molecular en geles de agarosa al ser fragmentado con las enzimas *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII* y *PstI*. Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA del fago λ , cortado con la enzima *HindIII*. El pDR1 contiene 4.61 Kb. (Fig.4).

La construcción del vehículo molecular pDR3, consiste en la subclonación del gene qa-2⁺ proveniente del plásmido pVK88 (56) en el plásmido pDR1. La estrategia de construcción está esquematizada en la Fig. 5. El plásmido pVK88 (11.3 Kb) contiene un fragmento de DNA de *N.crassa* de 7 Kb clonado en el sitio de *PstI* del plásmido pBR322. En este fragmento están contenidos los genes qa-2⁺, qa-4⁺ y qa-3 (Ver Fig. 2).

El aislamiento del gene qa-2⁺ de pVK88 se realizó cortando con la enzima *HindIII* y recuperando el fragmento de 3.06 Kb, el cuál contiene un fragmento del gene qa-4. Las 3.06 Kb aisladas, fueron ligadas al plásmido pDR1 previamente cortado con la enzima *HindIII*. Con esta mezcla se transformó la cepa SK2881. Para identificar la clona portadora del plásmido pDR3, se siguieron los siguientes criterios:

1) La cepa receptora es auxótrofa de leucina y aminoácidos aromáticos. Las transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio mínimo más ampicilina y leucina, ya que pDR3 conserva el gene de resistencia a ampicilina (Fig.5).

2) Las transformantes se sometieron a purificación del plásmido portado y se analizaron como en el caso de pDR1 (Fig.6) .

3) La orientación del fragmento de 3.06 Kb dentro de pDR3 se obtuvo al analizar el patrón electroforético de peso molecular en geles de agarosa del DNA fragmentado (Fig.6) .

Experimentos preliminares de transformación en la cepa M246-89601-2A.

El objetivo de estos experimentos, fué montar las condiciones de transformación en nuestro laboratorio por el método reportado (Ver MATERIALES Y METODOS). Estos experimentos fueron realizados en la cepa M246-89601-2A con el plásmido pRC57 (Fig.7). El objetivo particular, fué igualar la eficiencia de transformación reportada para pRC57 (8 transformantes por μg de DNA) (61).

Todos los experimentos se realizaron utilizando 1 microgramo de DNA por cada 1×10^8 células receptoras (donde el 85% de la población, son esferoplastos) a partir de esporas germinadas en medio Fries. Los resultados se reportan en la Tabla III. Únicamente se reporta el número de transformantes estables, ya que -- las transformantes abortivas, son colonias de morfología defectuosa que crecen como pequeñas "nubes" agregadas o dispersas de tamaño variable, por lo que es difícil distinguir una de otra. Además son incapaces de crecer en medio selectivo, cuando se rescata la colonia.

Los experimentos reportados en A y B, Tabla III, se realizaron simultáneamente, con el objetivo de facilitar la obtención de esporas de la cepa receptora. El medio Vogel y el medio Fries, se utilizan indistintamente para la obtención de esporas (67). El experimento realizado en D, Tabla III, se llevó a cabo bajo las condiciones de crecimiento utilizadas en el laboratorio de M. E. Case (comunicación personal). El experimento reportado en C, Tabla III, fué una exploración para analizar la importancia del estado molecular del plásmido, al utilizarse en la transformación, ya que se conoce que plásmidos en estado relajado disminuyen la eficiencia de transformación en *E.coli*. En el dato reportado en el renglón E, se exploró el efecto de la edad de las esporas en la eficiencia de transformación.

Transformación de la cepa M246-89601-2A, con los plásmidos pDR3 y pRC57.

El método de transformación se realizó como se describe en MATERIALES Y METODOS. Como control de la eficiencia de transformación se utilizó el plásmido pRC57, portador del gene qa-2⁺ proveniente del plásmido pVK88, clonado en el sitio para *HindIII* de el plásmido pBR322. La estrategia de construcción de pRC57 está esquematizada en la Fig. 7.

La cepa receptora M246-89601-2A, es auxótrofa de aminoácidos aromáticos y de inositol. Fue transformada con los plásmidos pRC57 y pDR3, seleccionando las transformantes en medio mínimo más inositol. La transformación se inició con 2×10^8 células receptoras y se realizó con 1×10^8 , donde el 85% de la población, son esferoplastos. El número de transformantes estables obtenidas para cada caso se encuentra reportado en la Tabla IV.

Segregación mitótica del genotipo qa-2⁺ en las transformantes.

De las transformantes obtenidas tanto con pRC57 como con pDR3 se sometieron a este experimento como se describe en MATERIALES Y METODOS. La frecuencia de segregación a qa-2⁻ de estas transformantes en presencia y ausencia de presión selectiva, se encuentra reportado en la Tabla V, donde se observa una alta frecuencia del fenotipo qa-2⁺ a qa-2⁻ de ambas transformantes, independientemente de si las transformantes provienen de crecimiento en presencia o ausencia de presión selectiva.

Localización del gene qa-2⁺ en el genoma de las transformantes.

De las transformantes obtenidas con pDR3 y pRC57 utilizadas en el experimento de segregación mitótica del fenotipo qa-2⁺, se purificó DNA a partir de la condición de crecimiento de presión selectiva, como se describe en MATERIALES Y METODOS.

Este DNA se fragmentó con la enzima *Pst*I y fué sometido a electroforesis en geles de agarosa y transferido a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente fueron hibridizados con el plásmido pRC57 { α 32 P} CTP y expuestos a autorradiografía (Ver MATERIALES Y METODOS). Como control de la localización del gene qa-2⁺ se utilizó el DNA de la cepa silvestre 74 A. Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA del fago λ cortado con la enzima *Bam*H1. Los patrones de localización se encuentran en la Figura 8.

En la Fig. 9 (transformantes provenientes de pRC57) y en la Fig. 10 (transformantes provenientes de pDR3) se encuentran los patrones de localización del gene qa-2⁺, en un experimento realizado como el anterior, pero en este caso los DNAs se fragmentaron con la enzima *Bam*H1.

FIGURAS

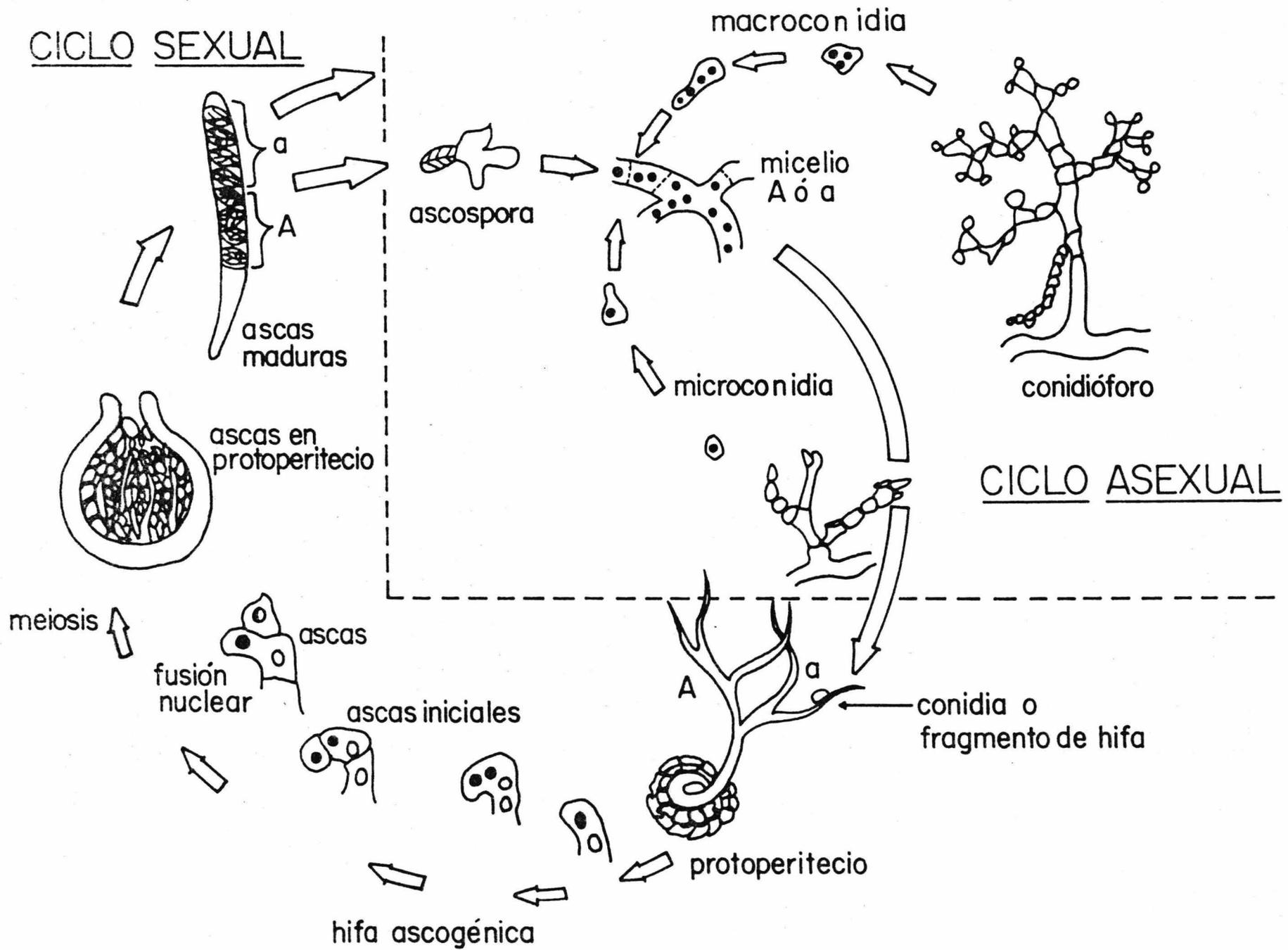


FIG. 1.- CICLO DE VIDA DE *Neurospora crassa*

FIG 2.- MAPA DE LOCALIZACION DE LOS GENES *qa-2*, *qa-4* y *qa-3* EN EL GENOMA DE *Neurospora crassa*.
(Obtenido de la referencia 50). Y LOCALIZACION DE LOS SITIOS DE RESTRICION PARA -
LAS ENZIMAS *BamH1* Y *Pst1*.

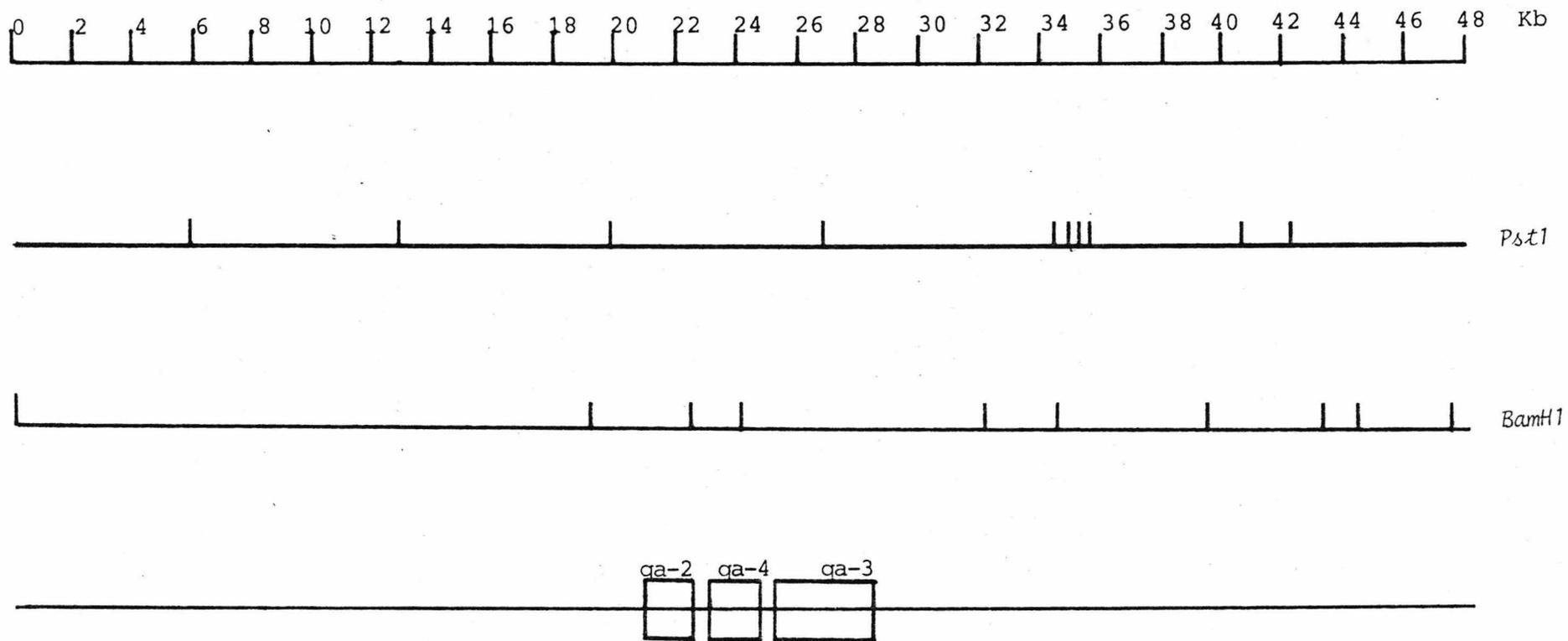


FIG. 3.- CONSTRUCCION DE pDR1.

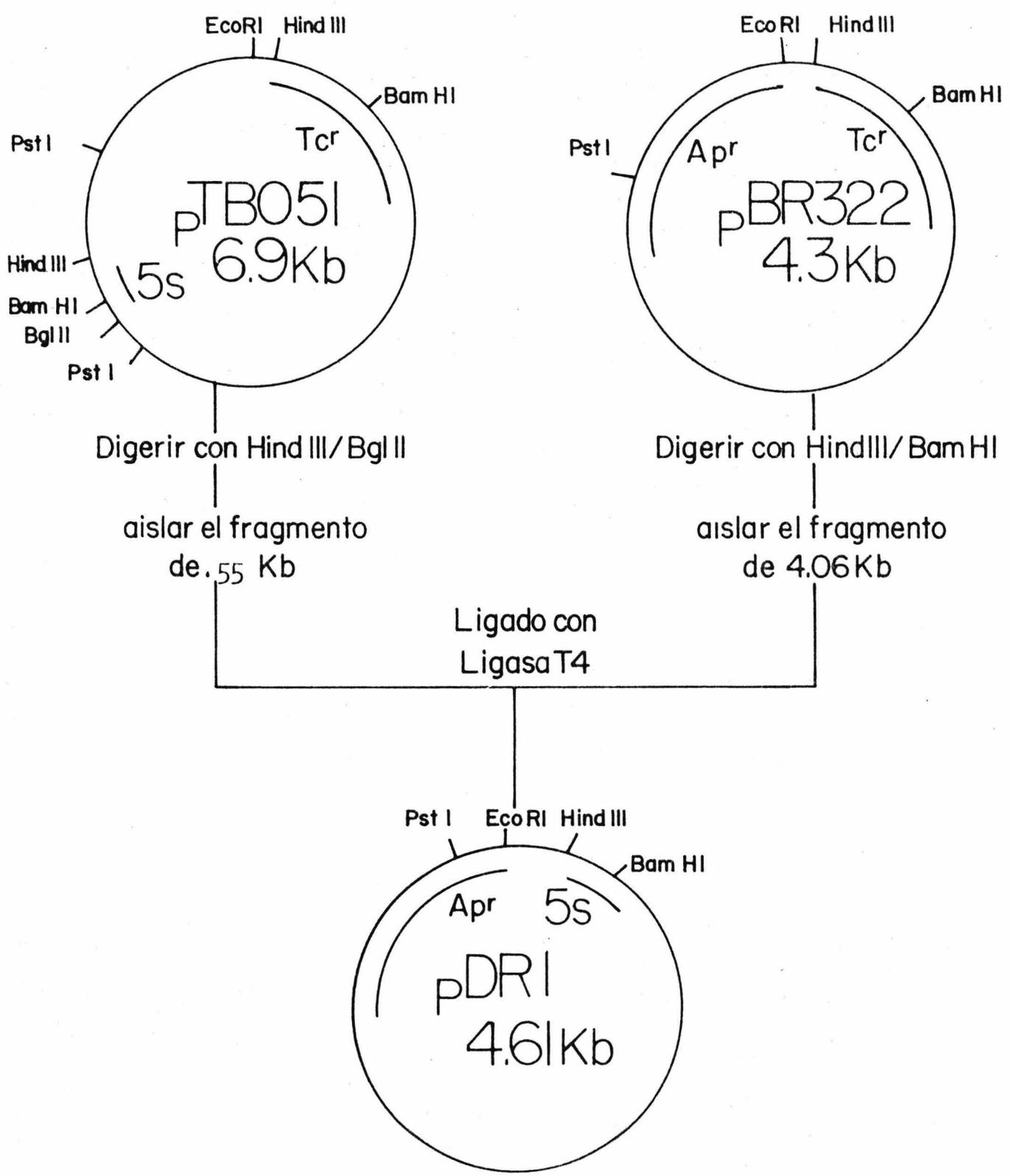


FIG.4.- CARACTERIZACION DE pDR1.

A) Fago λ / <i>HindIII</i>	Kb	CEPA	CRECIMIENTO		
			MM	MM-leu	MM-leu-Ap
B) pDR1/ <i>BamHI</i>	4.61				
C) pDR1/ <i>BglII</i>	-	MC1061	-	+	-
D) pDR1/ <i>EcoRI</i>	4.61	ECX-1	-	+	+
E) pDR1/ <i>HindIII</i>	4.61				
F) pDR1/ <i>PstI</i>	4.61				

MAPA DE RESTRICCIÓN DE pDR1

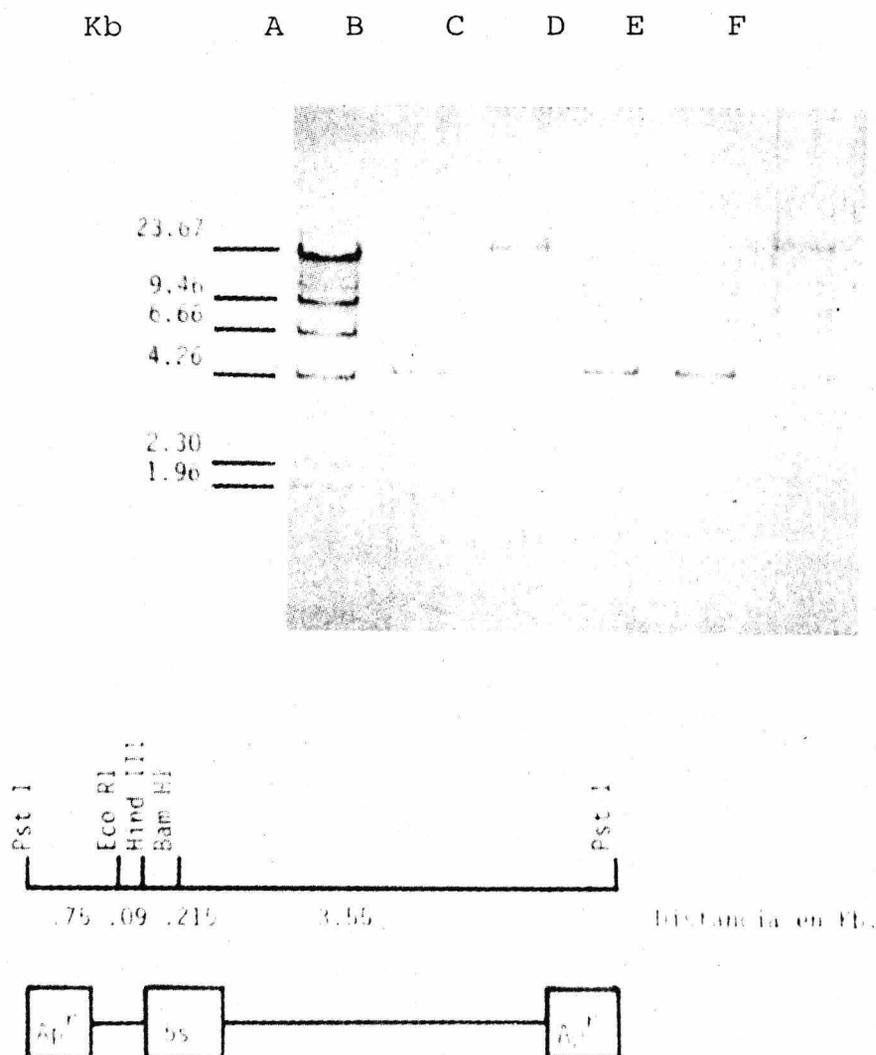


FIG.5.- CONSTRUCCION DE pDR3.

