

100
2ej.
Universidad Nacional Autónoma de México

Campus Iztacala

CINVESTAV

Instituto Politécnico Nacional

Caracterización del genoma de algunas cepas del género *Agrobacterium* usando la técnica de electroforesis de campo eléctrico pulsado en geles de agarosa

ENR.P. IZTACALA
LIC. BIOLOGIA.

Asesor M. en C. José Luis Sánchez Vargas

Alumno: Sergio Ulises Sánchez Buelna

No. de Cta. 8901930-8

Domicilio: Priv. Universal No. 13

Col. Clavería

Del. Azcapotzalco

México D.F.

Teléfono: 399-65-17

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

269470



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Índice	3
Índice de figuras	4
Dedicatorias	6
Agradecimientos	7
Resumen	8
Introducción	10
Antecedentes	17
Objetivos	28
Material y Métodos	29
Resultados y Discusión	37
Conclusiones	62
Apéndices	66
Bibliografía	76

Índice de figuras

Figura 1. Situación taxonómica del género <i>Agrobacterium</i>	27
Figura 2. Diagrama de flujo	36
Figura 3. Electroforesis en equipo CHEF, muestras sin tratamiento	38
Figura 4. Electroforesis en equipo CHEF, muestras sin tratamiento con agarosa de grado cromosomal	39
Figura 5. Electroforesis en equipo TAFE, muestras no tratadas	40
Figura 6. Electroforesis en equipo CHEF, muestras tratadas con radiación	47
Figura 7. Electroforesis de 20 h en equipo TAFE, muestras tratadas con radiación muestras tratadas con la enzima Swa 1 con 32 h de incubación.	48
Figura 8. Electroforesis de 45 h en equipo TAFE, muestras tratadas con radiación muestras tratadas con la enzima Swa 1 con 32 h de incubación.	49
Figura 9. Electroforesis en equipo CHEF, muestras tratadas con la enzima de restricción Hin DIII y endonucleasa S1.	53
Figura 10. Electroforesis de 20 h en equipo TAFE, muestras sin tratar, tratadas con la enzima Swa 1 y con Eco R1, con 8 h de incubación.	54
Figura 11. Electroforesis de 45 h en equipo TAFE, muestras sin tratar, tratadas con la enzima Swa 1 y con Eco R1, con 8 h de incubación.	55
Figura 12. Electroforesis en equipo CHEF, muestras tratadas con dos diferentes enzimas de restricción y radiación.	59
Figura 13. Diagrama de conexión del equipo CHEF-DR II	68
Figura 14. Diagrama de distribución de cargas en la celda CHEF-DR II en 2 pulsos	69

Dedicatorias

A Javier Ulises

A Imelda Tu apoyo y comprensión parecen infinitos

A mis padres

Ma Elvira

Sergio

Se que esperaban este momento desde hace mas de 24 años, pero solo es el comienzo

A mis hermanos

Ursula

Pablo

Fernando

A mis amigos

No terminaria en esta hoja si los nombrara a todos, pero esta especialmente dedicada a aquellos que realmente han comprometido su amistad conmigo en toda situación.

Agradecimientos

Al M. en C. Jose Luis Sanchez Vargas

Por haber dirigido esta tesis, pero principalmente por su
paciencia para enseñarme a lo largo de su realización.

Al Dr. Ruben Lopez Revilla

Por las facilidades que nos dio en su laboratorio durante
la elaboración de este trabajo y por todo lo que me
enseñó. Sin su apoyo este trabajo definitivamente
no sería lo mismo.

Al equipo del Lab. 17 del Dpto. de Biol. Celular
del CINVESTAV

Por su apoyo constante y su compañerismo principalmente
durante la fase experimental de la tesis.

Al Dr. Jesus Calderon y a CONACYT

Por el apoyo economico brindado durante la tesis.

Resumen

Por medio de la electroforesis de Campo Eléctrico Pulsado en Geles de Agarosa (CEPGA) se pueden separar moléculas de DNA de más de 50 kilopares de bases (kpb), y se ha podido determinar el número de cromosomas en microorganismos eucarióticos, pero no puede resolver replicones circulares cerrados de peso molecular elevado. Pero, con la electroforesis CEPGA ya se ha demostrado que existen plásmidos y cromosomas lineales en eubacterias. El análisis del genoma de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 por electroforesis CEPGA demostró una sorprendente organización caracterizada por la presencia de dos cromosomas, uno circular de 3000 kpb y otro lineal de 2100 kpb, así como dos megaplásmidos circulares cerrados: el pAtC58 (críptico, 450 kpb) y el pTi (200kpb). En este trabajo investigamos la organización genómica en cuatro cepas de *A. rhizogenes* y dos de *A. tumefaciens*. Utilizamos dos métodos de linealización del DNA: 1) irradiación gama de una fuente de ^{137}Cs por medio de un irradiador Gamma Cell, y 2) tratamiento con nucleasa S 1. La electroforesis se llevó a cabo en dos aparatos de CEPGA denominados "Clamped Homogenous Electric Field" (CHEF) y "Transversal Applied Field Electrophoresis" (TAFE). También realizamos restricción total con la enzima Swa I de las muestras de DNA y obtuvimos un patrón de restricción similar al reportado previamente con *A. tumefaciens* C58C1. La dosis de irradiación óptima para linealizar los replicones circulares cerrados fue de 2 krad. En todas las muestras se mostró la aparición de tres bandas de DNA linealizadas con topología y pesos moleculares similares (3000 kpb, 2100 kpb, 450 kpb) y es posible que haya variación en el número de megaplásmidos observados en algunas cepas. Con los resultados descritos demostramos una organización genómica similar en dos especies del

género *Agrobacterium* y en distintas cepas de ambas especies. Estos datos sugieren la probabilidad de que la misma organización genómica se encuentre en otros miembros de las Rhizobiaceas.

Introducción

Tradicionalmente se había aceptado que el genoma bacteriano se encuentra organizado como un sólo cromosoma circular cerrado anclado a la membrana celular, donde este cromosoma contenía toda la información genética de la especie. Sin embargo, la mayoría de las bacterias contienen DNA extracromosomal y cada estructura extracromosomal independiente es denominada plásmido. Estos confieren algunas características especiales como resistencia a antibióticos y metales pesados, producción de toxinas, etc. Es precisamente este DNA el que se usa más frecuentemente para el desarrollo de vectores moleculares y la obtención con ellos de microorganismos modificados genéticamente para que desarrollen una función específica (6).

La serie de supuestos mencionados son generados con base en el enorme número de toda clase de investigaciones realizadas con el genoma de *E. coli*, que van desde mapeo por restricción del genoma, hasta microscopía electrónica del mismo (11). Éste es uno de los organismos más estudiados, y la información de la organización de su genoma es universalmente aceptada como modelo para todos los procariontes y usada por extrapolación como modelo explicativo de la organización genómica para las demás eubacterias donde existe escaso conocimiento sobre sus sistemas genéticos. Todos estos estudios han permitido determinar que el genoma de *E. coli* K12 consta de un sólo cromosoma circular cerrado de 4.7 Mb (6).

Remontándonos un poco en la historia de los descubrimientos en cuanto al genoma bacteriano y los “secretos” de la herencia, debemos tener en cuenta que los investigadores se

preguntaban cual o cuales eran las moléculas responsables de la herencia y cual era su mecanismo de propagación.

Siguiendo la línea de investigación que abría la comprobación de que las presiones de selección deberían de inducir al cambio en la frecuencia de aparición de algún fenotipo, por algún mecanismo codificado en la célula por un elemento desconocido y único de la misma y su descendencia. Se empezaron a seleccionar cepas bacterianas mutantes para alguna característica específica. Para el proceso de identificación y selección se sembraban grandes poblaciones en medios selectivos donde sólo las células mutantes pudiesen sobrevivir y dejar descendencia (11).