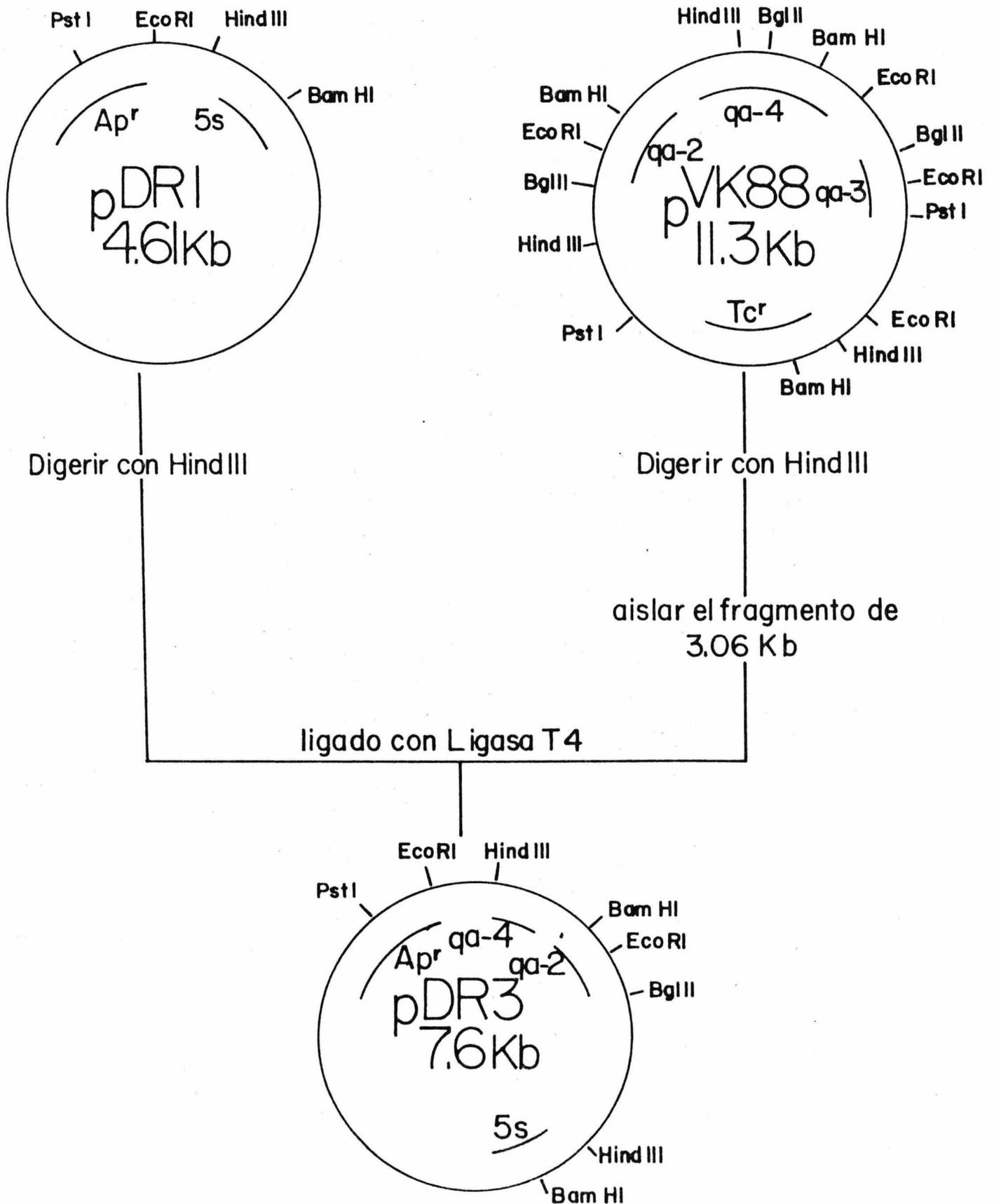


FIG.6.- CARACTERIZACION DE pDR3.

	Kb	CEPA	CRECIMIENTO				
			MM	MM-leu	MM-leu- arom.	MM-arom	MM-leu Ap-arom
A) pDR3/ <i>Bam</i> H1	5.525 y 2.145						
B) pDR3/ <i>Bgl</i> II	7.67						
C) pDR3/ <i>Eco</i> R1	6.19 y 1.48	SK2881	-	-	+	-	-
D) pDR3/ <i>Hind</i> III	4.61 y 3.06	SK2886	-	+	+	-	+
E) pDR3/ <i>Pst</i> I	7.67	ECX-2	-	+	+	-	+
F) Fago λ / <i>Hind</i> III							

MAPA DE RESTRICCION DE pDR3

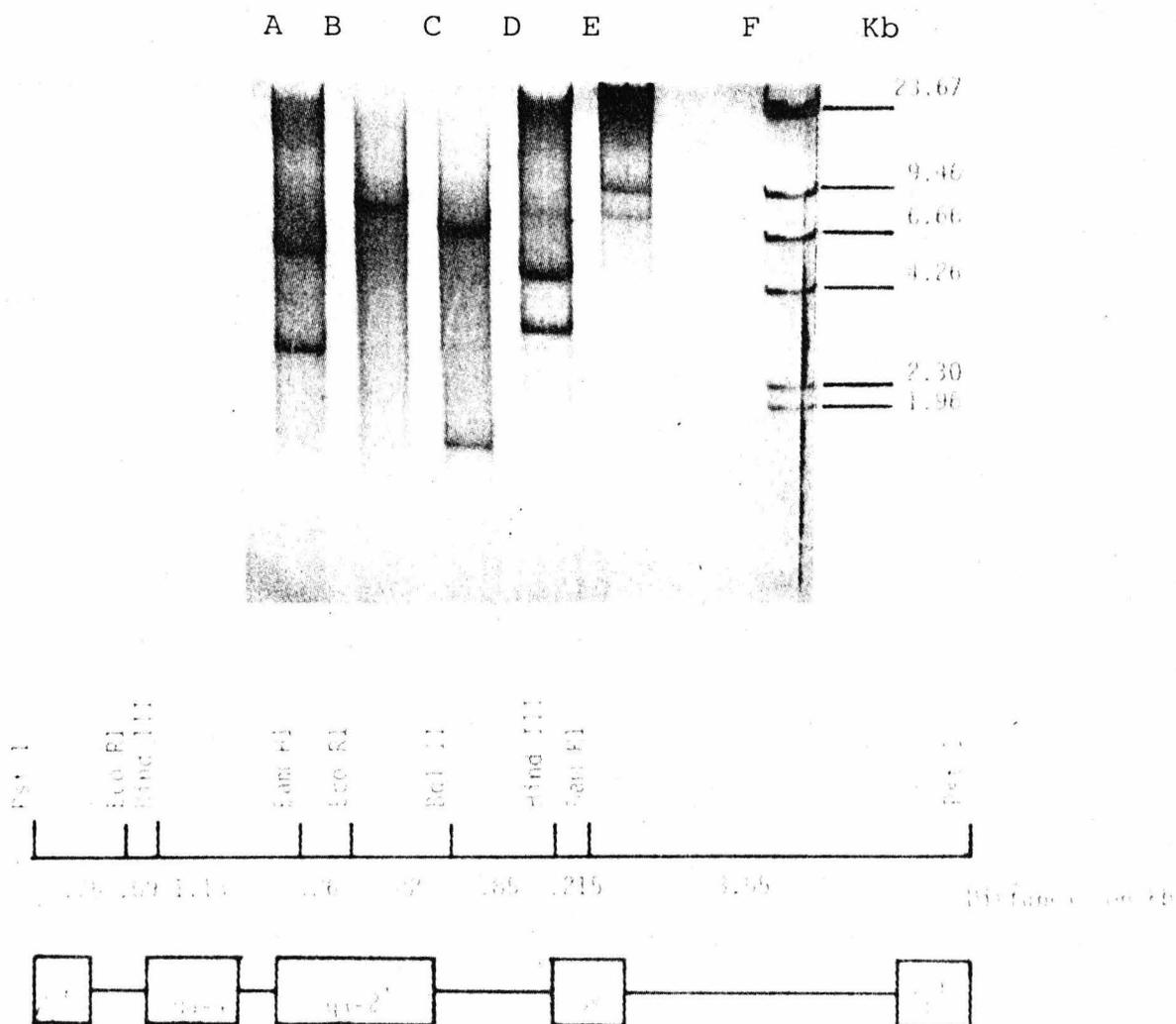


FIG.7.- CONSTRUCCION DE pRC57.

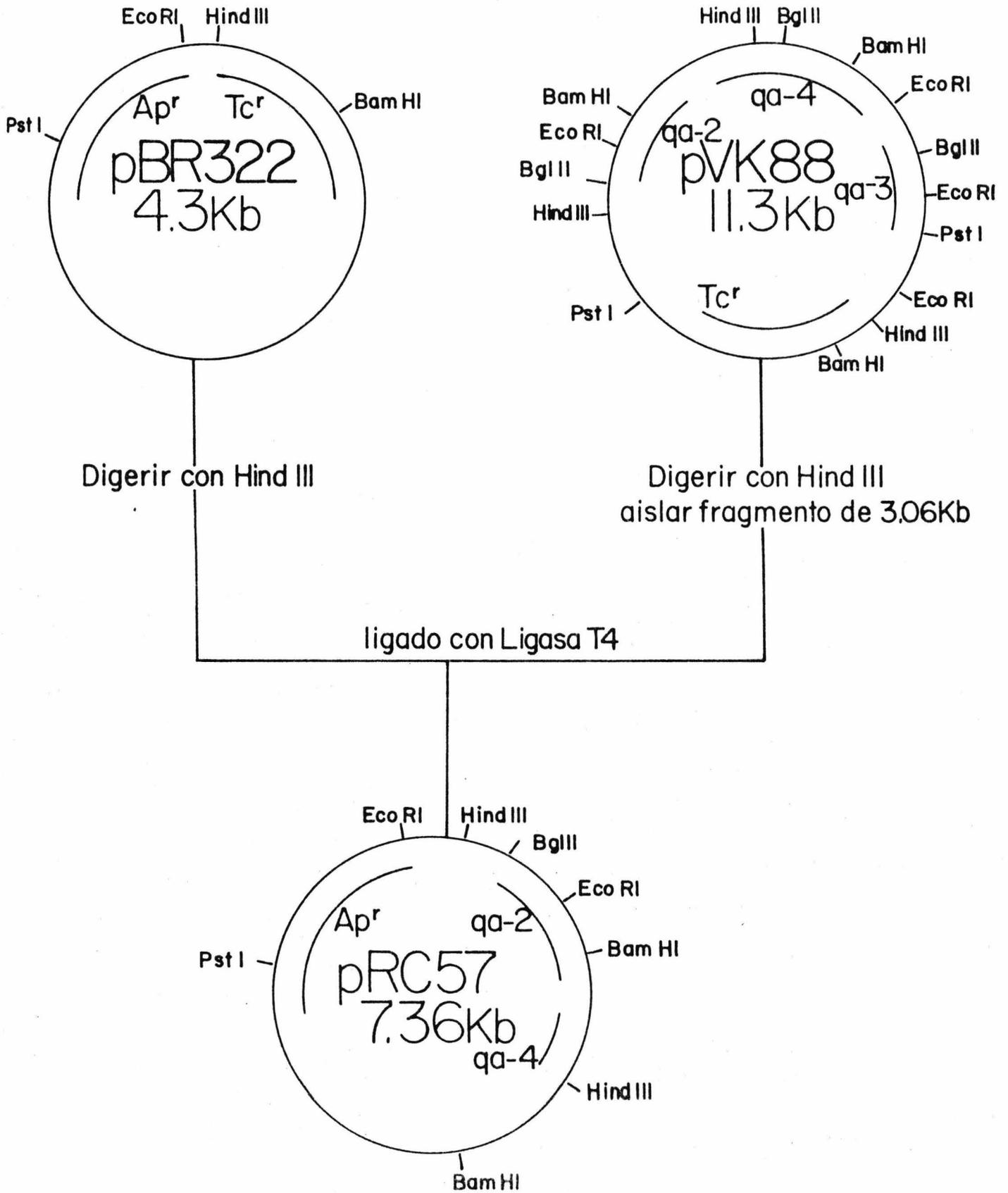


FIG 8.- LOCALIZACION DEL GENE $ga-2^+$ EN LAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS CON pDR3 y pRC57.

Todos los DNAs están cortados con la enzima *Pst*I. y el detector utilizado es $\{\alpha^{32}P\}$ CTP pRC57.

- A) 74A
- B) NCX-11
- C) NCX-13
- D) NCX-23
- E) NCX-105

Proviene de pDR3.

- F) NCX-131
- G) NCX-132
- H) NCX-141
- I) NCX-150
- J) NCX-161
- K) NCX-169

Proviene de pRC57.

- L) Fago λ / *Bam*H1 , revelado por BrEt.

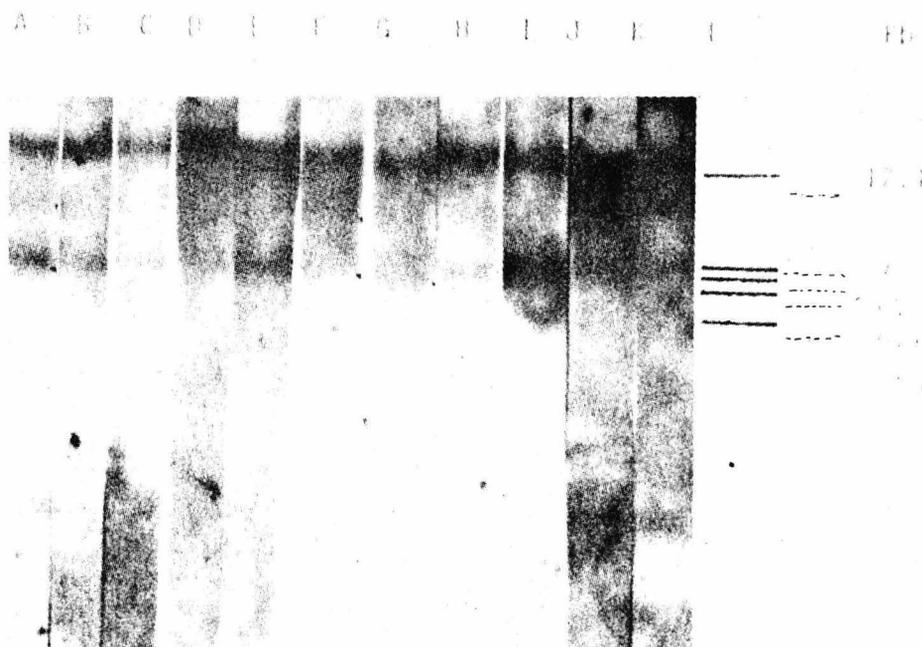


FIG.9.- LOCALIZACION DEL GENE $qa-2^+$ EN LAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS CON pRC57.

Todos los DNAs están fragmentados con la enzima *BamH1* y el detector utilizado es $\{\alpha^{32}P\}$ CTP pRC57.

- A) 74A
- B) NCX-131
- C) NCX-132
- D) NCX-141
- E) NCX-150
- F) NCX-161
- G) NCX-169
- H) Fago λ / *BamH1* y revelado por BrEt

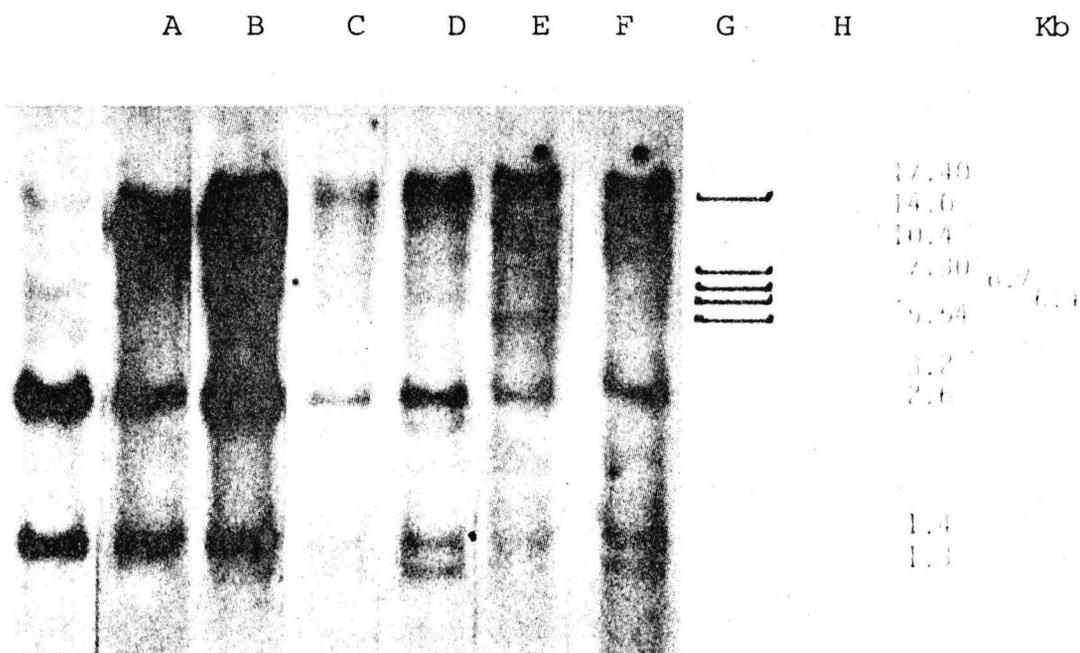
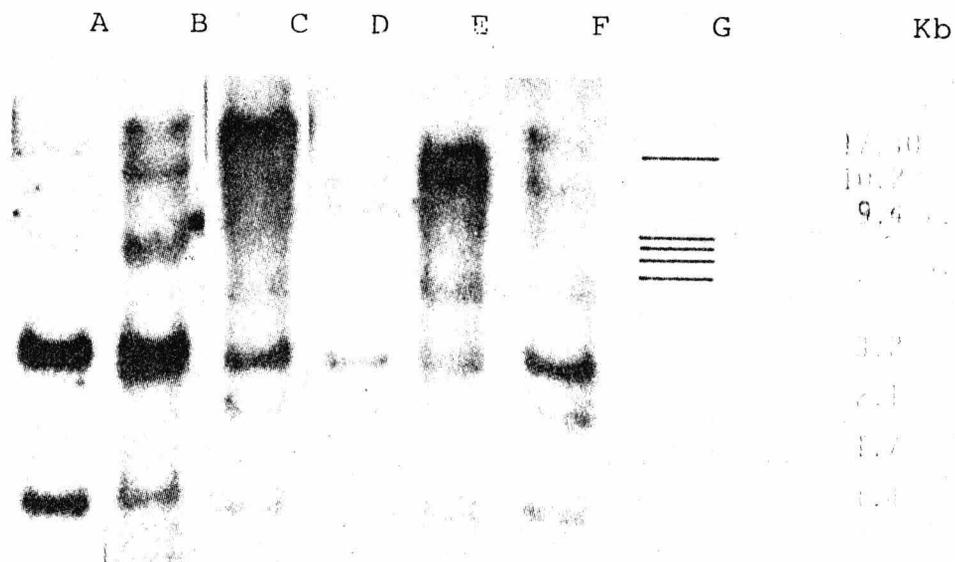


FIG 10.- LOCALIZACION DEL GENE $qa-2^+$ EN LAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS CON pDR3.

Todos los DNAs están cortados con la enzima *BamH1* y el detector utilizado es $\{\alpha^{32}P\}$ CTP pRC57.

- A) 74A
- B) NCX-11
- C) NCX-13
- D) NCX-23
- E) NCX-62
- F) NCX-105
- G) Fago λ /*BamH1* y revelado por BrEt.



TABLAS

TABLA I.- TRANSFORMACION CON DNA NATIVO (50 Kb en promedio) Y CON DNA DE VIRUS DE DIFERENTES FUENTES EN DIFERENTES TIPOS DE CELULAS RECEPTORAS.
(Información obtenida de las referencias 9-45).

En este tipo de transformación, el DNA introducido se estabiliza por integración al genoma.

* La eficiencia está reportada como el número de transformantes que se obtienen por μg de DNA utilizado.

TIPO DE DNA	FUENTE	TIPO DE CELULA RECEPTORA	EFICIENCIA*
Nativo de 50 Kb en promedio.	Bacteria	Bacteria	5-50
	<i>N.crassa</i>	<i>N.crassa</i>	-1
	Mamífero	Mamífero	5-50
Virus	Bacteria	Bacteria	500-5000
	Mamífero	Mamífero	500-5000

TABLA II.- TRANSFORMACION CON DNA DE PLASMIDOS DE DISTINTAS FUENTES, EN DIFERENTES CELULAS RECEPTORAS.

(Información obtenida de las referencias 9-45).

En este tipo de transformación, el DNA se estabiliza de las siguientes maneras: Cuando la célula receptora es bacteria, se mantiene extracromosomal, cuando es levadura, lo hace en forma extracromosomal y por integración al genoma. El caso de *N.crassa* es similar al de levadura, sin embargo sólo se conoce un ejemplo de estabilidad extracromosomal (61). Para el caso de células de mamífero, la estabilidad se logra por integración al genoma.

*La eficiencia está reportada por el número de transformantes - que se obtienen por microgramo de DNA utilizado.

FUENTE	TIPO DE CELULAS RECEPTORA	EFICIENCIA*
Bacteria	Bacteria	500-5000
	Levadura	5-50
	Mamíferos	5-50
Levadura	Bacteria	500-5000
	Levadura	500-5000
	<i>N.crassa</i>	5-50
<i>N.crassa</i>	Bacteria	500-5000
	Levadura	5-50
	<i>N.crassa</i>	50-500
Mamífero	Bacterias	500-5000
	Mamífero	50-500

TABLA III.- EFICIENCIA DE TRANSFORMACION EN *N.crassa*. (Experimentos preliminares).

* La eficiencia de transformación está reportada por el número - de transformantes obtenidas por microgramo de DNA.

+.- 3 días a 29°C en oscuridad y 7 días a 25°C, 80% humedad y - luz continua.

#.- 10 días a 25°C, 80% humedad y luz continua.

i.- 13 a 15 días a 25°C, 80% humedad y luz continua.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ESPO-RAS DE LA CEPA M246-89601-2A.	ESTADO MOLECULAR DE pRC57.	EFICIENCIA DE TRANSFORMACION
		*
A)MM Vogel-inl-arom. +	Super-enrollado y relajado.	1 a 3.
B)MM Fries-inl-arom +	Super-enrollado y relajado.	3 a 5.
C)MM Fries-inl-arom +	Relajado	0
D)MM Fries-inl-arom. #	Relajado.	10.
E)MM Fries-inl-arom i	Relajado.	60.