Fue gracias al desarrollo de este conocimiento y de la técnica de selección de mutantes, que se descubrió el intercambio de material genético entre las bacterias por el experimento de Lederberg y Tatum (1947), quienes obtuvieron dos cepas mutantes nutricionales diferentes doble auxotróficas de *E. coli* y las mezclaron obteniendo progenie que pudo crecer en medio mínimo. De esta manera se tuvo que aceptar también la existencia de la recombinación entre el material genético de las bacterias mutantes (11).

A pesar de experimentos que se hicieron en el sentido de probar que la molécula de DNA era el material genético, este concepto no fue aceptado universalmente hasta los experimentos de Hershey y Chase, donde por medio de marcaje radioactivo se comprobó que era el DNA y no las proteínas, lo que el bacteriófago inyectaba como material genético a los huéspedes bacterianos al momento de infectarlos. Además otros análisis genéticos demostraron que no había un sólo inicio

para el proceso de replicación en el mapa lineal de los genes de *E. coli*. La interpretación de estos resultados forzó a pensar en la organización de los genes sobre un cromosoma circular. La hipótesis del cromosoma circular se comprobaría posteriormente gracias al marcaje con timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) del DNA y la observación del cromosoma, después de la lisis celular suave y la exposición de éstas preparaciones a material fotográfico que resultó en las autorradiografías memorables que pusieron de manifiesto que el cromosoma bacteriano representaba una molécula circular de casi 1 mm de longitud (6).

El mapeo genético en bacterias empezó originalmente tomando un fragmento de DNA marcado genéticamente y tratando de lograr recombinación con la región homóloga de DNA en una cepa receptora mutada para dicha función, de manera que la frecuencia de recombinación entre dos marcadores resulta proporcional a la distancia entre ellos. Los resultados de estas pruebas evidenciaron detalles acerca de la organización del genoma bacteriano así como la presencia de operones, preferencias en cuanto a orientación de agrupamiento de genes, y que había información que no se encontraba en el cromosoma sino en plásmidos y fagos (6).

Otra posibilidad para el mapeo genético en la que se hace uso de poblaciones bacterianas fue el tratamiento con enzimas de restricción de tipo II. La actividad de este tipo de enzimas sobre un determinado DNA da un número específico de fragmentos con pesos moleculares definidos, y los patrones son diferentes para el DNA de cada especie de bacterias (6). Con el descubrimiento posterior de enzimas de restricción de tipo II con secuencias de reconocimiento y corte en octanucleótidos y longitudes mayores se obtuvieron fragmentos de DNA cada vez más

grandes y se empezó a utilizar la electroforesis CEPGA para separar fragmentos de DNA de más de 20 Kpb (6). Los intentos de resolución de genomas bacterianos intactos con electroforesis CEPGA pusieron de manifiesto la presencia de replicones lineales y otras formas de organización genética no descritas hasta ese momento por el mapeo físico y genético (13).

La mayoría de los miembros del género *Agrobacterium* son fitopatógenos, y su distribución es cosmopolita ya que se encuentran prácticamente en cualquier región del mundo. *Agrobacterium* pertenece al grupo de bacterias que forman la zona de la rizósfera, en la cual se encuentran las mayores concentraciones de organismos en el suelo (25). En la rizósfera la influencia de los exudados emanados por los vegetales es más marcada y comprende a partir del epitelio de la raíz hasta 5 mm alrededor de éste órgano.

Se pueden tomar en cuenta dos fenotipos principales en todas las plantas (principalmente leguminosas) que son atacadas por: *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*.

a) El primer fenotipo y también el más estudiado es el desarrollo y división sin control de las células en la región de la herida que forman masas callosas. La zona principal de infección corresponde a la parte del tallo más cercana al sitio de unión con la raíz. En la fase más aguda de la enfermedad tumoral se tiene una reducción del crecimiento de la planta en todos sus otros órganos, aún los no afectados, y hay mínima productividad por el crecimiento excesivo de la masa callosa que puede obstruir los conductos internos del organismo (25).

b) El segundo fenotipo es la aparición fuera de lugar y sin control de raíces ageotrópicas que dan la apariencia de cabellos en la planta, sobre todo el tallo. El crecimiento excesivo de las raíces ageotrópicas determina una reducción de la talla en la planta y también de su productividad (25).

La importancia del estudio del género *Agrobacterium* está determinada por dos características:

1. Su capacidad patogénica única que se realiza por la transferencia de material genético entre la bacteria y las plantas hospedantes. En los dos géneros que estudiamos se expresa con distintos signos pero alterando la producción de enzimas implicadas en el control y/o metabolismo de los reguladores del crecimiento vegetal. Tanto *A. tumefaciens* como *A. rhizogenes*, invaden las células sanas en las heridas producidas por cualquier agente externo a la planta. El proceso que aparentemente determina la localización y acercamiento de las agrobacterias involucra la quimiotaxis de los microorganismos en el ambiente de la rizósfera hasta encontrar al hospedero. La bacteria después de una compleja serie de interacciones con las células vegetales termina introduciendo una parte del DNA del plásmido Ti a la célula vegetal, el segmento de material genético denominado T-DNA (Transferred-DNA). El cual para tener oportunidad de llegar al núcleo sin ser degradado por las enzimas exonucleolíticas celulares se encuentra protegido por la proteína VirD2 la cual va unida covalentemente al extremo 5' del DNA de la cadena sencilla del T-DNA (18). Una vez que el complejo del T-DNA alcanza el núcleo celular se inserta en alguno de los cromosomas del genoma del hospedero y se expresan dos vías metabólicas de síntesis de hormonas completamente ajenas a las vías de biosíntesis

endógenas de la célula hospedero. Una de ellas produce ácido indol-3-acético (AIA) a partir de triptofano, y la otra da inicio a la formación de isopenteniladenosina 5´monofosfato que es una citocina. Debido a los cambios endógenos manifestados con concentraciones elevadas de ambas fito-hormonas la planta pierde el control sobre el ciclo celular de las células de la región herida, con la consiguiente aparición de masas callosas similares en apariencia a los tumores malignos de organismos vertebrados (25).

En *A. rhizogenes* el mecanismo de transferencia está menos estudiado que en *A. tumefaciens*, pero se supone que es básicamente similar al descrito para esta última bacteria. El T-DNA codifica para varias proteínas distintas a las de *A. tumefaciens*, por lo que la enfermedad producida por este organismo se manifiesta principalmente como la aparición abundante y crecimiento anormal de raíces en la zona de la herida, las cuales, a diferencia de los callos producidos por *A. tumefaciens*, sí se pueden regenerar en plantas transgénicas. Estas presentan una severa reducción en la talla al madurar, hojas arrugadas y esterilidad masculina de la planta. Es decir decae la producción de polen en la flor y finalmente ocasiona una floración prematura. No se sabe muy bien cuál es la causa de todos estos cambios, pero se sabe que en la aparición y crecimiento de las raíces intervienen cuatro genes denominados *rol A*, *rol B*, *rol C* y *rol D*. En algunas cepas del tipo agropina, el T-DNA también codifica para 2 enzimas que participan en la biosíntesis de auxinas como se da en todas las cepas de *A. tumefaciens* (25).

2. La posibilidad de realizar transferencia de material genético de manera relativamente fácil con sus hospederos hacen de este grupo de bacterias un vehículo natural para el desarrollo de la ingeniería genética en plantas (19, 25).

Antecedentes

La electroforesis en geles de agarosa en campos eléctricos pulsados es una técnica relativamente nueva desarrollada en 1984, con el fin de superar las limitaciones de la electroforesis convencional en geles de agarosa. Con esta última se podrían separar en teoría todas las moléculas de DNA de acuerdo a su peso molecular formando un gradiente a lo largo del gel, siempre y cuando se les de el tiempo necesario de migración en un campo eléctrico formado por los dos polos fijos pero variando su ángulo periódicamente (19, 1, 2, 4).