TABLA IV.- EFICIENCIA DE TRANSFORMACION EN *N. crassa* COMPARANDO LOS PLASMIDOS pDR3 Y pRC57.

* Las transformantes están reportadas por microgramo de DNA.

+.- Crecimiento.

-. No crecimiento.

PLASMIDO	CEPA	MM-inl	TRANSFORMANTES *
	M246-89601-2A	-	-
pRC57	M246-89601-2A	+	66
pDR3	M246-89601-2A	+	154.

TABLA V.- SEGREGACION MITOTICA DEL FENOTIPO $qa-2^+$ DE LAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS CON pDR3 y pRC57.

Las cepas NCX-11 a la NCX-105 provienen de la transformación con pDR3 y las cepas NCX-131 a la NCX-169 provienen de pRC57.

CEPA	PROVENIENTES DE MM-inl (% de segregación a $qa-2^-$)	PROVENIENTES DE MM-inl-arom (% de segregación a $qa-2^-$)
NCX-11	65	65
NCX-13	92	98
NCX-23	78	92
NCX-62	51	84
NCX-105	88	95
NCX-131	88	100
NCX-132	23	89
NCX-141	84	97
NCX-150	97	98
NCX-161	76	85
NCX-169	99	100

TABLA VI.- EFICIENCIA DE TRANSFORMACION EN *N.crassa*. COMPARACION DE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACION .

*.- Reportadas por microgramo de DNA.

#.- Este dato fué calculado a partir de la estabilidad de 10% de las transformantes totales.

+.- pHC79, es un cósmido.

ND.- No determinado.

La cepa receptora es M246-89601-2A para todos los casos y todas las clonas contienen el gene qa-2⁺.

PLASMIDO (Kb)	VEHICULO	INSERTO (Kb)	TRANSFORMANTES*		REFERENCIA
			FENOTIPO SILVESTRE.	TOTALES	
pMSK332 19.43	pHC79	13	73#	726	(41)
pVK88 11.3	pBR322	7	10#	100	(39)
pVK57 6.6	pBR322	2.3	5#	45	(39)
pRC57 7.36	pBR322	3.06	10	ND	(61)
pRC57 7.36	pBR322	3.06	66	ND	éste trabajo
pDR3 7.67	pBR322	3.06	154	ND	éste trabajo

DISCUSION

Y

CONCLUSIONES

DISCUSION. Y CONCLUSIONES.

Transformación en N. crassa.

EXPERIMENTOS PRELIMINARES.

La eficiencia de transformación reportada para el plásmido pRC57, evaluada por el número de transformantes estables que se obtienen por μg de DNA, es alrededor de 10 (61).

En los experimentos reportados en la Tabla III de este trabajo, realizados con el objetivo de montar las condiciones de transformación en nuestro laboratorio, la eficiencia de transformación para pRC57 fué de 60 transformantes por μg de DNA utilizado. Este aumento en la eficiencia de transformación depende directamente de las condiciones de crecimiento de la cepa receptora y del estado molecular del plásmido. La hipótesis para explicar este efecto es la siguiente: Las esporas provenientes de crecimientos a 25°C son una población de edad heterogénea en la cuál existe una población de esporas susceptibles a ser transformadas, determinada por el tiempo de cultivo y el estado molecular super-enrollado del plásmido que lo hace más resistente a la degradación por nucleasas. Esta hipótesis está basada en los siguientes datos:

En el experimento reportado en A, Tabla III, se utilizaron esporas provenientes de crecimientos en Vogel, pero la germinación y la transformación se realizó en Fries. La diferencia en la eficiencia de transformación entre el experimento reportado en A vs B, Tabla III, no es significativa, ya que en experimentos donde se utiliza Vogel en lugar de Fries, tanto en el crecimiento como durante la transformación, la eficiencia de transformación no es afectada (M.E. Case, comunicación personal).

El DNA utilizado en todos los experimentos provienen de --

centrifugaciones por 3 gradientes de CsCl/BrEt. La razón de esta purificación es quitar el RNA contaminante, ya que puede bajar la eficiencia de transformación hasta 100 veces (39). Sin embargo, la baja eficiencia reportada en A y B, Tabla III, nos planteó la posibilidad de que se tratara de un efecto causado por el estado molecular del plásmido, ya que se utilizó en estos experimentos una mezcla del estado relajado y super-enrollado de pRC57. Para analizar esta posibilidad, se llevó a cabo el experimento descrito en C, Tabla III, donde se observa una ausencia de transformantes al utilizarse exclusivamente el estado relajado. La interpretación de este dato es la siguiente: Un plásmido en estado relajado es más susceptible a ser degradado por enzimas nucleasas que un plásmido en estado super-enrollado. Un dato que apoya esta hipótesis, es la baja eficiencia de transformación que se obtiene cuando se utilizan fragmentos de DNA-total para transformar (46,47).

El experimento reportado en D, Tabla III, tiene una eficiencia de transformación similar a la reportada para pRC57. La diferencia en el crecimiento de la cepa receptora es la causa de este efecto (comparar con los datos reportados en B, Tabla III). La explicación a este efecto está basada en observaciones realizadas, en experimentos donde se modifica la relación entre el DNA y el número de células receptoras, donde no se aumenta la eficiencia de transformación pero sí se disminuye hasta 100 veces (39). Por esta observación M.E. Case postula la existencia de una población susceptible de esporas para la transformación, sin embargo, esta hipótesis no ha sido corroborada.

Si suponemos la existencia de esta población susceptible, se puede explicar los datos obtenidos en los experimentos D y E de la Tabla III, a través de proponer que la población susceptible a la transformación es función de un estado fisiológico de las esporas y por lo tanto del tipo de crecimiento. El experimento realizado en E, Tabla III, se hizo como el reportado en D, pero con un mayor tiempo de incubación a 25°C, con la finalidad de a

nalizar un efecto en la eficiencia de transformación dependiendo del tiempo de crecimiento de las esporas. El incremento en la eficiencia de transformación bajo estas condiciones lo explicamos postulando que en estas condiciones, el crecimiento de mayor -- tiempo genera esporas (mayor cantidad) en estado de susceptibilidad para la transformación.

Los datos presentados en la Tabla III, de este trabajo, sugieren la posibilidad de mejorar el método de transformación. En *N.crassa* se conoce poco acerca de la fisiología de la cepa receptora en cuanto a los mecanismos involucrados en la entrada del DNA, así como de los estados fisiológicos involucrados en la transformación. Es pues necesario diseñar estrategias experimentales con el objeto de encontrar los parámetros de los que depende la susceptibilidad a la transformación. El responder a estas preguntas, ayudaría a encontrar la mejor condición para la transformación.

TRANSFORMACION DE M246-89601-2A CON pDR3 Y pRC57.

Una vez montado el método de transformación, se procedió a comparar la eficiencia de transformación entre el plásmido pRC57- y el plásmido pDR3. El resultado de este experimento (Tabla IV), muestra que pDR3 tuvo alrededor de 3 veces más transformantes estables fenotípicamente que pRC57 (154 vs 66). Ya que pDR3 (7.67 Kb) y pRC57 (7.36 Kb) son plásmidos muy similares en tamaño, que poseen la misma región de ga-2⁺ en un fragmento de 3.06 Kb (*HindIII-HindIII*) y que los dos fragmentos están clonados en el pBR322, se propone que la mayor eficiencia de transformación de pDR3 se debe a la presencia del gene 5S ribosomal, lo cuál es similar a los datos reportados en levadura (63).

En la Tabla VI, se compara la eficiencia de transformación en *N.crassa* entre pDR3 y datos reportados con otros vehículos moleculares que complementan a la mutante M246-89601-2A, por contener el gene ga-2⁺. De estos datos se concluye que el gene 5S ribosomal incrementa la eficiencia de transformación en *N.crassa*, cuan-

do se transforma con plásmidos que lo contienen.

La eficiencia de transformación evaluada únicamente por el número de transformantes estables que se obtienen por microgramo de DNA de pDR3, comparada con la que se obtiene en otros vehículos es alta y similar a la del cósmido pMSK332, sin embargo, para que este dato sea conclusivo se propone hacer transformaciones con este cósmido, utilizando el método de transformación reportado en este trabajo.

El número de transformantes obtenidas con pDR3 es similar al reportado en *S.cerevisiae* (63), cuando se utiliza la región de DNA que codifica para los precursores del RNA 35S ribosomal (100 a 200 transformantes por μg de DNA), Este dato y la morfología silvestre de las colonias obtenidas en *N.crassa* con pDR3, nos llevó a proponer que la estabilidad de la información introducida era lograda por la inserción en el genoma. Sin embargo, si la inserción se logra por la recombinación homóloga con las secuencias 5S ribosomales en el genoma, se espera un incremento de 100 veces y no de 3 veces, comparando pDR3 con pRC57 (ya que hay alrededor de 100 copias de 5S ribosomal por genoma). Las posibles explicaciones a este incremento menor son las siguientes:

- 1) En *S.cerevisiae* (63) las clonas que contienen la región 5S ribosomal poseen un ars, el cuál logra estabilizar la información introducida independientemente del número de sitios posibles de integración. pDR3 puede contener un ars, pero no incrementar la eficiencia de transformación como en el caso de levadura.
- 2) Dado que pRC57 puede integrarse en más de un sitio en el genoma y no conocemos el número de sitios secundarios de integración (integración de tipo adyacente y de tipo no ligada), el aumento en la eficiencia de transformación de pDR3 puede ser menor, debido a que la relación no es lineal (100 para 5S vs 1 para qa-2⁺)
- 3) Pudiera ser que no todos los sitios de 5S en el genoma están expuestos para recombinar con pDR3.
- 4) La integración de pDR3 en sitios de 5S puede interrumpir secuencias, que la consecuencia resulte letal para la célula y por lo tanto no se recuperan. pDR3 puede integrarse en forma adyacen

te, dado que la clonación del gene 5S ribosomal en pDR3, abarca secuencias exógenas al gene.

Para explorar estas posibilidades, se procedió a realizar dos experimentos simultáneos. El primero fué analizar la segregación del fenotipo $qa-2^+$ en las transformantes y el segundo, fué buscar la localización del gene $qa-2^+$ en el genoma de las mismas transformantes.

Segregación mitótica del fenotipo $qa-2^+$ en las transformantes obtenidas con los plásmidos pDR3 y pRC57.

El experimento se realizó como esta descrito en MATERIALES-Y METODOS y el resultado se encuentra en la Tabla V.

M. E. Case, reportó que las transformantes obtenidas con el plásmido pVK88 (38) son estables mitóticamente y que todas poseen integrado el gene $qa-2^+$ en su genoma. Las frecuencias de segregación a $qa-2^-$ fenotípicamente para las transformantes obtenidas con pDR3 y pRC57 son muy altas en presencia y en ausencia de presión selectiva. Este dato sugiere fuertemente, que la complementación conferida por pDR3 ó pRC57 no es a través de una inserción estable en el genoma. Una explicación diferente para este fenotipo de alta segregación mitótica de $qa-2^+$ a $qa-2^-$, es que la población de núcleos no sea homogénea. Dado que la transformación se realiza en esporas, las cuáles tienen de 1 a 3 núcleos es posible que no todos los núcleos sean transformados y que basten solo algunos transformados para complementar fenotípicamente la cepa. Después de la transformación, las células receptoras se fusionan y estas forman hifas durante su crecimiento. Las hifas son un sincicio, que permite que haya difusión de todo el citoplasma y entonces todos los núcleos no transformados pueden ser acarreados en la colonia y formar parte de las nuevas esporas. Si esta hipótesis es cierta, las transformantes aquí presentadas pueden tener una alta frecuencia de segregación mitótica a $qa-2^-$ y mantener el fenotipo $qa-2^+$ por inserción en algunos núcleos. Además de la complementación extracromosomal, otra posibilidad es que la complementación de $qa-2^-$ en la cepa receptora por los-

plásmidos qa-2⁺ no sea nuclear sino citoplásmica.

Para explorar estas posibilidades, se propone hacer cruza con las transformantes, utilizándolas como donadoras y receptoras para el fenotipo qa-2⁺. Además, seleccionar algunas esporas de una transformante y analizar la frecuencia de segregación mitótica para cada espora.

Los experimentos de localización del gene qa-2⁺ en estas mismas transformantes se discuten a continuación. El dato más interesante hasta este momento, es que la alta frecuencia de segregación mitótica, también se encuentra en las cepas transformadas con pRC57, que es una subclonación de pVK88. Una de las hipótesis que postula M.E. Case para explicar las transformantes abortivas (90% de la población de transformantes con pVK88) es la existencia de un ars inestable en la región clonada de qa (comunicación personal). En los experimentos realizados con pDR3 y pRC57 ambos presentaron transformantes abortivas.

Localización del gene qa-2⁺ en las transformantes obtenidas con pDR3 y pRC57.

El primer experimento que se realizó para investigar la localización del gene qa-2⁺ en las transformantes de pDR3 y pRC57, fue la purificación del DNA de las transformantes, cortado con *Pst*I sometido a electroforesis en geles de agarosa y transferido a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente se hibridizó con el pRC57 { α^{32} P} CTP, utilizándolo como detector del gene qa-2⁺. Las transformantes obtenidas con pDR3 y pRC57 sometidas a este experimento mostraron dos bandas de hibridización, una de 7 Kb y la otra de alrededor de 17 Kb. (Fig.8). En el genoma de *N.crassa* se encuentran los genes qa-2, qa-4 y un fragmento de qa-3 en una región de 7 Kb flanqueada por los sitios de reconocimiento para la enzima *Pst*I, hacia cada lado de esta región, se encuentra a una distancia de alrededor de 7 Kb para cada caso el sitio próximo de *Pst*I. (50) (Fig.2). El plásmido pRC57 contiene el gene qa-2⁺ y un fragmento de qa-4, cuando pRC57 { α^{32} P} CTP se hibridiza con el -

genoma de la cepa silvestre 74 A cortado con *Pst*I y se expone a autorradiografía, el resultado que se observa es sólo una banda de hibridización en la zona de 7 Kb de peso molecular. La banda de alrededor de 17 Kb en la Fig.8, se interpreta como un corte parcial de la enzima en el genoma.

El hecho de observar sólo una banda de hibridización de alrededor de 7 Kb en todas las transformantes analizadas, se interpreta de la siguiente manera: Tanto pDR3 (7.6 Kb) como pRC57 (7.36 Kb) sólo contienen un sitio para *Pst*I (Fig. 5,6), de tal manera que las transformantes que los contengan presentarían una sola banda de hibridización en el caso de que se encuentren en forma extracromosomal.

La intensidad de la banda de 7 Kb del genoma qa-2⁻, puede enmascarar la banda de hibridización de estos plásmidos debido a la similitud de peso molecular y por lo tanto, sólo se observa una banda de alrededor de 7 Kb (Fig.8). Si el plásmido se encontrara integrado al genoma, se debe observar una migración diferente de 7 Kb y la banda de hibridización del genoma qa-2⁻. Sin embargo, no se observó ningún patrón de hibridización con estas características. Con la finalidad de analizar mejor la localización del gene qa-2⁺ en las transformantes, se realizó el experimento descrito en la parte de RESULTADOS y el resultado se muestra en las figuras 9 y 10. En estos experimentos, los DNAs se fragmentaron con la enzima *Bam*HI en lugar de *Pst*I. La hibridización se realizó utilizando como detector pRC57. En el genoma de la cepa silvestre 74A (carril A, Fig.9y10) pRC57 hibridiza en un fragmento de 3.2 Kb que contiene casi completo el gene qa-2 y un fragmento de 1.4 Kb, que contiene parte del gene qa-2 y qa-4 (los tamaños de los fragmentos fueron inferidos a partir del mapa de sitios de restricción en la región de qa de *N.crassa*, que ha sido reportada (50) (Fig.2)).

El plásmido pRC57 esta constituido por un fragmento de 5.9 Kb y uno de 1.3 Kb cuando se corta con *Bam*HI (Fig.7). En la Fig.9 carriles C y F, se observa un patrón de hibridización que presen

ta los fragmentos de 5.9 y 1.3 Kb del plásmido y 3.2 y 1.4 del genoma. Estas bandas de hibridización son las esperadas para las transformantes obtenidas con pRC57 que mantuvieran su fenotipo $qa-2^+$ extracromosomalmente. La otra posibilidad de generar este patrón de hibridización, es mediante la recombinación homóloga entre $qa-2^-$ del genoma de la cepa receptora con $qa-2^+$ del plásmido, esta posibilidad quedó descartada debido a los siguientes datos:

1) Si estuviera integrado el plásmido sería estable mitóticamente y la frecuencia de segregación de estas transformantes al fenotipo $qa-2^-$ es muy alta.

2) La intensidad de las bandas de hibridización entre los fragmentos de 3.2 y 1.4 Kb comparadas a las de los fragmentos 5.9 y 1.3 Kb es diferente. Las bandas del genoma de la cepa receptora son más intensas y además 3) El patrón de hibridización con *Pst*I (Fig. 8) sólo generó una banda de hibridización de alrededor de 7 Kb.

Estos datos sugieren, que pRC57 puede existir como plásmido extracromosomal en las transformantes.

En la cepa NCX-131 (carril B, Fig.9) no se detectan los fragmentos de 1.3 y 5.9 Kb correspondientes al plásmido pRC57. La alta frecuencia de segregación mitótica en esta transformante, sugiere que el fenotipo $qa-2^+$ está conferido extracromosomalmente. Quizá un plásmido con alta segregación, no puede recuperarse en buena cantidad y por lo tanto no se observa su patrón en estas condiciones. También se observó una sola banda de hibridización en el caso del DNA fragmentado con *Pst*I (Fig8).

En los carriles D, E y G de la Fig.9, no se observa el patrón de hibridización esperado para pRC57. El hecho de que solo se encuentre el fragmento de 1.3 Kb y otras bandas en otras posiciones, sugiere que parte del plásmido se integró al genoma por inserción de tipo no ligada, pero que no contiene el gene $qa-2^+$. Esta posibilidad se basa en la intensidad de las bandas de hibridización del genoma, que es mayor a las causadas por esta integración, si alguna fuera responsable del carácter $qa-2^+$ debería ser igualmente intensa. Nuestra hipótesis para este caso, es que se

trata de transformantes en las cuáles se insertó parte del plásmido y que el fenotipo $qa-2^+$ está conferido extracromosomalmente. Esta estabilidad es muy baja, lo que se refleja en su alta segregación y por lo tanto dificulta la obtención del DNA del plásmido en las transformantes.

Las transformantes obtenidas con pDR3, fueron sometidas al experimento anterior y los patrones moleculares de hibridización, se encuentran reportados en la Fig. 10. Como en el caso anterior, el genoma de la cepa silvestre 74A presenta dos bandas de hibridización, una de 3.2 Kb y la otra de 1.4 Kb, pDR3 está formado por un fragmento de 5.5 Kb y otro de 2.1 Kb cuando se corta con la enzima *BamH1* (Fig.6). Los carriles C, E y F, en la Fig.10 presentaron un patrón de hibridización en los que se encuentran los fragmentos de 5.9, 3.2, 2.1 y 1.4 Kb, donde los fragmentos correspondientes a pDR3 son menos intensos comparados a los del genoma, este dato sugiere que también pDR3 se encuentra extracromosomalmente. El mismo patrón de hibridización se puede obtener si pDR3 recombina homológamente con la región $qa-2^-$ de la cepa receptora. Sin embargo, esta posibilidad es muy poco probable, ya que si fuera el caso, entonces la intensidad de las bandas de hibridización entre las del plásmido y las del genoma serían iguales, además de presentar más de una banda de hibridización cuando los DNAs se analizaron con la enzima *PstI* (Fig.8) y serían transformantes muy estables mitóticamente.

En la Fig.10, carriles B y D, no se presenta el patrón de hibridización esperado. Estas cepas sólo presentaron una banda de hibridización cuando sus DNAs fueron cortados con la enzima *PstI* e hibridizados con pRC57 (Fig.8). Esta variación en el patrón de hibridización en estas transformantes se interpretan, como inserciones de tipo no ligadas de parte del vehículo pDR3, pero que no son responsables del fenotipo $qa-2^+$, debido a su alta frecuencia de segregación y a la menor intensidad de las bandas que hibridizan, comparadas con las del genoma $qa-2^-$. Por lo tanto, la interpretación a estos datos es que se tratan de transformantes con parte de pDR3 integrado a sus genomas, pero el fe-

notipo $qa-2^+$ está conferido en forma extracromosomal.

Los datos presentados aquí sugieren fuertemente que tanto pDR3 como pRC57 tienen la capacidad de mantenerse en forma extracromosomal en *N. crassa* posiblemente debido a la existencia de un ars en la región de $qa-2^+$ clonada.

Este razonamiento apoya la hipótesis, en la cuál se explica a las transformantes abortivas como cepas con un ars inestable. La región ars debe estar cercana a la región $qa-2^+$ clonada, ya que es la secuencia conservada en pDR3 y pRC57. Sin embargo, la participación del gene 5S no es muy clara en cuanto a este efecto, aunque debe contribuir en alguna forma, dado el número de -- transformantes que se obtienen al utilizarse. En *N. crassa* se ha reportado recientemente la existencia de un plásmido que se mantiene extracromosomalmente debido a la existencia de un origen de replicación de mitocondria, y porta la región $qa-2^+$. El número de transformantes que se obtiene en promedio es de 130, pero no se ha sometido a un estudio similar al que se realizó en este trabajo, por lo que es difícil tratar de relacionar los plásmidos utilizados aquí con este plásmido.

Para el caso de pDR3 y pRC57 se proponen los siguientes experimentos con el objeto de encontrar más evidencia para proponerlos como plásmidos de estabilidad extracromosomal en *N. crassa*:

- 1) Utilizar las transformantes como donadoras y receptoras del fenotipo $qa-2^+$ en cruza.
- 2) Cruzar las transformantes obtenidas con la cepa M246-89601-2a y repetir el experimento de segregación mitótica y de hibridización.
- 3) Repetir las hibridizaciones pero utilizando por separado los detectores $qa-2^+$ y pBR322.
- 4) Con el DNA obtenido de las transformantes, transformar la cepa de *E. coli* SK2881 auxótofa de aminoácidos aromáticos, seleccionando en medio mínimo. De estas transformantes purificar plásmido y caracterizarlo por medio de enzimas de restricción que tienen sitio caracterizado en pRC57 y pDR3.

Conclusiones.

Las conclusiones generales obtenidas de este trabajo son las siguientes:

- 1) Se ha montado las condiciones experimentales para la transformación genética de *Neurospora crassa* en nuestro laboratorio.
- 2) La eficiencia de transformación ha sido aumentada, al evaluarla como el número de transformantes con fenotipo silvestre que se obtienen por microgramo de DNA utilizado.
- 3) El aumento en la eficiencia de transformación se ha logrado, aparentemente a través de la incorporación de un fragmento de --DNA de *N. crassa* conteniendo un gene 5S ribosomal y posiblemente - un ars.
- 4) Las transformantes obtenidas tanto para pDR3 como para pRC57-segregan a una frecuencia muy alta mitóticamente.
- 5) La localización del gene qa-2⁺ en las transformantes, sugiere fuertemente que el fenotipo qa-2⁺ está conferido extraxromosomalmente y que posiblemente se deba a la existencia de un ars cercano al gene qa-2.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Metzenberg, R. L. (1979). "Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*." *Microb. Rev.* 3:21-26.
- 2) Brockman, H. E., and De Serres, F. J. (1963). "Sorbose toxicity in *Neurospora*." *Amer. J. Bot.* 50:709-714.
- 3) Metzenberg, R. L., Gleason, M. K., and Littlewood, B. S. (1974). En Wilcox, J. Abelson, and C. F. Fox (ed) ICN-UCLA. Conference Proceedings on "Molecular Approaches to Eucaryotic Genetic Systems". Academic. Press. Inc. New York. 8:253-268.
- 4) Wilson, J. F. (1963). "Transplantation of nuclei in *Neurospora crassa*". *Amer. J. Bot.* 50:780-786.
- 5) Wilson, J. F., Garnjobst, L., and Tatum, E. L. (1961). "Heterocaryon incompatibility in *N. crassa*-microinjection studies". *Amer. J. Bot.* 48:299-305.
- 6) Perkins, D., Radford, A., Newmeyer, D., and Bjorkman. (1982). "Chromosomal loci of *Neurospora crassa*". *Microb. Rev.* 46:426-570.
- 7) Scott, W. A. (1976). "Biochemical genetics of morphogenesis in *Neurospora*." *Ann. Rev. Microb.* 30:85-104
- 8) Alberghina, L., and Sturani, E. (1981). "Control of growth and the nuclear division cycle in *Neurospora crassa*". *Microb. Rev.* 1:99-122.
- 9) Schmit, J. C., and Brody, S. (1976). "Biochemical genetics of *Neurospora crassa*. Conidial germination." *Bacteriol. Rev.* 1-41.
- 10) Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J., y Mora, J. (1980). "Relation between-structure and function of *Neurospora crassa* glutamine synthetase". *Biochem. Biophys. Res. Com.* 92:134-140.
- 11) Sánchez, F., Calva, E., Campomanes, M., Blanco, L., Guzmán, J., Saborío, J. L., and Palacios, R. (1980). "Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Neurospora crassa*". *J. Biol. Chem.* 255:2231-2234.
- 12) Hummelt, G., and Mora, J. (1980). "Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*". *Biochem. Biophys. Res. Com.* 96:1688-1694.
- 13) Hummelt, G., and Mora, J. (1980). "NADH-Dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*". *Biochem. Biophys. Res. Com.* 92:127-133.
- 14) Lara, M., Blanco, L., Campomanes, M., Calva, E., Palacios, R., and Mora, J. (1982). "Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*". *J. Bacteriol.* 150:105-112.
- 15) Espín, G., Palacios, R., and Mora, J. (1979). "Glutamine metabolism in nitrogen-starved conidia of *Neurospora crassa*". *J. Gen. Microbiol.* 115:59-68.

- 16) Mora, J., Dávila, G., Espín, G. *et al.* (1980). Glutamine metabolism in *Neurospora crassa*. In Glutamine : Metabolism, Enzymology and Regulation. J. Mora y R. Palacios (ed). Academic Press. Inc. 185-212.
- 17) Avery, O. T., Colin, M. D., MacLeod, M. D., and Maclyne Mc Artty, M. D. (1944). "Studies on the chemical substance inducing transformation of *pneumococca* types". J. Exp. Med. 79:137-158.
- 18) Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sanbrook, J. (1982). "Molecular cloning. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor.
- 19) Broach, J. R., Strathern, J. N., and Hicks, J. B. (1979). "Transformation in yeast: Development of a hybrid cloning vector and isolation of the - CAN1 gene". Gene 8:121-133.
- 20) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, J., and Kimura, A. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations". J. Bacteriol. 153:163---168.
- 21) Fournier, P., Gaillardin, G., Louvencourt, L., Heslot, H., Lang, B. F., and Kaudewitz, F. (1982). "r-DNA plasmid from *Schizosaccharomyces pombe*: - cloning and use in yeast transformation". Curr. Gen. 6:31-38.
- 22) Woo, S. W., Limmane, A. W., and Nogley, P. (1982). "Genetic changes in yeast cells cotransformed with mitochondrial DNA and plasmid YEp 13 are not elicited by recombinant molecules made by covalent insertion of mitochondrial DNA into YEp13". Biochem. Biophys. Res. Comm. 109:455-462.
- 23) Venkov, P. V., and Ivanov, V. P. (1982). "Uptake of DNA by fragile mu---tants of *Saccharomyces cerevisiae*". Curr. Gen. 5:153-155.
- 24) Becher, D., Conrad, B., and Bottcher, F. (1982). "Genetic transfer mediated by isolated nuclei in *Saccharomyces cerevisiae*". Curr. Gen. 6:163-165.
- 25) Cohen, J. D., Eccleshall, T. R., Needleman, R. B., Federoff, H., Buchferer, B. A., and Marmur, J. (1980). "Functional expression in yeast of the - *Escherichia coli* plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 77:1078-1082.
- 26) Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. (1978). "Transformation of - yeast". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 75:1929-1933.
- 27) Cooper, G. M., Okenquist, S., and Silverman, L. (1980). "Transforming - activity of DNA of chemically transformed and normal cells". Nature 284:418-421.
- 28) Wagen, T. E., Hope, P. C., Jollick, J. D., Scholl, D. R., Hodinka, R. L., and Gault, J. E. (1981). "Microinjection of a rabbit β -globin gene into - zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 78:6376-6380.
- 29) Peruchó, M., Hanahan, D., and Wigler, M. (1980). "Genetic and physical-linkage of exogenous sequences in transformed cells". Cell. 22:309-317.

- 30) Wagner, E. F., Stewart, T. A., and Mintz, B. "The human β -globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78:5016-5020.
- 31) Perucho, M., Hanahan, D., Lipsich, L., and Wigler, M. (1980). "Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue". Nature. 285:207-210.
- 32) Hynes, N. E., Kennedy, N., Rahmsdorf, U., and Groner, B. (1981). "Hormone-responsive expression of an endogenous proviral gene of mouse mammary tumor virus after molecular cloning and gene transfer into cultured cells". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 78:2038-2042.
- 33) Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G., and Chasin, L. (1979). "DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyl transferase locus into mammalian cells". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 76:1373-1376.
- 34) Shih, C., Shilo, B-Z., Goldfarb, M. P., Dannenberg, A., and Weinberg, R. A. (1979). "Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 76:5714-5718.
- 35) Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L-S, Pellicer, A., Cheng, Y-c, and Axel, R. (1977). "Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultered mouse cells". Cell. 11:223-232.
- 36) Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., and Axel, R. (1978). "Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor". Cell 14:725-731.
- 37) Wigler, M., Sweet, R., Sim, G. K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S., and Axel, R. (1979). "Transformation of mammalian cells with genes from proceryotes and eucaryotes". Cell. 16:777-785.
- 38) Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., and Giles, N. H. (1979) -- "Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid-DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:5259-5263.
- 39) Case, M. E. (1982). "Transformation of *Neurospora crassa*. Utilizing recombinant plasmid DNA." In Genetic Engineering of microorganisms for chemicals. Hollander, A., De Moss, R., Kaplan, S., Konisk, J., Savage, D., and Wolfe, R. S. (ed). Plenum Publishing Co. New York. pp. 87-100.
- 40) Case, M. E. (1981). "Genetic analysis of transformants of the ga gene cluster mutants in *Neurospora crassa*". Genetics, 97, supp.
- 41) Kinnaird, J., Keighren, M. A., Kinsey, J. A., Eaton, M., and Fincham, J. R. S. (1982). "Cloning of the am (glutamate dehydrogenase) gene from *Neurospora crassa* through the use of a syntetic DNA probe". Gene 20:387-396.
- 42) Buxton, F. P., and Radford, A. (1983). "Cloning of the structural gene for Orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*". Mol. Gen. Genet. 190:403-405.

- 43) Keeseey, J. K., and De Moss, J. A. (1983). "Cloning of the trp-1 gene - from *Neurospora crassa* by complementation of a trpC mutation in *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 152:954-958.
- 44) Schechtman, M. G., and Yanofsky, Ch. (1983). "Structure of the trifunctional trp-1 gene from *Neurospora crassa* and its aberrant expression in *Escherichia coli*". J. Mol. Appl. Genet. 2:83-99.
- 45) Smarelli, J. Jr., and Garret, R. H. (1982). "Isolation the *Neurospora crassa* nitrate reductase structural gene: evidence for its expression in *Escherichia coli*". Fed. Proc. 41:756.
- 46) Mishra, N. C. (1979). "DNA-mediated genetic changes in *Neurospora crassa*". J. Gen. Microbiol. 113:255-259.
- 47) Mishra, N. C., and Tatum, E. L. (1973). "Non-mendelian inheritance of - DNA induced inositol independence in *Neurospora crassa*". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70:3873-3879.
- 48) Wooton, J. C., Fraser, M. J., Baron, A. J. (1980). "Efficient transformation of germinating *Neurospora* conidia using total nuclear fragments". *Neurospora Newsletter* 27:33.
- 49) Patel, V. B., Schweizer, M., Dykstra, C. C., Kushner, S. R., and Giles, N. H. (1981). "Genetic organization and transcriptional regulation in the qa gene cluster of *Neurospora crassa*". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78:5783---5787.
- 50) Schweizer, M., Case, M. E., Dykstra, C. C., Giles, N. H., and Kushner, S. R. (1981). "Identification and characterization of recombinant plasmids - carrying the complete qa gene cluster from *Neurospora crassa* including the - qa-1 regulatory gene". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 78:5086-5090.
- 51) Case, M. E., Giles, N. H., Doy, C. H. "Genetical and biochemical evidence for further interrelationships between the polyaromatic synthetic and the quinate-sikiquimate catabolic pathways in *Neurospora crassa*". Genetic. 71: - 337-348.
- 52) Schweizer, M., Case, M. E., Dykstra, C. C., Giles, N. H., and Kushner, S. R. (1981). "Cloning the quinic acid (qa) gene cluster from *Neurospora crassa*: identification of recombinant plasmids containing both qa-2 and qa-3". Gene 14:23-32.
- 53) Hautala, J. A., Basset, C. L., Giles, N. H., Kushner, S. R. (1979). - "Increased expression of a eukariotic gene in *Escherichia coli* through stabilization of its messenger RNA". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 76:5774-5778.
- 54) Reinert, W. R., and Giles, N. H. (1977). "Proof of the novo synthesis - of the qa enzymes of *Neurospora crassa* during induction". - Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 74:4256-4260.
- 55) Alton, N. K., Hautala, J. A., Giles, N. H., Kushner, S. R., Vapnek, D. (1978). "Transcription and translation in *E.coli* hybrid plasmid containing - the catabolic dehydrogenasa gene from *Neurospora crassa*". Gene 4:241-259.

- 56) Vapnek, D., Huautala, J. A., Jacobson, J. W., Giles, N. H., Kushner, S.-R. (1977). "Expression in *Escherichia coli* K-12 of the gene for catabolic dehydroquinase of *Neurospora crassa*". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 74:3508-3512.
- 57) Stinchomb, D. T., Marjorie, T., Thomas, M., Kelly, J., Selker, E., and - Davis, R. W. (1980). "Eukaryotic DNA segments capable of autonomus replication in yeast". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 77:4559-4563.
- 58) Beggs, J. D. (1978). "Transformation of yeast by replicating hybrid plasmid". Nature 275:104-109.
- 59) Collins, R. A., Stohl, L. L., Cole, M. D., and Lambowitz, A. M. (1981).- "Characterization of a novel plasmid DNA found in mitochondria of *N. crassa*".- Cell 24:443-452.
- 60) Stohl, L. L., Collins, R. A., Cole, M. D., and Lambowitz, A. M. (1982).- "Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type *Neurospora intermedia* strains". Nucl. Acid. Res. 10:1439-1458.
- 61) Stohl, L. L., and Lambowitz, A. M. (1983). "Construction of a shuttle - vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 80:1058-1062.
- 62) Hsiao, C-L., Carbon, J. (1981). "Direct procedure for the isolation of - functional centromeric DNA." Genetics 78:3760-3764.
- 63) Szostak, J. W., and Wu, R. (1979). "Insertion aof a genetic marker into the ribosomal DNA of yeast". Plasmid. 2:536-554.
- 64) Krumlauf, R., and Marzluf, G. A. (1980). "Genome organization and charac - terization of the repetitive and inverted repeat DNA sequences in *Neurospora crassa*". J. Biol. Chem. 255:1138-1145.
- 65) Free, S. J., Rice, Ph, W., and Metzenberg, R. L. (1979). "Arrangement of the genes coding for ribosomal ribonucleic acids in *Neurospora crassa*". J. Bacteriol. 137:1219-1226.
- 66) Selker, E. U., Yanofsky, Ch., Driftmier, K., Metzenberg, R. L., De Weerd, B. A., and Raj Bhandary, U. L. (1981). "Dispersed 5S RNA genes in *N. crassa*. - Structure, expression and evolution". Cell. 24:819-828.
- 67) Davis, R. H., and De Serres, F. J. (1970). "Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*". Methods in Enzymology 17A:79-143.
- 68) Bolívar, F., Rodríguez, R., Betlach, M. C., and Boyer, H. W. (1977). - "Construction and characterization of new cloning vehicles. I.- Ampicillin - resisten derivatives of the plasmid pMB9". Gene. 2:75-93.
- 69) Bolívar, F., Rodríguez, R., Betlach, M. C., and Boyer, H. W. (1977). - "Construction and characterization of new vehicles. II.- A multipurpose doning system. Gene. 2:95-113.

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades



Papel de los Plásmidos Indígenas de
Rhizobium phaseoli en el proceso de Nodulación

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestría en Investigación Biomédica Básica
PRESENTA LA LICENCIADA

GLORIA SOBERON CHAVEZ

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco las sugerencias y críticas a este trabajo al Dr. Edmundo Calva, al Dr. Guillermo Dávila, a la Dra. Carmen Gómez, a la Dra. Alejandra Covarrubias, a la M. en C. Alicia González y a los licenciados Mario Rocha, David Romero e Irene Castaño.

Al Dr. Robert L. Metzenberg por la donación de el plásmido pTB051.

A la Dra. Mary E. Case por la donación de la cepa M246-89 601-2A , el plásmido pVK88 y por sus sugerencias para implementar el método de transformación en nuestro laboratorio.

A la Dra. Alejandra Covarrubias por la donación de la cepa MC1061 y algunos reactivos.

Al Dr. Edmundo Calva y al M. en C. Humberto de la Vega, por sus sugerencias metodológicas.

Agradezco también, la beca monetaria que recibí durante el desarrollo de este trabajo a través del Programa de Superación del Personal Académico de la U.N.A.M. y la beca hospedaje-alimentación del Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno, sin las cuales no me hubiera sido posible realizar este trabajo.

Indice

Introducción	1
Material y Métodos	9
Resultados y Discusión	14
Conclusiones	27
Tablas y Figuras	29
Referencias	52
Agradecimientos	56

Introducción

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso mediante el cual algunas bacterias convierten el nitrógeno molecular en amonio; dentro del ciclo del nitrógeno esta reacción es la limitante para el incremento de la biomasa del planeta. Existen algunos casos en los que las bacterias fijadoras de nitrógeno se asocian con otros organismos, entre estas asociaciones la mejor estudiada es la que se establece entre Rhizobium y algunas leguminosas.

El género Rhizobia incluye a las bacterias gram negativas, habitantes normales del suelo, que interaccionan con las raíces de las leguminosas para formar nódulos en los que se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Para que se forme un nódulo es necesario que exista un reconocimiento específico entre la bacteria y la planta, y que Rhizobium penetre por los pelos radiculares hasta la corteza de la raíz, donde pasa a través de la pared celular y queda englobado en vesículas membranosas dentro del citoplasma (1). En la formación de un nódulo existe una marcada proliferación de las células de la corteza radicular y un proceso de diferenciación de ambos participantes; el Rhizobium generalmente sufre cambios morfológicos, se hace más grande y de forma irregular, esta forma se conoce como bacteroide y es el estado en el que es fijado el nitrógeno atmosférico (1).

La enzima que cataliza la conversión de N_2 a NH_3 es la nitrogenasa, su estructura es muy conservada en todos los organismos fijadores de nitrógeno tanto a nivel de proteína (2) como al de la secuencia del DNA que la codifica (3), tiene dos componentes proteicos, uno que --

contiene hierro y molibdeno (P1) que es el que cataliza la reducción de nitrógeno a amonio, y el otro (P2) que une ATP Mg en su forma reducida y al transferir electrones a P1 lo hidroliza; por cada molécula de nitrógeno convertida a amonio se hidrolizan de 12 a 15 moléculas de ATP y se produce una molécula de H_2 a partir de $2H^+$ (4) (Figura 1). P1 esta formado por dos tipos de polipeptidos, una enzima tiene 2 moléculas de cada uno de ellos y P2 es dímero de otro polipéptido.

Se ha encontrado que la nitrogenasa se inactiva por O_2 y los distintos organismos fijadores de nitrógeno presentan diferentes formas de protegerse de este elemento; Rhizobium es un aeróbeo estricto por lo que requiere oxígeno aun cuando está fijando nitrógeno, la estrategia que presenta para evitar la destrucción de la actividad de la nitrogenasa es la presencia en el nódulo de una proteína-la leghemoglobina- que une con gran afinidad el O_2 , liberandolo a una concentración que permite la respiración y no daña la nitrogenasa (5). La leghemoglobina constituye un buen ejemplo del carácter simbiótico de la relación planta bacteria, ya que la parte protéica es codificada por la leguminosa y el grupo heme lo sintetiza el Rhizobium. (6,7).

El nódulo puede ser considerado como el organo especializado en la fijación de nitrógeno; la planta transporta a través del floema el fotosintato necesario para su mantenimiento y para la actividad de la nitrogenasa, y el nitrógeno fijado y asimilado en aminoácidos o ureidos es transportado hacia las estructuras superiores por el xilema (1) (Figura 2). Existen algunos nódulos que tienen una hidrogenasa de captura por lo que pueden recuperar parte de la energía gastada por la nitrogenasa en la formación de H_2 a partir de $2H^+$ (8).

Las especies de Rhizobium han sido definidas -- según la especificidad que presentan para nodular cierta leguminosa, así la bacteria que nodula chicharo, lenteja o garbanzo se define como Rhizobium leguminosarum, la -- que nodula alfalfa R. meliloti, la que nodula frijol R. phaseoli, etc. Hay evidencia de que dentro de lo que se denomina una especie existe gran variabilidad, tanto a nivel de patrones de proteínas como es el caso de R. phaseoli. (9) como a nivel de secuencia de DNA como en R. japonicum (10); esto sugiere que la información responsable del desarrollo del nódulo y de la fijación de nitrógeno es una pequeña parte de la información total de Rhizobium y que puede estar asociada a una diversidad de información para otros procesos celulares.

No existe evidencia suficiente con respecto a la conservación de la información responsable de la especificidad de Rhizobium y del desarrollo del nódulo, pero -- es una idea aceptada que las bacterias pertenecientes a una especie presentan la misma información para estos -- procesos. En el caso de R. phaseoli, se sabe que la secuencia de DNA que codifica para la nitrogenasa (nif) está reiterada y tiene un arreglo característico, diferente -- de la que presentan Rhizobia que nodulan otras leguminosas (11). La correlación que existe entre la estructura de esta información y la especificidad para la nodulación no ha sido explicada aún, pero ya que este arreglo solo se ha encontrado en Rhizobium phaseoli es posible -- que tenga algún papel en el establecimiento de la simbiosis con el frijol; otra posibilidad sería que los genes nif estuvieran ligados genéticamente con la información responsable de la formación de los nódulos y en Rhizobium phaseoli se coseleccionara el arreglo mencionado al establecerse la simbiosis.

En varias especies de Rhizobium se ha demostrado que existe información para la nodulación codificada en plásmidos de alto peso molecular; la evidencia para esto es de tres tipos. La primera es la demostración de que la especificidad y la capacidad de nodular puede -- transferirse por conjugación entre especies de Rhizobium (12 - 15) y a Agrobacterium tumefaciens (13), este tipo de experimentos se han realizado usando como donadoras - cepas de R. leguminosarum (12), R. trifolii (13, 14) y R. phaseoli (15). El segundo tipo de experimentos consiste en correlacionar la pérdida de un plásmido con la pérdida de la capacidad de nodular, el caso más claro lo -- constituye el de la curación por calor de 12 cepas de R. trifolii de 18 tratadas (16), esta pérdida se correlacionó con la pérdida total o parcial de un plásmido.

La tercera estrategia es el aislamiento de mutantes deficientes en el proceso de nodulación y su localización en plásmidos, esto se ha realizado con algunas cepas de R. leguminosarum (17) y R. phaseoli (14).

La presencia de los genes que codifican para -- la nitrogenasa (nif) en Plásmidos ha sido demostrada - en varias especies de Rhizobium por métodos de hibridización de DNA (18-22), y en algunos de estos casos se encontró que el plásmido que hibridiza con los genes nif - contiene información para nodular. A partir de esta evidencia se desarrolló el concepto de plásmido "Simbiótico" (Sym), se considera que un plásmido "Sym" contiene toda la información necesaria para que se establezca la simbiosis y se lleve a cabo la fijación de nitrógeno; de -- este modo el que una bacteria perteneciera a una especie de Rhizobium estaría determinado por que presentara - un plásmido " Sym " característico de esa especie. La -

igualdad de estos plásmidos se postula sólo en lo correspondiente a las características de la simbiosis, ya que distintos plásmidos "Sym" de una misma especie pueden - presentar diferente peso molecular y estar asociados a información diversas (23, 24).

La investigación de la genética de la nodulación de Rhizobium está enfocada a la identificación de los genes involucrados en este proceso estudiando una - cepa de una especie dada, y basandose en el concepto de plásmido "Sym" se extrapolan los resultados a toda la - especie; sin embargo no existe ninguna evidencia de que distintas cepas de una misma especie tengan la misma in - formación estructurada y regulada de igual manera.

Como no se conoce cual es la señal para el re - conocimiento entre la planta y la bacteria, y qué se re - quiere que haga el Rhizobium para que se forme el nódulo, es posible postular que si no es un mecanismo muy - especializado, se hayan seleccionando más de una manera de llegar a formar nódulos con cierta leguminosa por lo que habría cepas con el mismo fenotipo simbiótico y dis - tinta información para ello.

Se sabe que otro tipo de plásmidos, por ejem - plo los que confieren resistencia antibióticos, presen - tan todo tipo de arreglos estructurales (25-28) y que - aun codificando para el mismo fenotipo (resistencia a - tetraciclina, por ejemplo) no se regulan de la misma ma - nera y son secuencias de DNA sin homología estructural (29). Ya que la información simbiótica está codificada en plásmidos es posible que presente un comportamiento similar y que existan diferencias estructurales en plás - midos presentes en cepas de Rhizobium de una misma - - -

especie.

Existen algunas evidencias de que los plásmidos "Sym" de *Rhizobium* sufren rearrreglos estructurales (G. Soberón datos no publicados), Sin embargo no se sabe el mecanismo por el que se generan.

No existen datos en la literatura que sugieran que la información que participa en el establecimiento de la simbiosis de *Rhizobium* con una leguminosa en específico, en este caso el frijol, sea la misma y está estructurado de igual manera en distintas cepas. Como se mencionó antes, dado el carácter plasmidiano de esta información es posible que existan diferencias en este sentido, por ello en este trabajo se trató de identificar diferencias en la estructura de la información que participa en el establecimiento de la simbiosis en varias cepas capaces de nodular (Nod^+) y fijar nitrógeno (Fix^+) en asociación con el frijol.

La estrategia que se siguió se esquematiza en la Fig. 3.

Se utilizaron siete cepas, cuatro de ellas recolectadas en el mismo lugar (Celaya Gto. México) y el resto originarias de distintos países, y fueron sometidas a un proceso de curación de plásmidos; se seleccionaron algunos derivados que hubieran perdido la capacidad de nodulación (Nod^-) y las cepas así seleccionadas se analizaron para correlacionar la pérdida del fenotipo Nod^+ con la desaparición de un plásmido y de los genes estructurales de la nitrogenasa (*nif*). Los distintos tipos de cepas curadas obtenidas por este tratamiento podrían dar información de la similitud entre los

plásmidos que intervienen en el establecimiento de la simbiosis en las distintas cepas; se comparó la frecuencia con que cada cepa pierde la capacidad de nodular, y si esto era causada por la perdida total o deleciones de un plásmido.

Algunas de las cepas curadas se utilizaron como receptoras en la transferencia del plásmido que por curación había sido identificado como que llevaba información para la formación de nódulos. La manera como se llevo a cabo esto fue aislando inserciones de Tn5 que codifica para la resistencia a Kanamicina en la cepa original (Nod⁺) y seleccionando una colonia que transfiriera esta resistencia a una cepa curada (Nod⁻) proveniente del mismo aislamiento original; con este procedimiento se esperaba detectar las bacterias que tenian el Tn5 en el plásmido que se perdió al curar.

Las cepas que transferían Tn5 a las curadas y las transconjugantes de las cruzas fueron probadas en plantas para demostrar que la inserción del transposón no prevenía la nodulación y que con la transferencia del plásmido se reponía la capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno.

Los plásmidos marcados con Tn5 que transferian la capacidad de nodular a un derivado Nod⁻ de la misma cepa original fueron transferidos a cepas curadas provenientes de otras bacterias para determinar si esta molécula complementaba la información que había sido perdida. Con esto se buscaba determinar si la curación en varias cepas producía la perdida de información equivalente en todas ellas.

Si el concepto de plásmido "Sym" se cumpliera en las cepas de Rhizobium phaseoli estudiadas, se esperaba que al seleccionar Nod⁻ todas perdieran un plásmido, y en el mismo evento se eliminaran los genes estructurales de la nitrogenasa, así mismo se espera que al transferir de cualquier cepa el presunto plásmido "Sym" a derivadas de otros aislamientos originales estas recuperan la capacidad de nodular y fijar nitrógeno.

Como se discutirá más adelante la estrategia utilizada permitió detectar eventos que producen la -- pérdida de la capacidad de nodular y que no son producto de la curación del plásmido "Sym". La existencia de estos fenómenos en las cepas de Rhizobium phaseoli estudiados sugiere que el arreglo y la regulación de la información que participa en la simbiosis es más compleja que lo que se postula en el modelo del plásmido simbiótico.

Material y Métodos

a) Cepas Bacterianas y Plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en este trabajo se muestran en la Tabla I, y Tabla II

b) Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

El medio de cultivo utilizado en este trabajo es PY (peptona de caseína Bioxón 5%, extracto de levadura Bioxón 3% CaCl_2 7 mM). Se uso agar Bioxón al 1.5% para solidificar los medios. La concentración de antibióticos usada es Kanamicina 60 $\mu\text{g/ml}$, estreptomycin 200 $\mu\text{g/ml}$. y rifampicina 25 $\mu\text{g/ml}$. Para determinar la producción de pigmento se adicionó al medio PY sólido CuSO_4 20 $\mu\text{g/ml}$ y tirosina 100 $\mu\text{g/ml}$.

El medio utilizado para la curación de cepas es YM (K_2HPO_4 . 05%, KH_2PO_4 . 05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 02% , - NaCl . .01%, CaCl_2 .004%, extracto de levadura Bioxón .1%, manitol 1%, agar 1.5%).

La temperatura de crecimiento fue 30°C, los cultivos en líquido se agitaron 24hrs. a 200 r.p.m. , y las cajas se incubaron por 3 días para obtener colonias aisladas.

Las cruas bacterianas se hicieron en PY sólido por 16 hrs. y despues se platearon en el medio selectivo.

Para determinar la producción de pigmento se creció un inóculo denso de bacterias en PY sólido - -

con CuSO_4 y tirosina y se dejó la caja a temperatura ambiente por dos semanas aproximadamente.

c) Curación por calor.

Se estirió un inóculo denso de la cepa a curar (se utilizaron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina) en medio YM y se incubó a 37°C de 5 a 7 días, posteriormente se puso la misma caja a 30°C por tres días y se picaron las colonias en PY sólido con rifampicina. Cada colonia resistente a rifampicina fue probada para nodulación en frijol.

d) Mutagénesis con Tn5 y selección de plásmidos con el transposón.

Una mutante espontánea resistente a estreptomina se cruzó por la cepa de E. coli 1830 (30) que lleva el plásmido pJB4JI, este plásmido es inestable en Rhizobium y lleva el Tn5 . Al seleccionar las cepas Sm^R Kan^R producto de la cruce se seleccionaron aquellos Rhizobia en los que se insertó el transposón.

Se purificaron las colonias Sm^R Kan^R producto de la cruce y se hicieron parches en medio PY sólido, a cada uno se le adicionó $2\mu\text{l}$ de la bacteria receptora (Rif^R) y se incubaron por 12 o 16 hrs. a 30°C , se replicaron en medio selectivo (PY Rif Kan) y se seleccionaron las colonias que después de 3 días producían un crecimiento en el medio selectivo. Las presuntas transconjugantes se probaron para sensibilidad a estreptomina y para nodulación en frijol.

e) Selección de la cepa GS230.

La cepa GS2356 (CFN23 Sm^R con el Tn5 insertado en un plásmido) fue sometida a curación por calor ,

el crecimiento obtenido después de la incubación a 37°C se diluyó en PY líquido y se dejó crecer hasta la saturación, este cultivo se diluyó en PY líquido hasta una absorbancia de 20 unidades Klett y se puso en agitación por 2 hrs., se adicionó ampicilina 1mg/ml, cicloserina 1 mg/ml y Kanamicina 4 µg/ml. y se puso en agitación 6 hrs., después de este tiempo el cultivo no había aumentado en densidad. Las bacterias se filtraron por un filtro de millipore 22µm en condiciones estériles y se pusieron en PY sólido a 30°C por dos días, se resuspendió el crecimiento y se plateo en PY sólido con estreptomomicina para obtener colonias aisladas, de estas se seleccionó aquella Sm^r que hubiera perdido la resistencia a Kanamicina (1 de 384 probadas).

f) Visualización de plásmidos de Rhizobium

Para conocer el patrón electroforético de los plásmidos de las cepas de Rhizobium estudiadas se utilizó el método reportado por Eckhardt (31) o el reportado por Hirsch et al (32).

g) Purificación de DNA total de Rhizobium

Se cosecharon 5ml de un cultivo en la etapa estacionaria y se resuspendieron en 400µl de amortiguador Tris-HCl 50mM y EDTA 20mM pH 7.4, se adicionó 50µl de SDS 10% y 50µl de Pronasa 5mg/ml en el mismo amortiguador. Se lisaron las células incubando 1hr a 37°C y se pasó el lisado dos o tres veces por una aguja de jeringa de 1ml. Se extrajo dos veces con fenol saturado con el mismo amortiguador y dos veces con cloroformo, se precipitó los nucleicos con dos volúmenes de etanol absoluto frío y NaCl 0.25 M.

h) Condiciones de Hibridización.

Las condiciones para la digestión del DNA total, la transferencia de geles a filtros de nitrocelulosa, el marcaje del DNA con ^{32}P y la hibridización se hicieron según lo reportado por Quinto et al (11). Para los experimentos de hibridización con DNA digerido se usó la enzima EcoRI y se utilizó como detector el plásmido pCQ15 que contiene 4.5 Kb de la cepa CFN 42 que tiene homología con los genes nif de Klebsiella pneumoniae (11). En los experimentos de hibridización con -- plásmidos indígenas de Rhizobium se utilizó como detector un plásmido derivado del pBR328 con un inserto de 9Kb de la cepa CFN42 que incluye el fragmento de 4.5Kb del pCQ15. (B9) (Figura 4).

En los experimentos de hibridización con Tn5 se usó como detector el pBR322 con este transposón inserto.

i) Prueba de nodulación y Fijación de Nitrógeno

Las semillas de frijol o chícharo se esterilizaron superficialmente con blanqueador comercial por 20 min y se lavaron tres veces con agua destilada este ril.

Los frijoles se pregerminaron tres días en la obscuridad sobre un papel filtro esteril y humedo; los chícharos se pusieron directamente en los matraces sin pregerminar.

La solución salina usada para el crecimiento de las plantas fue Fahreus (33) con agar Bioxón .8%.

Los frijoles pregerminados se crecieron en - botellas de 25ml y los chícharos en matraces Erlenmeyer

de 250 ml forrados de papel estrasa.

Con los frijoles la inoculación se realizó al ponerlos en las botellas, se usó .3ml de un cultivo -- denso de bacterias o el crecimiento de un parche. En el caso de los chícharos se uso .5ml de un cultivo denso para la inoculación y se realizó después de una semana de haber puesto las semillas en los matraces cuando - se sacó el tallo del matraz.

La actividad de la nitrogenasa se midió en - las raíces completas de una planta, se sellaron las - botellas de 25ml y se inyectó .5ml de acetileno, se - incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, la - producción de etileno se cuantificó utilizando un cro - matógrado de gases.

Resultados y Discusión

I) Curación de plásmidos

Para eliminar los plásmidos de R. phaseoli se utilizó un tratamiento por calor que se reportó curaba este tipo de moléculas en varias cepas de Rhizobium trifolii (16). El criterio para considerar que una cepa estaba curada fue que después del tratamiento perdiera la capacidad de nodular frijol.

La curación de la cepa CFN42 se hizo por el mismo procedimiento, pero se seleccionaron derivadas que, por hibridización en colonias, hubieran perdido los genes de la nitrogenasa; esta curación y selección fue realizada por Margarita Hernández. Los derivados nif⁻ se probaron para nodulación y se encontró que ya no eran capaces de producir estas estructuras en frijol.

a) Frecuencia de obtención de Nod⁻

La frecuencia con que se encontraron cepas incapaces de nodular a partir de los aislamientos estudiados se muestra en la Tabla 3.

Utilizando este criterio se pueden distinguir dos grupos de cepas, uno formado por la CFN1 y la CFN3 que parecen curarse a alta frecuencia, 45% y 37% respectivamente, y el otro en el que entrarían el resto de las bacterias estudiadas que dan una frecuencia menor de curación (10% a 2%). La cuantificación de la frecuencia de curación solo se realizó en un experimento por lo que los valores pueden variar, sin embargo -

la tendencia de curarse a alta frecuencia de las cepas CFN1 y CFN23 se detectó en otros experimentos.

b) Patrón Electroforético de los plásmidos de las Cepas Nod⁻.

Para identificar el plásmido que lleva la información para la nodulación se estudió el patrón electroforético de estas moléculas aisladas de varios derivados Nod⁻ de cada cepa. Todas las cepas curadas provenientes de un aislamiento original dieron el mismo resultado.

Las cepas curadas derivadas de la CFN1, CFN23 y 281 muestran el mismo patrón electroforético de plásmidos que en los aislamientos originales (Figura 5), mientras que en el resto de las cepas se detectó la pérdida de por lo menos un plásmido (Figura 6). Con estos resultados sólo se puede asociar la pérdida de la nodulación con la desaparición de un plásmido en el caso de las cepas CFN90, CFN42 y 8251.

Al curar la cepa CFN7 desaparecen dos bandas del patrón electroforético original, este resultado fue observado en dos derivados Nod⁻; no se sabe si es necesario que se pierdan ambas moléculas para que la cepa pierda la capacidad de nodular, o si este cambio en el fenotipo de la bacteria es producto de la eliminación de un plásmido y el otro se pierde a una frecuencia muy alta.

c) Presencia de los genes estructurales de la Nitrogenasa.

Las secuencias homólogas a los genes estructurales de la nitrogenasa de K. pneumoniae se encuentran reiterados en Rhizobium phaseoli y por lo menos

parte de estas reiteraciones se localizan en plásmidos (11).

Las cepas usadas en este trabajo se hibridizaron con un plásmido recombinante que lleva una secuencia de la cepa CFN42 homóloga a los genes estructurales de la nitrogenasa de K. pneumoniae (pCQ15) y los resultados se muestran en la Fig. 7 y Tabla 5. Por este criterio se pueden distinguir dos grupos, aquellas que al volver se Nod pierden las reiteraciones de las secuencias homólogas con los genes de la nitrogenasa (CFN1, CFN7, -- CFN23, CFN42 y CFN90), y las que las siguen conservando (8251 y 281). Al usar como detector en la hibridización otra clona derivada de la cepa CFN42 que lleva una copia de los genes nif y otras regiones contiguas (B9 Figura 4) sobre el patron de plásmidos se encontró que -- las cepas que conservaban las reiteraciones mantenían la hibridización con estas moléculas, mientras que entre los que perdían los genes nif las cepas CFN1 y CFN23 perdían la homología con un plásmido, pero la conservaban con otro. La hibridización con los plásmidos que no llevan los genes nif se puede ver desde las cepas originales por lo que no es un rearrreglo del genoma producto del proceso de curación (Figura 8). La clona usada para estos experimentos lleva secuencia del DNA de R. phaseoli no relacionadas con los genes de la nitrogenasa de K. pneumoniae y la hibridización con un segundo plásmido pudiera estar dada por ellas.

d) Producción de Pigmento.

Algunas cepas de R. phaseoli producen un pigmento, probablemente melanina, y esta característica -- se encuentra ligada en algunos casos al plásmidos que -- lleva información para la nodulación y los genes de la nitrogenasa (14). Se analizó la capacidad de producir --

pigmento de las cepas originales y de sus derivados Nod^- y los resultados se muestran en la Tabla 4. La cepa CFN 90 no es capaz de producir pigmento en las condiciones estudiadas, pero las otras seis cepas si lo hacen, de estas la CFN1, CFN7, CFN23 y CFN42 dejan de formar pigmento al perder la capacidad de nodular, mientras que la 8251 y la 281 continúan produciéndolo aun cuando ya no forman nódulos.

Estos resultados muestran que la producción de pigmento está ligada a los genes nif, pero no siempre a la capacidad de nodular.

Tipos de cepas Nod^-

Según los cuatro criterios estudiados se pueden distinguir cinco grupos dentro de las siete cepas estudiadas. Ya que se seleccionó el fenotipo Nod^- , los resultados que se obtienen con cada cepa representan el evento más frecuente que produce este comportamiento, pero es posible que con menos frecuencia las distintas cepas presenten los mismos fenómenos.

El primer grupo lo constituyen las cepas CFN1 y CFN23 que generan Nod^- a alta frecuencia y dejan de producir pigmento al hacerlo, pero no cambian el patrón electroforético de sus plásmidos. Estas cepas pierden las secuencias homólogas con los genes nif, pero conservan homología con la clona (B9) de la cepa CFN42 usada como detector; las secuencias homólogas que mantienen se localizan en un plásmido distinto al que lleva los genes nif en la cepa original. (Fig. 7 y 8). La permanencia del patrón electroforético de los plásmidos de estas cepas puede ser explicado por que hayan perdido un plásmido que comigrara con otro o que se produjera una deleción de parte de un plásmido que no se viera en la electroforesis, la frecuencia con que se produce este evento pudiera favorecer la segunda posibilidad.

La pérdida de las tres reiteraciones de los genes nif representaría una deleción de aproximadamente 10Kb de DNA si estuvieran contiguas en el genoma , pero en la cepa CFN42 estas secuencias no están cercanas (R. Palacios comunicación personal); si el arreglo de estos genes en los plásmidos de las cepas CFN1 y CFN23 es el mismo que en las cepas CFN42 una deleción que abarca las tres reiteraciones permitiría distinguir un plásmido de menor peso molecular en la electroforesis y se tendría que postular otro tipo de rearrreglo en el genoma como una sustitución de DNA para explicar los resultados obtenidos.

La cepa CFN42 y CFN90 tienen un comportamiento similar ya que se curan a una frecuencia baja, pierden un plásmido y los genes estructurales de la nitrogenasa; en la CFN42 esta pérdida se correlaciona con la incapacidad de producir pigmento. El comportamiento de estas cepas sería el esperado para una bacteria que tuviera un plásmido "Sym" que se curara por calor.

La cepa CFN7 se cura a baja frecuencia, deja de producir pigmento y pierde los genes nif, pero al hacer esto se eliminan dos plásmidos. Aunque los genes de la nitrogenasa sólo hibridizan con un plásmido (Figura 8) los genes que participan en la nodulación pudieran estar reiterados en las dos moléculas y por esto se requería que se perdieran ambos para generar una cepa incapaz de nodular, otra explicación sería que un solo plásmido llevara información para la simbiosis, pero el otro se curara muy frecuentemente.

Los derivados Nod⁻ de la cepa 281 no presentan ningún cambio en las características analizadas

por lo que parece que este fenotipo no es producido por un rearreglo muy extenso de sus plásmidos, y no se sabe si este fenómeno está relacionado con el tratamiento por calor.

La cepa 8251 pierde un plásmido al perder su capacidad de nodular frijol, pero conserva los genes estructurales de la nitrogenasa y su capacidad de producir pigmento; este comportamiento muestra que por lo menos en esta cepa la información que participa en el establecimiento de la simbiosis no está codificada en un solo plásmido.

II Marcaje de Plásmidos con Tn5

Se aislaron inserciones del transposón Tn5 en las cepas CFN23 Sm^R, CFN42 Sm^R y 8251 Sm^R, y se seleccionaron las colonias que transferían esta resistencia a las cepas 23-7, C3 y 8251-9 respectivamente. Se probó la nodulación en frijol de las cepas que donaban la resistencia a Kanamicina y las transconjugantes y se eligieron aquellas que eran capaces de interaccionar con la planta.

La cepa GS522 es un derivado Kan^R de la cepa 8251 que le transfiere a la cepa 8251-9 la capacidad de nodular frijol y fijar nitrógeno, la frecuencia de esta conjugación es de 3×10^{-3} y se correlaciona con la adquisición de un plásmido (pGS1) por la cepa 8251-9 (Figura 9).

La capacidad de nodular frijol es transferida a la cepa C3 por la GS 425, la transferencia de la resistencia a Kanamicina entre estas cepas se realiza a una frecuencia de 1.5×10^{-2} , sin embargo la capacidad de

nodular frijol no se hereda siempre que se adquiere la resistencia al antibiótico. Este resultado se explica -- porque el Tn₅ esta insertado en un plásmido (pGS2) que no transfiere la capacidad de nodular, los genes nif ni la producción de pigmento, y sólo cuando se cotransfiere otro plásmido presente en la GS425 se heredan estas características (Figura 10).

La cepa CE108 (Nod⁺ Fix⁻) tiene un Tn₅ inserto en el plásmido de la cepa CFN42 que contiene los genes nif. La resistencia a Kanamicina se transfiere de esta cepa a la C3 a una frecuencia de 1×10^{-5} , y todas las transconjugantes son capaces de nodular, pero no fijan nitrógeno. Este resultado corrobora que el plásmido que lleva los genes nif tienen información para la formación de nódulos, por lo que cumple con las características de lo que se considera un plásmido "Sym".

La cepa GS2356 transfiere la resistencia a Kanamicina a la 23-7 a una frecuencia de 2×10^{-5} , pero solo una transconjugante de diez probadas es capaz de nodular frijol. Para determinar si este resultado se podía explicar por cotransferencia de otro plásmido como en el caso de la cepa GS425, se hibridizó el perfil de plásmidos de la cepa GS2356 con el Tn₅ y con los genes nif (Fig. 11), la hibridización del transposón se realiza con el plásmido de menor peso molecular (pGS3) que no contiene los genes nif, pero si regiones que se encuentran cercanas a estos genes en la cepa CFN42. Al analizar la hibridización de los genes nif con los plásmidos de una transconjugante capaz de nodular (GS2456), se encontró que hibridizan con un plásmido del tamaño del pGS3, este nuevo -- plásmido se denominó pGS4; la cepa GS2456 recupera las tres reiteraciones de los genes nif (datos no mostrados). El patrón electroforético de la cepa GS2456 es idéntico

a una transconjugante que no hereda la capacidad de nodular (GS2457) (Fig. 11). Estos resultados no son compatibles con la cotransferencia de un plásmido sino que parecen indicar que los genes nif y la información que al perderse en la cepa 23-7 la hace incapaz de nodular recombinan y se transfieren con el pGS3, constituyendo un nuevo plásmido denominado pGS4.

Si se aísla la cepa GS2456 de nódulos y se subcultiva tiende a perder la capacidad de nodular, al analizar el patrón electroforético de una de estas cepas -- Nod⁻ (GS2455) se identificó un plásmido de menor peso molecular que el pGS4, (Figura 12) este nuevo plásmido hibridiza con Tn₅, pero no con nif. (datos no mostrados).

A partir de la cepa GS2356 se aisló por curación con calor una cepa (GS230) que es sensible a Kanamicina, esta cepa pierde el pGS3, es Nod⁻ y no tiene ninguna homología con la clona nif de la cepa CFN42 usado como detector (Figura 13). Si se usa la GS230 como receptora de una cruce con la GS2356 se transfiere la resistencia a Kanamicina con una frecuencia de 5×10^{-2} . Una fracción de las transconjugantes de esta cruce son capaces de nodular frijol, tienen el mismo patrón electroforético que la cepa GS2456 e hibridizan con los genes nif en el mismo plásmido que ella (pGS4). Esto muestra que no se requiere la presencia del pGS3 en la cepa receptora para heredar la capacidad de nodular frijol, es probable que el pGS4 se genere por recombinación en la cepa GS2356 entre el pGS3 y el plásmido que contiene nif.

Una parte de las cepas derivadas de la 23-7 y GS230 que heredan el pGS42 y se purifican de un nódulo, recuperan la homología con los genes nif en el plásmido en que originalmente se encuentran en la cepa GS2356 --

(Fig. 13), este resultado es distinto al encontrado con la cepa GS2456 y no se determinó la estabilidad de las características simbióticas en este tipo de transconjugantes. La capacidad de fijar nitrógeno en los nódulos pudiera ser sólo expresada por uno de los dos tipos de transconjugantes ya que esta actividad se mide en plantas completas y puede haber solo una fracción de los nódulos que la presenten.

Existe la posibilidad de que las transconjugantes que recuperan los genes nif en el plásmido en el que se encuentran normalmente en la cepa GS2356 se generen por cotransferencia de esta molécula y el pGS3, sin que haya una recombinación entre el pGS4 y el plásmido residente. Esto parece poco probable si se considera que cuando se hizo el marcaje de los plásmidos de la cepa CFN23 con el Tn5 no se detectó ninguna colonia con el transposón en el plásmido que contiene los genes nif, lo que sugiere que esta molécula se transfiere a muy baja frecuencia a la cepa 23-7. Para descartar esta posibilidad es necesario transferir el pGS4 a las cepas 23-7 y GS230 de una donadora que no contenga ningún otro plásmido y demostrar que se recuperen transconjugantes con los genes nif en el plásmido en que naturalmente se encuentran en la cepa GS2356.

El hecho de recuperar los genes nif en el plásmido en el que originalmente se encuentran sugiere que la cepa 23-7 se generó por un rearrreglo de sus plásmidos que elimina ciertas secuencias, como los genes nif, y no por la pérdida de un plásmido que comigra con otro; la cepa 23-7 parece conservar el sitio en el que se integra por recombinación las secuencias que participan en la nodulación y fijación de nitrógeno.

La capacidad del pGS3 de transferir información

para la simbiosis que no forma parte normalmente de su estructura generando el pGS4 sugiere que funciona en la naturaleza como una especie de mensajero de este tipo de información, la alta frecuencia con que se transfiera (5×10^{-2}) favorecería este papel, sin embargo dada la inestabilidad que presenta una vez que adquirió la información para la simbiosis podría requerirse - - que en la cepa receptora se encontrara un plásmido con el que pudiera recombinar. Sería interesante determinar entre distintos aislamientos de Rhizobium phaseoli la generalidad de la existencia de plásmidos con la capacidad de movilizar información para la simbiosis y de plásmidos capaces de incorporar las secuencias transferidas. En la figura 14 se muestra un esquema de las cepas derivadas de la CFN23.

III Complementación de la capacidad de nodulación por transferencia de plásmidos entre cepas.

Las siete cepas Nod⁻ de R. phaseoli obtenidas por curación con calor y la cepa 6015 de R. leguminosarum se usaron como receptoras de los plásmidos pGS1, pGS2, pGS3, pGS4 y pJB5JI y se probó la capacidad de nodulación de las transconjugantes. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Al heredar el pGS1 sólo dos de la ocho cepas probadas recuperan la capacidad de nodular frijol. La cepa 8251-9 fue utilizada para marcar con Tn₅ este plásmido y es en la que se probó que transfería información para la nodulación, y la cepa 281-9 parece tener un defecto en el que no interviene gran parte de su genoma, además estas cepas son las únicas que conservaron los genes estructurales de la nitrogenasa al

perder la capacidad de nodular. Este patrón de complementación muestra que el pGS1 tiene información para la simbiosis, pero que no está completa y se requiere que la célula tenga además de este plásmido otro tipo de información que la mayoría de las cepas pierden al volverse Nod⁻. En la figura 16 se muestra el patrón electroforético de los plásmidos de algunas cepas que heredaron el pGS1.

La frecuencia de transferencia del pGS2 a las cepas curadas distintas a la C3 es muy baja (10^{-4} a 5×10^{-7}), y en ninguna de las tres cepas a las que se transfirió el plásmido que complementa la nodulación en la C3, esto sugiere que el pGS2 no lleva información para la simbiosis y que podría participar en este proceso a través de su capacidad de movilizar el plásmido "Sym" de la cepa CFN42. Se transfirió el plásmido "Sym" de la CFN42 a partir de la CE108 que es Nod⁺ y Fix⁻ a las cepas 23-7 y 6015, estas cepas recuperan la capacidad de nodular, pero no son capaces de fijar nitrógeno; la mutación que hace incapaz de fijar nitrógeno a la cepa CE 108 no puede ser complementada por la información presente en las cepas 23-7 y 6015, podría ser que en éstas cepas no exista la información afectada en la cepa CE108 o que esta mutación sea dominante.

El plásmido pGS4 puede conferir la capacidad de nodular frijol y fijar nitrógeno a cuatro de las siete cepas a las que se transfiere, y al complementar a las cepas curadas derivadas de otros aislamientos presenta un comportamiento similar a cuando se transfiere a la cepa 23-7; sólo una fracción de las transconjugantes que heredan el plásmido adquieren la capacidad de nodular frijol.

El caso de la cepa 7-20 con el plásmido pGS4 fue analizado con más detalle, ya que las transconjugantes que pueden nodular y fijar nitrógeno sólo presentan este plásmido, y se podría pensar que éste sería el modelo en el que se encuentra la mínima información capaz de producir una interacción exitosa entre Rhizobium y una leguminosa.

En la figura 16 se muestra el patrón electroforético de los plásmidos de dos derivados de la cepa 7-20 con el pGS4 y pGS3; uno es capaz de nodular y el otro no puede hacerlo, pero ambos tienen un plásmido del mismo tamaño. Si la cepa Nod⁺ se subcultiva en ausencia del frijol se obtienen derivados Nod⁻ que presentan un plásmido de menor peso molecular que el pGS4 (Figura 16), este nuevo plásmido pierde la homología con los genes nif, este resultado sugiere que por lo menos parte de la información para la simbiosis se pierde por recombinación en el pGS4. El hecho de que la cepa 7-20/pGS4 sea capaz de nodular y fijar nitrógeno en los nódulos demuestra que los genes nif son funcionales dentro de este plásmido y no requiere que recombinen con otro como en el caso de algunos derivados de la 23-7 ó GS230.

Las cepas 1-19 y 6015 no son capaces de nodular al heredar el pGS4; ya que esta molécula complementa la función en una cepa sin plásmidos (7-20), la incapacidad de nodular de estas cepas se puede explicar si la información que tiene el pGS4 no se expresa en estas cepas, si en el cromosoma de la 7-20 existe información que participa en la simbiosis que en la 1-19 y 6015 esta ausente, o si este plásmido es tan inestable en estas cepas que no se puede recuperar transconjugantes Nod⁺.

El pJB5JI es un típico plásmido "Sym" de R. leguminosarum por lo que resulta interesante determinar

si las cepas curadas de R. phaseoli pueden nodular chícharo cuando lo heredan. Las cepas 1-19, 23-1, 281-9 y 8251-9 no son capaces de interactuar con el chícharo al heredar este plásmido; al analizar el patrón electroforético de los plásmidos de las transconjugantes se encontró que la cepa 8251-9 / pJB5JI mostraban un patrón distinto al esperado (Figura 17).

La cepa 7-20/pJB5JI es capaz de nodular chícharo por lo que se aplican los mismos argumentos que en el caso de el pGS4 para explicar la falta de complementación de otras cepas.

Al analizar los patrones de complementación de la nodulación con los plásmidos usados en este trabajo no es posible establecer grupos de cepas, pero los resultados parecen indicar que para que las distintas cepas expresen un fenotipo Nod^+ Fix^+ intervienen varios factores.

Conclusiones

El objetivo original de este proyecto era determinar si existían diferencias en el arreglo de la información que participa en la simbiosis con el frijol de -- distintos aislamientos de R. phaseoli. Los resultados obtenidos muestran que analizando un reducido número de cepas es posible encontrar una gran variedad de respuestas tanto a la curación de plásmidos como a su transferencia. Esta variabilidad podría deberse a que las cepas presentan un arreglo diferente de la información que participa en la simbiosis, pero también es posible que las diferencias encontradas se deban a que las cepas tengan una diferente estrategia para manejar plásmidos. Algunos factores que podrían afectar el comportamiento de los plásmidos en distintas cepas son: la respuesta celular al calor, la eficiencia de recombinación y la capacidad de expresar la información codificada en plásmidos.

Para descartar las posibilidades mencionadas es necesario hacer un estudio genético fino utilizando una sola cepa como patrón. Una posibilidad que se desprende de este trabajo es la de realizar un estudio genético de la cepa 7-20/pGS4, se podría aislar mutantes en el plásmido y tratar de complementarlas con fragmentos del DNA de otras cepas y de esta manera llegar a determinar si la información para la simbiosis es la misma en las distintas cepas.

Así mismo se podría aislar una mutante de la cepa 7-20 con una menor eficiencia de recombinación entre secuencias homologas y determinar si la estabilidad del pGS4 depende de este proceso.

Dentro de las cepas estudiadas sólo dos presentan el comportamiento que predice el modelo del plásmido "Sym", la CFN90 y CFN42, esto no excluye que en las cinco cepas restantes exista un plásmido con un comportamiento similar, sin embargo, como se estudia el evento más frecuente que produce la pérdida de la capacidad de nodular, no se detectó plásmidos con estas características.

La posibilidad de generar cepas Nod^- por vías distintas a la postulada como general para Rhizobium, la curación del plásmido "Sym", se pudo demostrar por lo menos con dos cepas, la 8251 y la CFN23. La cepa 8251 al perder un plásmido que no lleva los genes nif ya no es capaz de nodular, la transferencia de este plásmido (pGSI) restaura el fenotipo $Nod^+ Fix^+$, pero no lo hace si se transfiere a una cepa que perdió el plásmido "Sym" (la C3 por ejemplo). La cepa CFN 23 presenta un comportamiento más complejo tanto para la pérdida de la capacidad de nodulación como para su transferencia por conjugación, en ambos procesos parecen ocurrir rearrreglos entre los plásmidos presentes en esta cepa.

Como ya se mencionó la gran variabilidad encontrada entre los siete aislamientos de R. phaseoli estudiados puede tener varias explicaciones, pero sin importar cual sea correcta, este hecho muestra que no es válido hacer generalizaciones de los resultados obtenidos con una cepa de Rhizobium a toda la especie, y que es necesario considerar en el estudio de la información que participa en la simbiosis que por lo menos una fracción considerable de ella se encuentra codificada en plásmidos por lo su comportamiento puede ser muy distinto al de los genes cromosomales.

Tablas y Figuras

Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa <u>R. phaseoli</u>	Fenotipo Simbiótico	Características	Origen
CFN1*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de campo	Guanajuato, México
1 - 19	Nod ⁻	Derivados CFN1, Rif ^R .	Este trabajo
CFN7*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de campo, Sm ^R .	Guanajuato, México
7 - 20	Nod ⁻	Derivada de CFN7, Rif ^R Sm ^R .	Este trabajo
CFN23*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de campo	Guanajuato, México
23 - 7	Nod ⁻	Derivado CFN23, Rif ^R	Este trabajo
GS2356	Nod ⁺ Fix ⁺	Derivada de CFN23, Sm ^R Kan ^R	Este trabajo
GS2456	Nod ⁺ Fix ⁺	23-7/pGS4, Rif ^R Kan ^R	Este trabajo
GS2457	Nod ⁻	23-7/pGS3, Rif ^R Kan ^R	Este trabajo
GS2455	Nod ⁻	Derivado de GS2456, Rif ^R Kan ^R	Este trabajo
GS230	Nod ⁻	Derivado de GS2356, sin el pGS3, Sm ^R Kan ^R .	Este trabajo
CFN42*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de campo	Guanajuato, México
C3	Nod ⁻	Derivada de CFN42, Rif ^R	Aislamiento Margarita Hernández
GS425	Nod ⁺ Fix ⁺	Derivada de CFN42, Sm ^R Kan ^R .	Este trabajo
GS525	Nod ⁺ Fix ⁺	C3/pGS2, Rif ^R Kan ^R	Este trabajo
GS526	Nod ⁻	C3/pGS2, Rif ^R Kan ^R	Este trabajo
CE 108	Nod ⁺ Fix ⁻	Derivada CFN42 Sm ^R Kan ^R	Aislamiento Dale Noel
CFN90*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de campo	Nitragin 127K44.
90 - 37	Nod ⁻	Derivada CFN90, Rif ^R	Este trabajo
CIAT281*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de Campo	Brazil
281 - 9	Nod ⁻	Derivada de 281, Rif ^R .	Este trabajo
8251*	Nod ⁺ Fix ⁺	Aislamiento de campo	Inglaterra
8251-9	Nod ⁻	Derivada de 8251, Rif ^R	Este trabajo
GS522	Nod ⁺ Fix ⁺	Derivada de 8251, Sm ^R Kan ^R	Este trabajo
GS622	Nod ⁺ Fix ⁺	8251-9/pGS1, Rif ^R Kan ^R	Este trabajo

Cepa

R. leguminosarum

T3	Nod ⁺ Fix ⁺	Ura ⁻ Trp ⁻ , Sm ^R ./pJB5JI	Colección del Instituto John Innes, Inglaterra
6015	Nod ⁻	Phe ⁻ Rif ^R Sm ^R .	Colección del Instituto John Innes, Inglaterra

* Se utilizaron mutantes espontáneos resistentes a 25 µg/ml rifampicina o a 200 µg/ml de estreptomicina, esto se especifica en cada experimento.

Tabla 2

Las características de los Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Cepa de Origen	Características
pJB4JI	<u>E.coli</u> 1830	Gen ^R , Tra ⁺ , Kan ^R , μ u inmune.
pJB5JI	<u>R. leguminosarum</u> 248	Nod ⁺ Fix ⁺ , Kan ^R , Tra ⁺ .
pGS1	<u>R. phaseoli</u> 8251	Kan ^R , Nod ⁺ , Tra ⁺ .
pGS2	<u>R. phaseoli</u> CFN42	Kan ^R , Tra ⁺ .
pGS3	<u>R. phaseoli</u> CFN23	Kan ^R , Tra ⁺
pGS4	<u>R. phaseoli</u> CFN23	Kan ^R , Tra ⁺ , Nod ⁺ , rif ⁺ .

Tabla 3

Frecuencia de la obtención de Cepas Nod⁻ por -
tratamiento con calor.

Cepa	# Colonias Probadas	% Nod ⁻
CFN1 Rif ^R	20	45
CFN23 Rif ^R	16	37
8251 Rif ^R	10	10
CFN90 Rif ^R	60	5
281 Rif ^R	40	5
CFN7 Rif ^R	60	3
CFN42*	200	2

* Se seleccionaron nif⁻ y después se probó que fueran Nod⁻

Table 4Producción de Pigmento.

Cepa original	Pigmento	Derivado Nod ⁻	Pigmento
CFN1 Rif ^R	+	1 - 19	-
CFN7 Rif ^R	+	7 - 20	-
CFN23 Rif ^R	+	23 - 7	-
CFN42 Rif ^R	+	C3	-
CFN90 Rif ^R	-	90 - 37	-
281 Rif ^R	+	281 - 9	+
8251 Rif ^R	+	8251 - 9	+

Tabla 5

Hibridización con los genes estructurales de la nitrogenasa.

Cepa	Perdida de Plásmido	Hibridización con <u>nif</u> *
1 - 19	-	-
7 - 20	+	-
23 - 7	-	-
C3	+	-
90 - 37	+	-
8251-9	+	+
281-9	-	+

* Las cepas que se consideran nif⁻ pierden todas las reiteraciones y las que se consideran nif⁺ las conservan todas.

Tabla 6Complementación de la capacidad de Nodulación.Cepas Nod⁻ usadas como receptoras.

Plásmido transferido	1-19	7-20	23-7	C3	90-37	281-9	8251-9	6015
pGS1	-	-	-	-	N.T.	+	+	-
pGS 2	-	N.T.	-	<u>+</u>	N.T.	N.T.	N.T.	-
pGS4	-	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	N.T.	<u>+</u>	N.T.	-
pJB5JI*	-	+	-	+	+	-	-	+

N.T. = No se transfiere.

+ = Sólo una parte de las transconjugantes se complementa

* = Las cepas que heredan este plásmido se probaron para nodulación en chícharo.

Figura 1: Mecanismo de Acción de la Nitrogenasa P1 (Componente 1) P2(Componete2) F (Donador de Electrones).

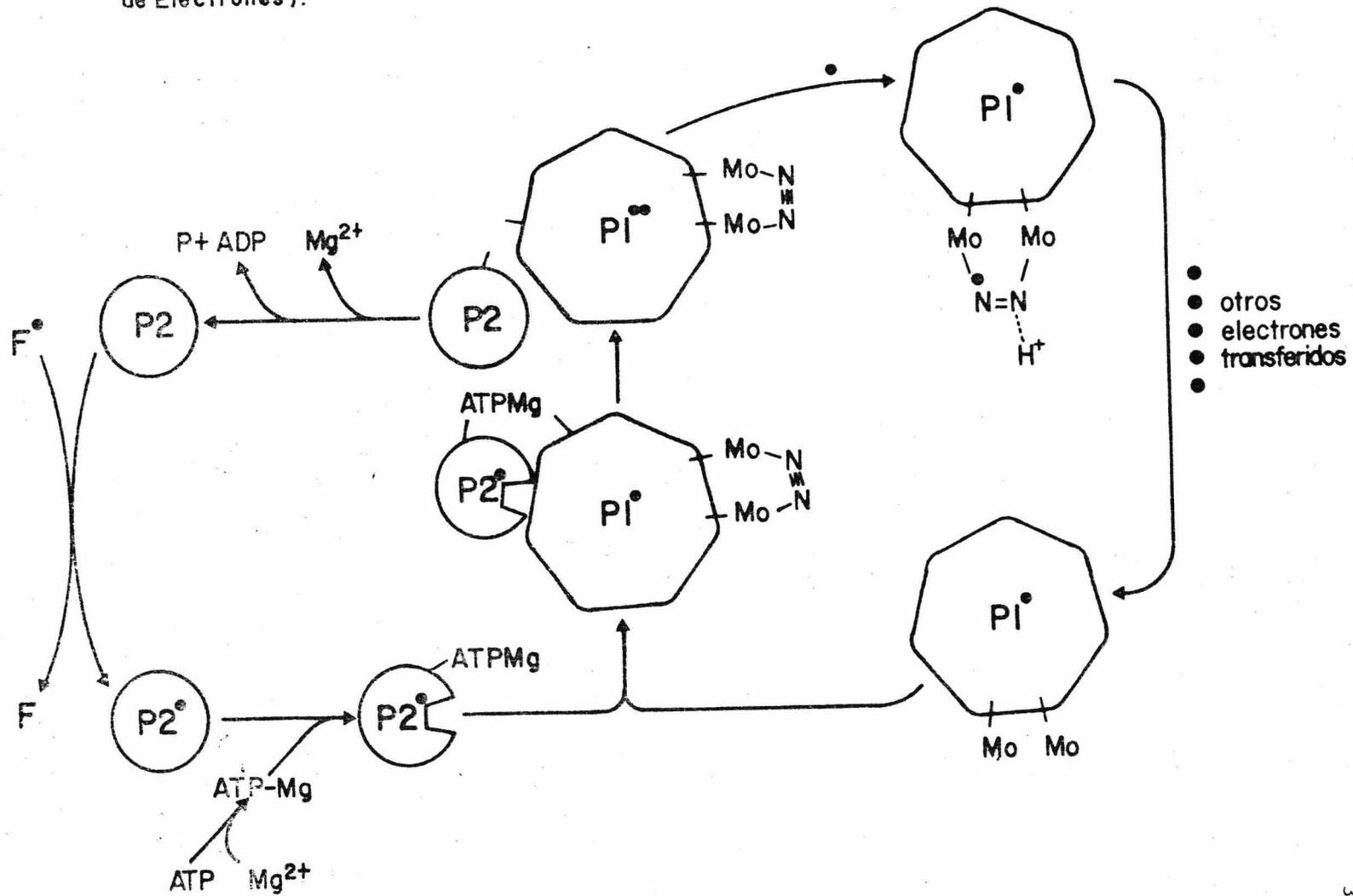


Figura 2. Esquema de un Nódulo

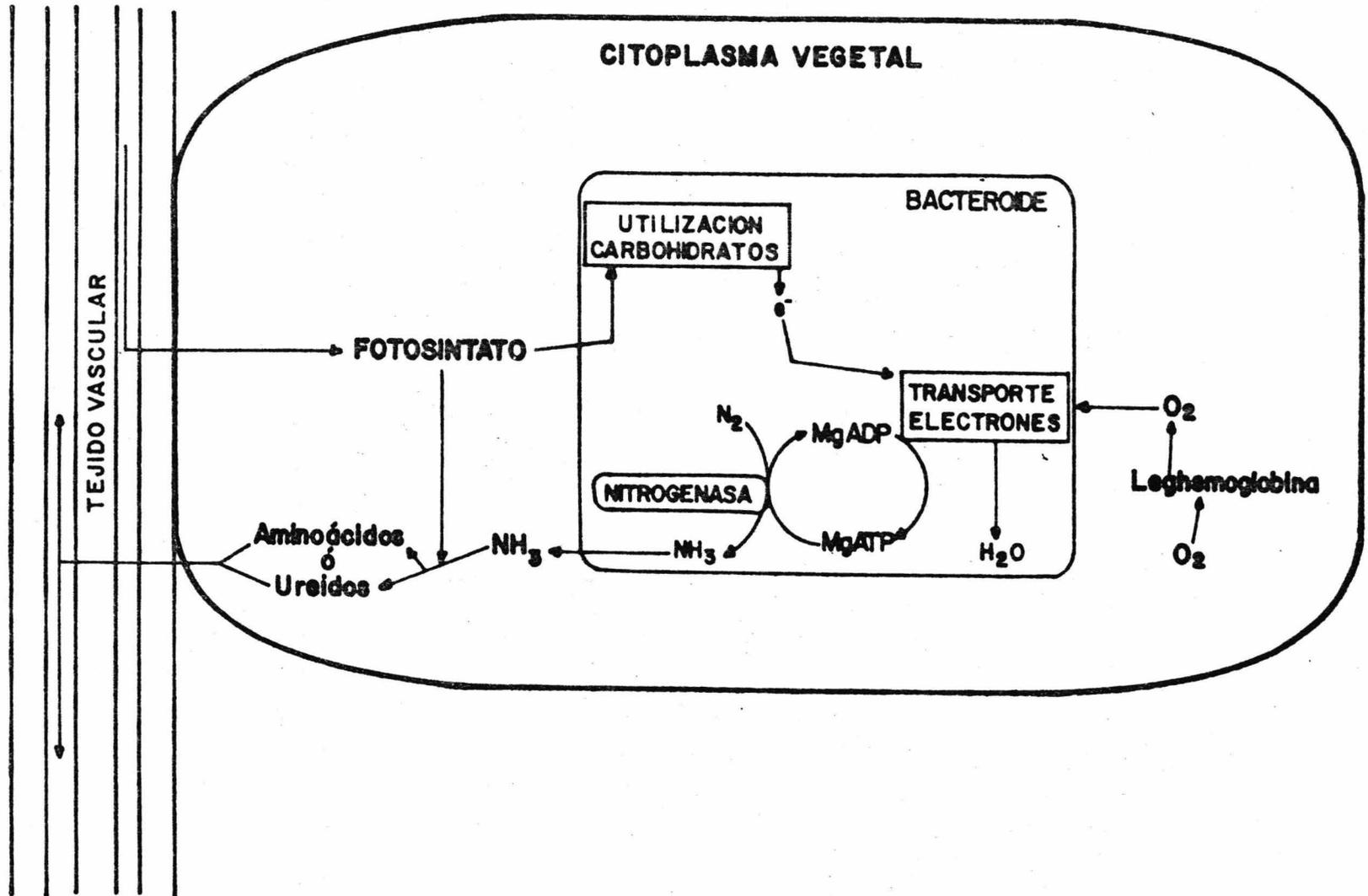


FIGURA 3

Estrategia para estudiar los plásmidos indigenas de siete cepas de Rhizobium phaseoli.

I Curación por calor de un derivado Rif^r de cada cepa y -
selección de Nod⁻.

Curadas Nod⁻ -¿pierden un plásmido?
-¿Sen nif⁺ ó nif⁻ ?
-¿Producen pigmento?

II Mutagénesis son Tn₅ de un derivado Sm^r de algunas cepas.

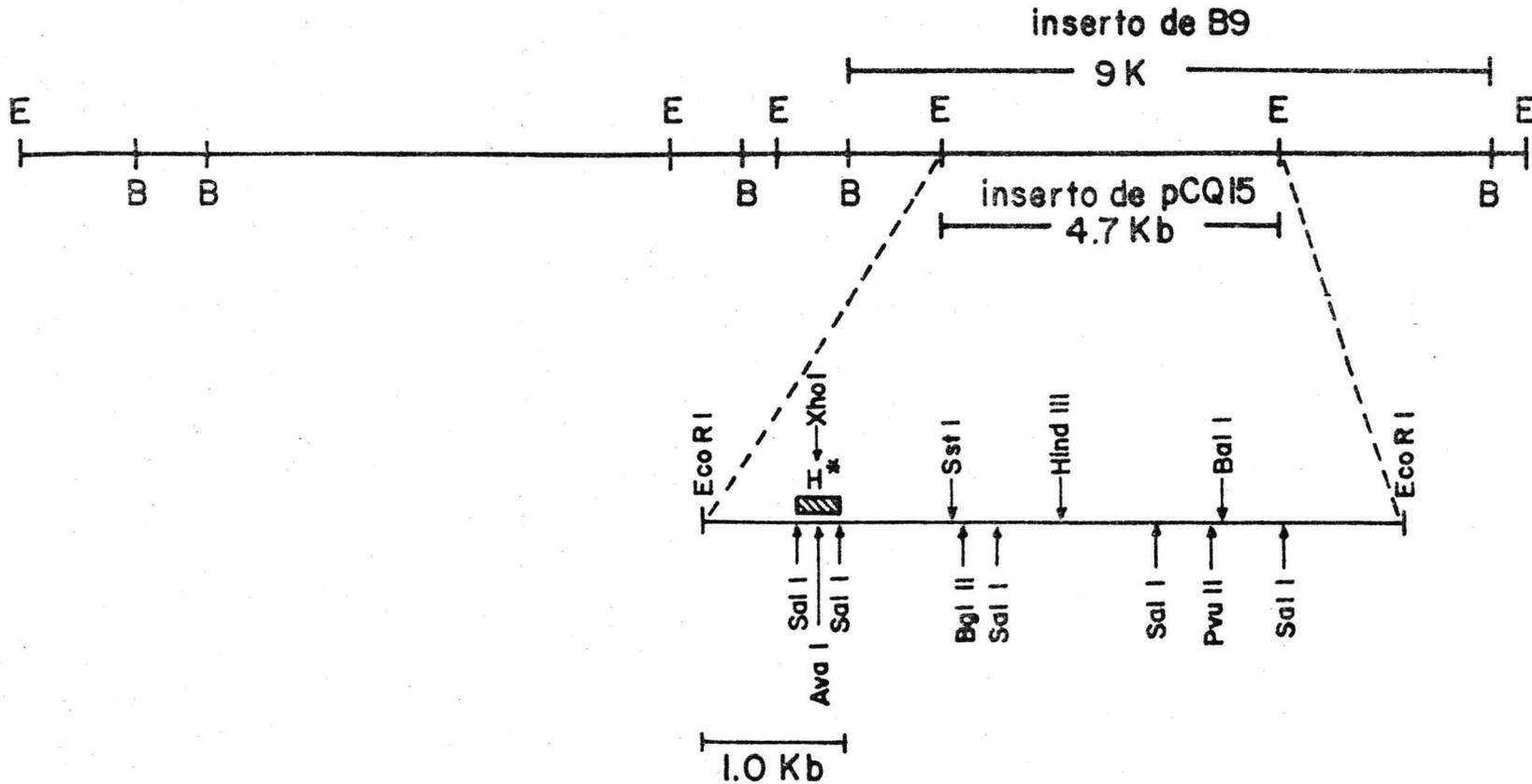
III Selección de cepas Sm^r Kan^r (por inserción de Tn₅) que
tranfieren la resistencia a Kanamicina al derivado Nod⁻
Rif^r de la misma cepa original.

IV Correlación de la transferencia de Kan^r con la recupera
ción de la capacidad de nodular frijol.

V Transferencia de la resistencia a Kanamicina a cepas Nod⁻
por curación, derivadas de otras cepas.

VI Determinación de la capacidad de nodulación y fijación
de nitrógeno de las transconjugantes entre cepas.

Figura 4. Mapa de Restricción del DNA de la cepa CFN 42 clonado en λ 1059 (Ø 1)



* Gene estructural de la Nitrogenase

E (sitio de Eco RI)

B (sitio de Bam)

Figura 5 - Cepas Nod - que no cambian de patrón electroforético de sus plásmidos.

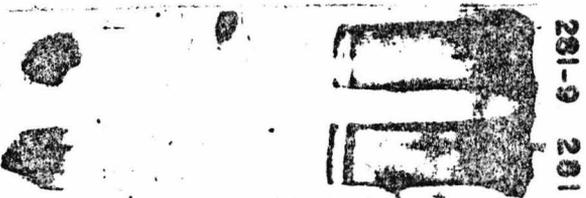
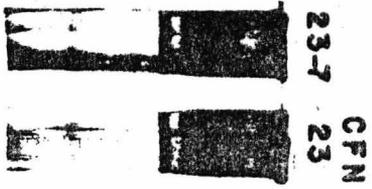


Figura 6 : Cepas Nod- que pierden plásmidos

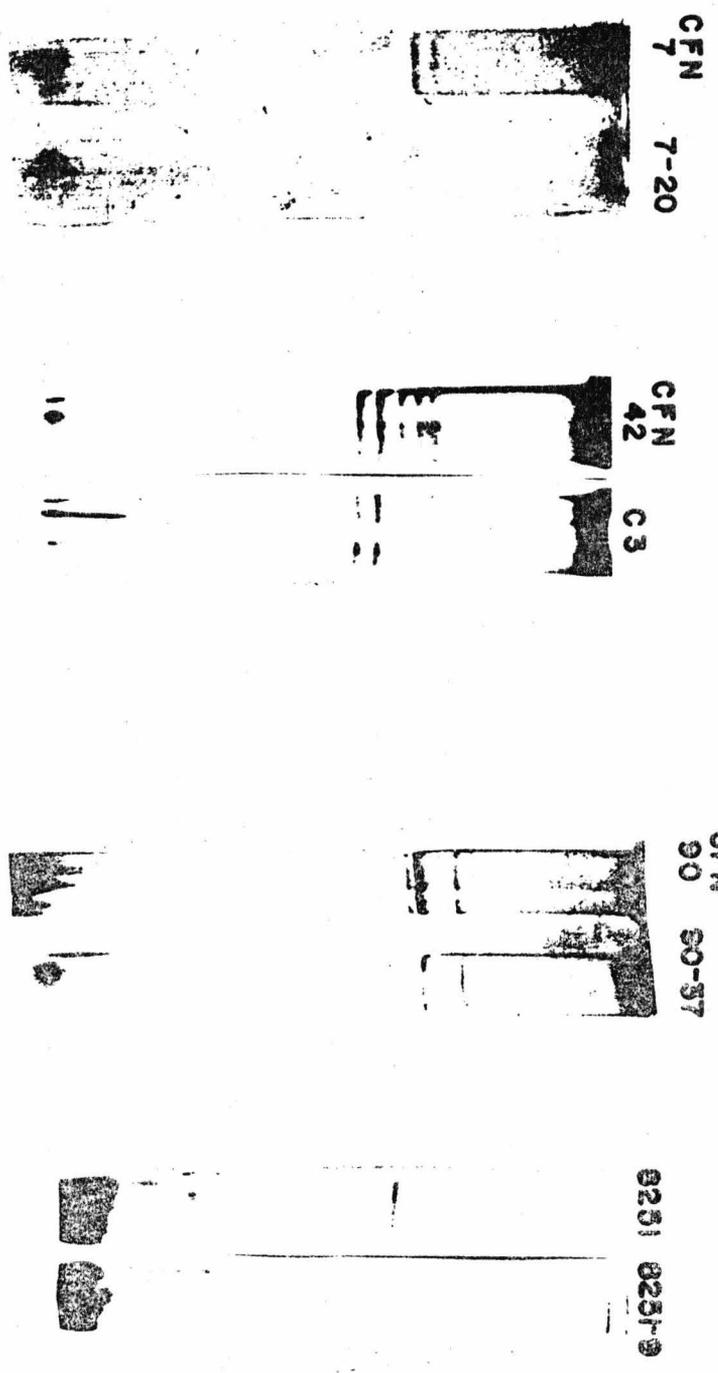


Figura 7: Hibridización del pCQ15 con DNA total digerido con EcoRI de las cepas Nod+ y Nod-

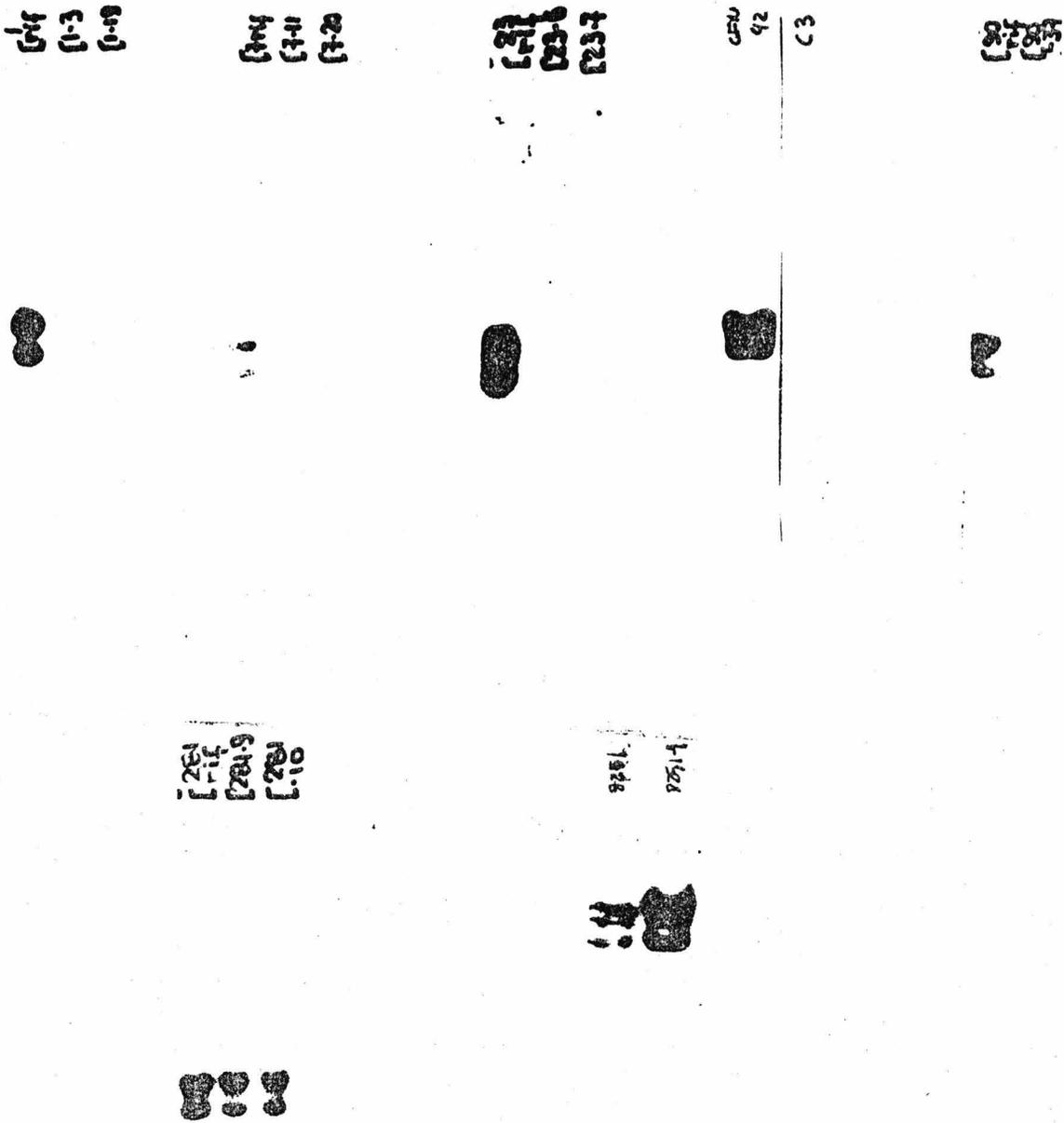


Figura 8- Hibridización de la clona B9 con los plásmidos de las cepas Nod+ y Nod- (patrón electroforético en las Figuras 4 y 5).

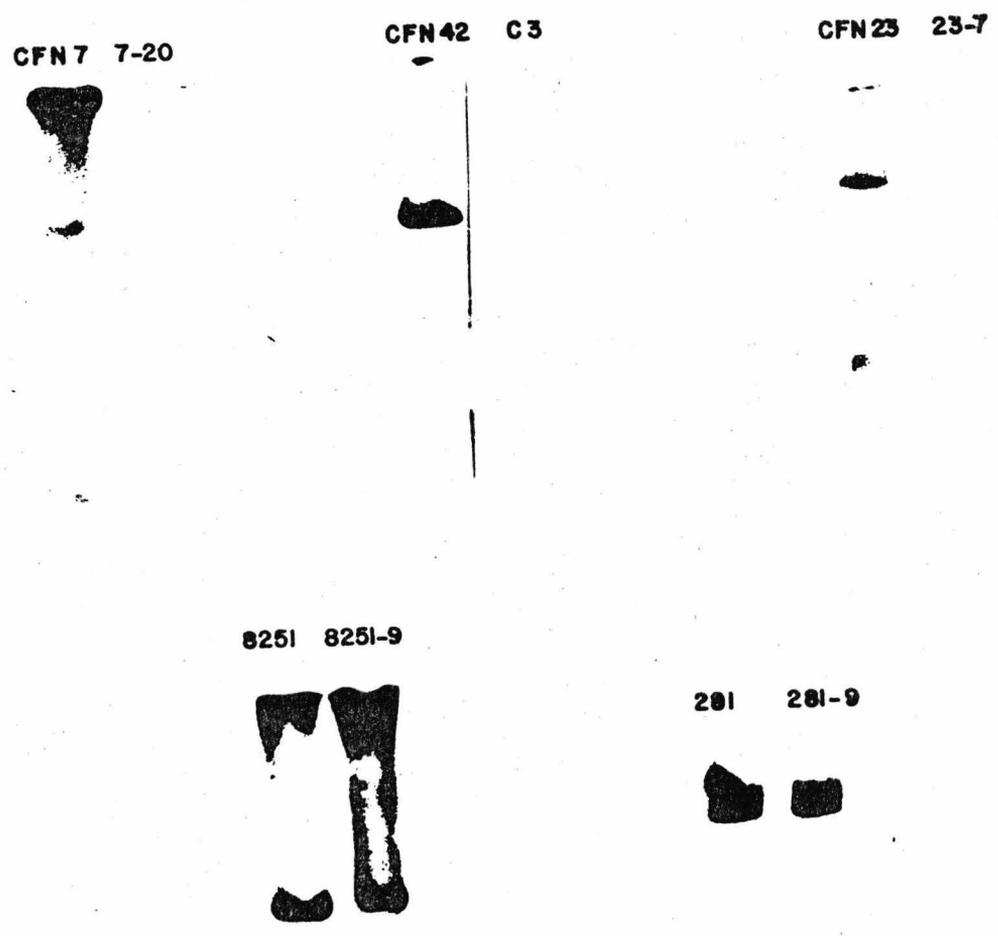


Figura 9.- Patrón Electroforético de los Plásmidos de las cepas derivadas de la GS 522



Figura 10.- Patrón Electroforético de los Plásmidos de la cepa GS 425 y sus derivados, hibridización con el Tn5.

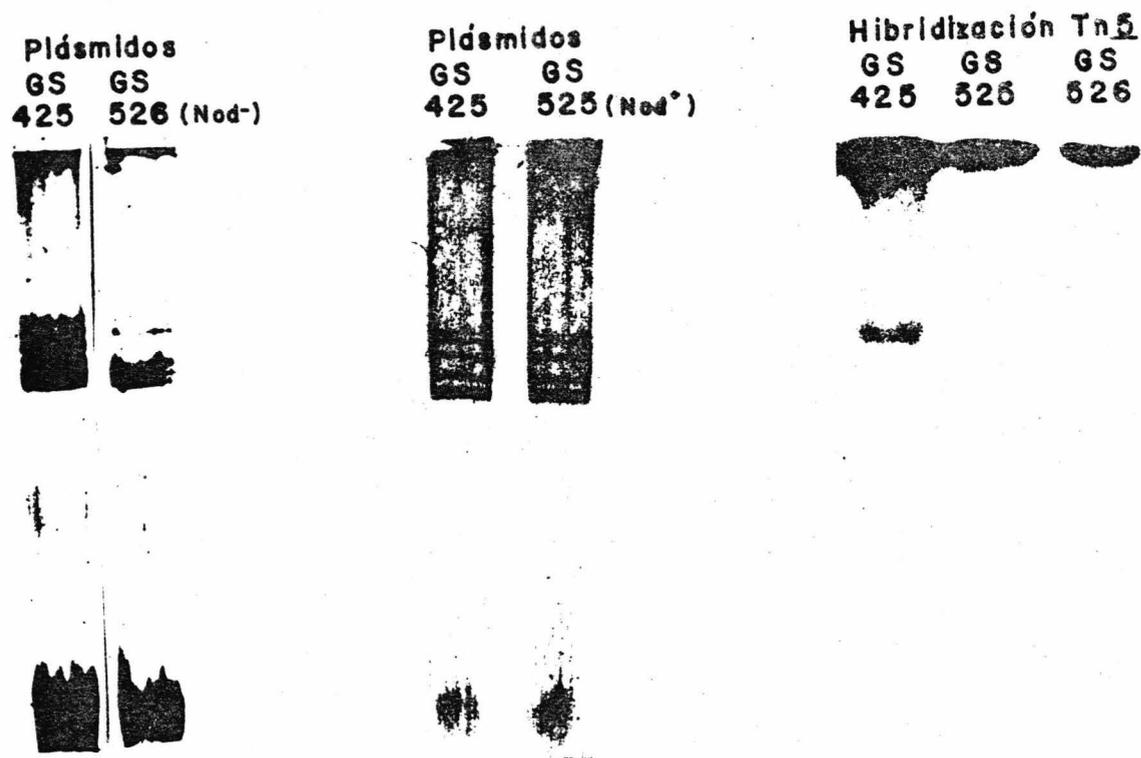


Figura II - Patrón Electroforético e hibridización de las cepas GS 2356 y GS 2456

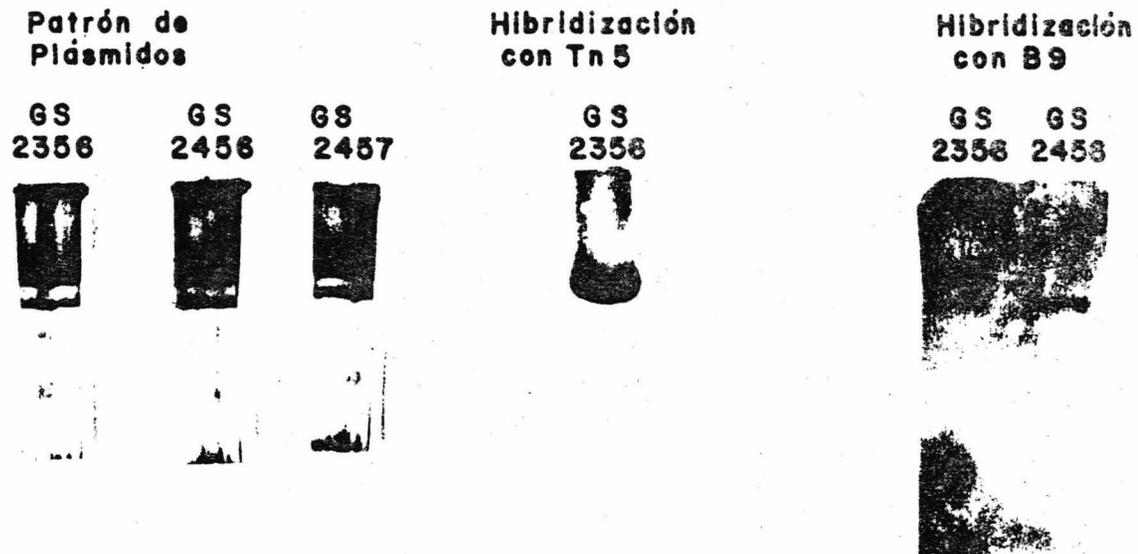


Figura 12.- Patrón Electroforético de los Plásmidos de las Cepas GS2456 y GS2455
● Hibridización con T.n.B.

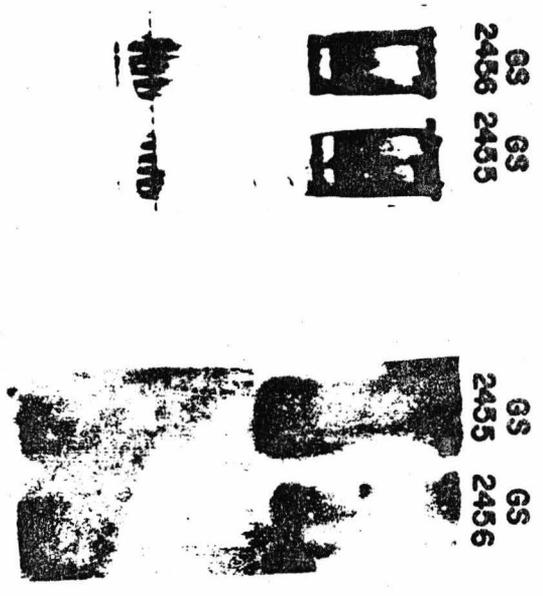


Figura 13.- Patrón electroforético de los plásmidos de las cepas derivadas de la GS 2356 y su hibridación con la clona B9

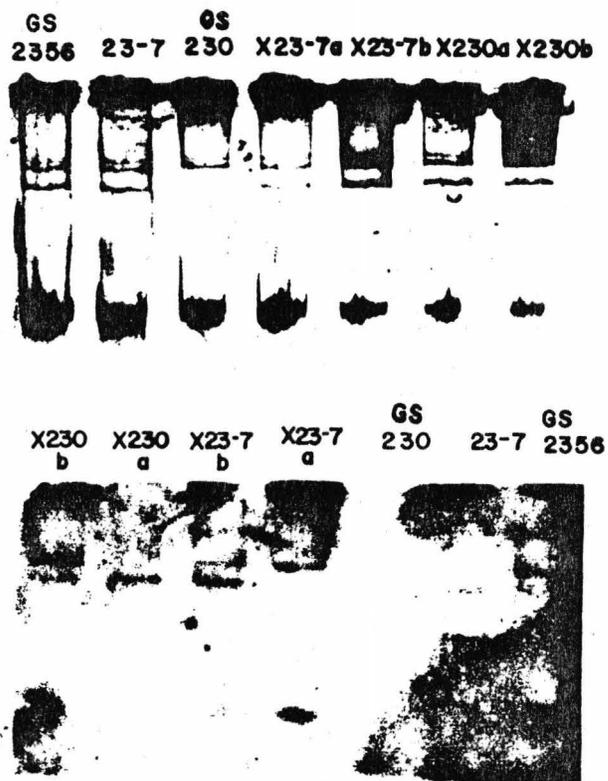


Figura 14.- Esquema de los Plásmidos de las Cepas derivadas de la CFN23

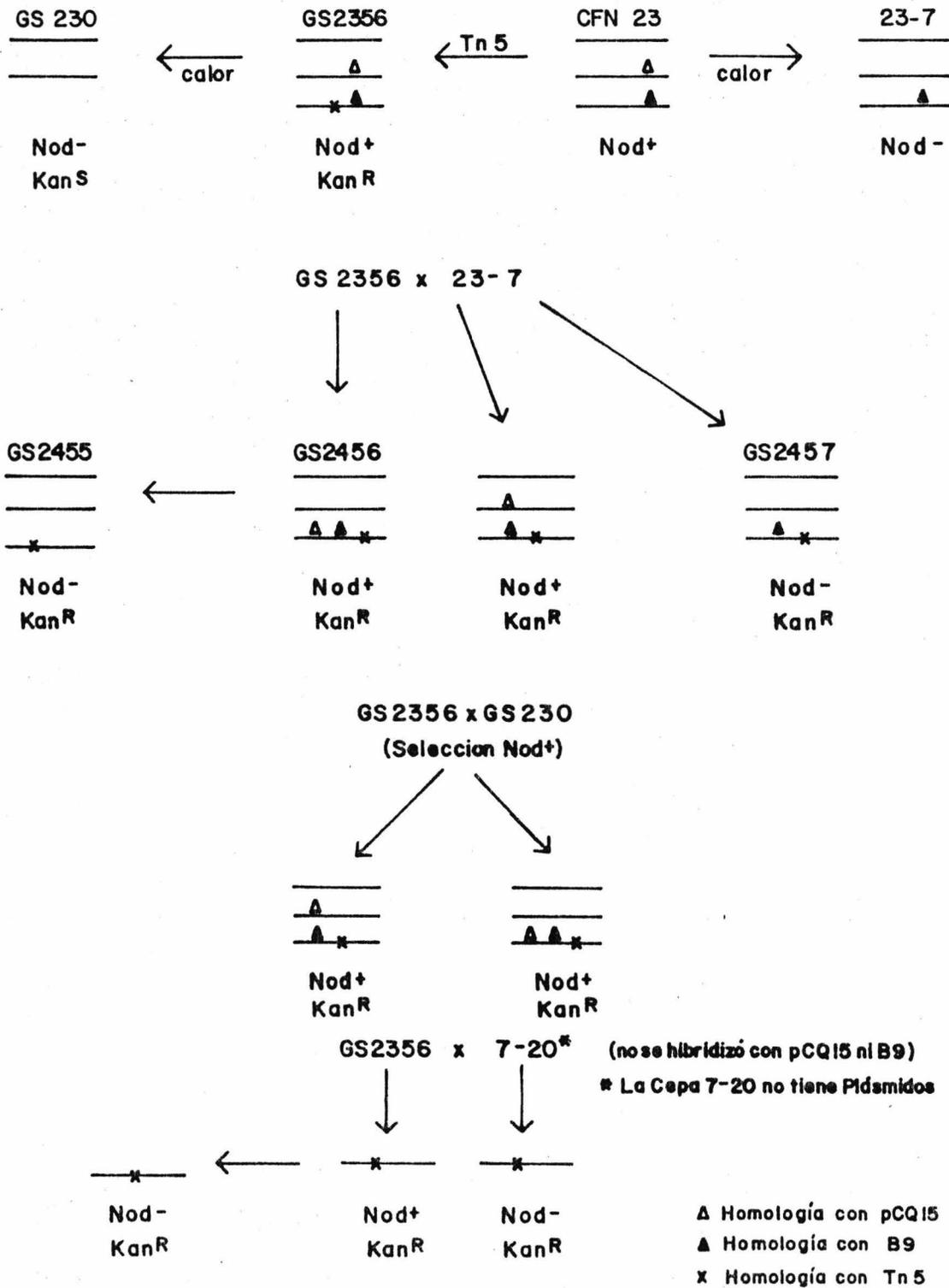


Figura 15: Transferencia del pGS1 y pGS3 a cepas Nod-

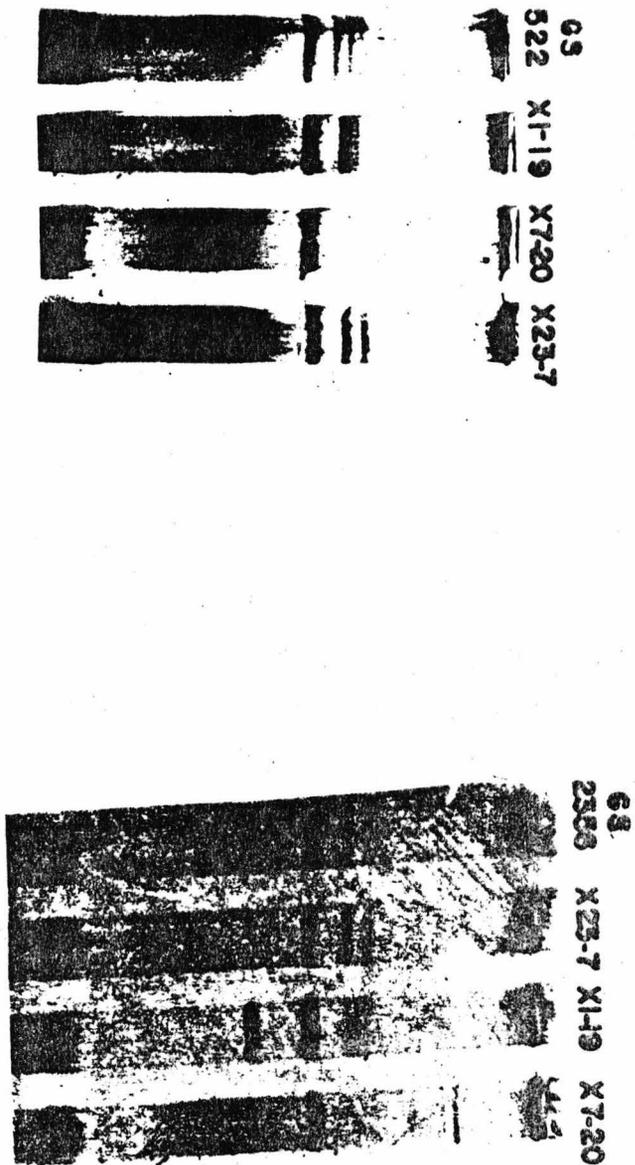
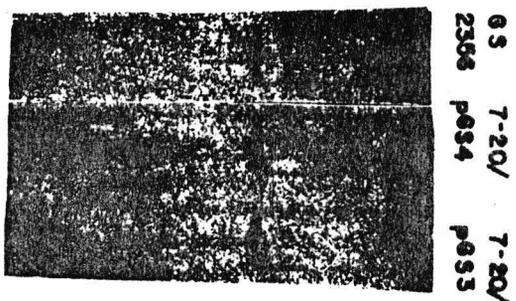


Figura 16.- Transconjugantes de la cruzada entre las cepas GS2356 y 7-20

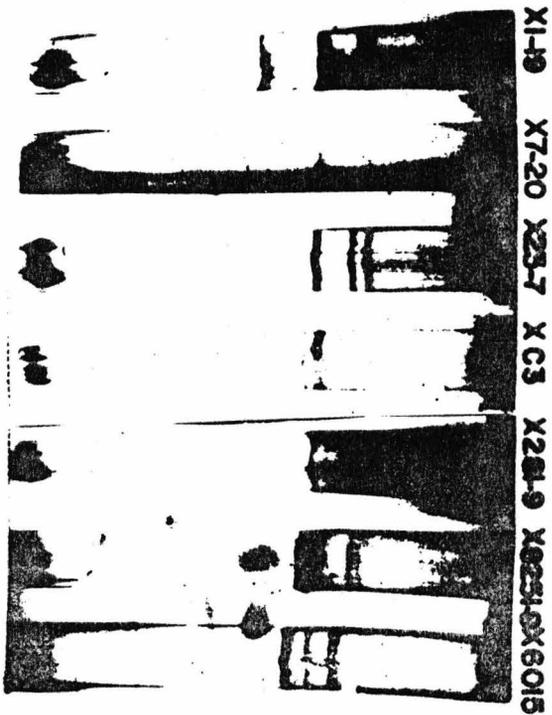


GS 7-20/
2356 p834 p835

7-20/p834 7-20/p834
Mod- Mod*

Control

Figura 17 - Patrón Electroforético de los Pídemidos de las cepas "No1" con el pJBSu1



Referencias

- 1.- Beringer, J.E., Brewin, N., Johnston, A.W.B., Schulman, H.M. y Hopwood, D.A. (1979). Proc. R. Soc. Lond. B. 204: 219.
- 2.- Postgate, J. (1978). Nitrogen Fixation. Studies in Biology 92. Edward Arnold (Publishers) L td.
- 3.- Ruvkun G.B. by Ausubel F-M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 (1): 91
- 4.- Winter A.C. y Burris R.H. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45 : 409.
- 5.- Winttenberg, J.B., Bergersen, F.J., Appleby C.A. y Turner G.L. (1974) J. Biol. Chem. 249: 4057.
- 6.- Sidlei-Lumbroso, R., Kleiman, L. y Schulman, H.M. (1978) Nature 273: 558.
- 7.- Cutting, J.A. y Schulman H.M. (1969) Biochemica et - - Biophysica acta. 192:486.
- 8.- Hyndman, L.A., Burris, R.H. y Wilson, P.W. (1953) J. - - Bacteriol 65: 522.
- 9.- Roberts, G.P., Leps, W.T., Silver, L.E. y Brill, W.J. (1980) App. Env. Microbiol. 39 (2): 414.
- 10.- Hollis, A.B., Kloos, W.E. y Elkan G.H. (1981). A. Gen. Microbiol. 123: 215.
- 11.- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, R., Soberón, G. y Palacios, R. (1982) Nature 299: 724.
- 12.- Johnston, A.W.B., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R. y Beringer J.E. (1978) - - Nature 276: 634.

- 13.- Hooykaas, P.J.J., Van Brussell, A.A.N., den Dalk-Ras, H., van Slog Teren, G.M.S. y Schilperoort, R.S. (1981) *Nature* 291: 351.
- 14.- Lamb, J.W., Hombrecher, G. y Jonston, A.W.B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186: 449.
- 15.- Zurkowski, W. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 181: 522 .
- 16.- Zurkowski, W. (1982) *J. Bacteriol.* 150 (3): 999.
- 17.- Buchanan-Wollaston, A.V., Beringer J.E., Brewin, N.J., Hirsch, P.R. y Johnston, A.W.B. (1980) *Molec. Gen. - - Genet.* 178: 185.
- 18.- Nuti, M.P. Leipidi, A.A., Prakash, R.K. y Cannon, F.C. (1979) *Nature* 282: 533.
- 19.- Banfalvi, Z. Sakanyan, V., Kenaz, C., Kiss, A., Rusha, I., y Kandorosi, A. (1981) *Molec. Gen. Genet.* 184: 318
- 20.- Rosenberg, C., Boistardi, P., Denarie, J. y Casse-Delbart, F. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 184: 236.
- 21.- Prakash, R.K., Schilperoort, R.A. y Nuti, M.P. (1981) *J. Bacteriol* 145: 1129.
- 22.- Hambrecher, G., Brewin, N.J., y Johnston A.W.B. (1981) *Molec. Gen. Genet.* 182: 133
- 23.- Brewin, N.J., Beringer, J.E., Buchanan-Wollaston, A.V. Johnston, A.W.B. y Hirsch, P.R. (1980) *J. Gen. Microbiol* 116: 261.
- 24.- Brewin, N.J., De Jong, T.M., Phillips, D.A. y Johnston, A.W.B. (1980) *Nature* 288: 77.
- 25.- Laban, A., Cohen, A. (1981) *Molec. Gen. Genet.* 184: 200.
- 26.- Hopkins, J.D., Clements, M.B., Liang, T., Osberg, R.R. y Syvanen, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2814.

- 27.- Ontsubo, E., Zenilman, M. y Ohtsunbo H. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 (2): 750.
- 28.- Petersor, B.C., Hashimoto, H. y Rocend R.H. (1982) J. Bacterio 151 (3): 1086.
- 29.- Mendez, Beatriz; Tachibonna, C. y Leug, S. (1980).
Plasmid 3: 99.
- 30.- Beringer, J.E., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V. Johnston, A.W.B. (1978) Nature 276: 633.
- 31.- Eckardht, T. (1978) Plasmid 1: 584.
- 32.- Hirsch, P.R., Van Montogu, M., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J. y Schell, J. (1980) J. GEN. Microbiol 120: 403.
- 33.- Vicent, J.M. (1970). A Manual for the Practiacal Study of Root Nodule Bacteria. International Biological - - Programe Handbook 15 Oxford. Blackwell.

Agradecimientos:

A Humberto de la Vega quien realizó los experimentos de hibridización de DNA presentados en este trabajo.

A Carmen Gómez y Jaime Mora quienes siempre estuvieron dispuestos a pensar en mi trabajo; de las discusiones que sustuve con ellos surgieron varias ideas - expuestas en esta tesis.

A Rafael Palacios quien siguió de cerca el desarrollo del proyecto, sin su apoyo e interés no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A Concepción Hernández por la transcripción -- del manuscrito.