La electroforesis CEPGA fue desarrollada debido a que en la electroforesis convencional de campo fijo se pierde la resolución a partir de los 50 kpb, aun en geles preparados con una concentración de 0.5%. La agarosa preparada con concentraciones menores es muy difícil de manejar ya que se vuelve demasiado suave y aunque teóricamente se podrían separar moléculas de DNA de hasta 240 Kpb en geles de agarosa al 0.1%, resulta casi imposible el manejo adecuado de estos geles. Por esta razón se intentó una variación de la misma técnica, donde las moléculas de alto peso molecular fueron sometidas a variaciones abruptas y periódicas de la dirección de la migración. Estas variaciones generan reacomodos espaciales en las moléculas lineales de DNA, que al parecer facilitan su trayectoria por el entramado molecular de la matriz de la agarosa.

El tiempo que tarda en producirse la alteración conformacional es directamente proporcional al tamaño de la molécula. Esta condición determina cuanto tiempo permanecerá reptando la molécula por los poros del gel y en que proporción es retenida por fuerzas de fricción

durante su trayecto por el entramado molecular de la agarosa y por lo tanto la fracción de tiempo que pasa migrando el DNA a lo largo del gel depende de su masa molecular (1, 2, 4). La ventaja de esta técnica sobre la electroforesis convencional es la separación del DNA de peso molecular mayor a 50 kpb (1,2) y teóricamente hasta los 10 Mpb.

La electroforesis CEPGA se basa en la aplicación alternada de un campo eléctrico variando la posición del campo de manera semicircular; la variación se hace con respecto al tiempo y se mide en grados, el sistema de electroforesis CEPGA más sencillo, que es el sistema denominado de inversión de campo, donde sólo existen dos electrodos como en un sistema de campo eléctrico fijo (18). Sin embargo, periódicamente se invierte la polaridad de los electrodos generando un cambio en la polaridad del campo eléctrico. El periodo que se puede establecer comprende desde unos cuantos segundos hasta minutos u horas, dependiendo del tamaño del DNA que se desee separar. En éste caso la variación del campo medida en grados sería de 180°. En otros aparatos es menor el ángulo de aplicación del campo eléctrico por ejemplo en un hexágono el campo eléctrico cambia 120° cada determinado tiempo, como sucede en los aparatos CHEF (Clamped Homogenous Electric Field) (18, 19).

Una de las limitantes de la electroforesis CEPGA es que sólo se puede utilizar con moléculas de conformación lineal, por lo que los replicones circulares cerrados de los procariontes deben ser linealizados antes de poder ser sometidos a esta técnica y así determinar con exactitud su masa molecular (24). La otra limitante en esta técnica es que debido a que se usa principalmente para la caracterización de moléculas muy grandes de DNA y la interpretación de

la topología de las moléculas depende mucho de la integridad con que sean obtenidas éstas. Además para tener éxito en la separación de los distintos replicones de una célula es de suma importancia tener un método de lisis suave de las mismas para mantener el DNA intacto. Esto no se puede lograr con los métodos tradicionales, sino que primero se deben incluir las células en agarosa de bajo punto de fusión, y posteriormente proceder a la liberación del DNA. El uso de enzimas hidrolíticas que fragmenten tanto la pared y las proteínas asociadas con el DNA y el medio con detergentes permiten la lisis suave de las bacterias incluidas en los bloques de agarosa de bajo punto de fusión. Hay que tener en cuenta que se dificulta la penetración de las moléculas de cualquier solución debido al hecho de que las células se encuentran incluidas en la agarosa. Esto afecta principalmente la acción de las enzimas, por lo que se deben usar en soluciones altamente concentradas e incubarlas por tiempos mayores a los que se emplean para muestras en solución. También se aplica la estrategia para todo tipo de enzimas utilizadas para el tratamiento de los bloques de agarosa, incluyendo las enzimas de restricción que cortan el DNA en pocos fragmentos (4, 18, 19).

La técnica de electroforesis CEPGA requiere de ciertos cuidados especiales para establecer adecuadamente las condiciones de corrida. Entre estos están la preparación de un gel de concentración adecuada que va desde 0.7% a 1.5% de agarosa y preparación de la muestra que requiere ser incluida en agarosa a concentración similar a la del gel de corrida, en contraste con la electroforesis convencional donde la muestra de ácidos nucleicos se obtiene en solución y por rompimiento hidrodinámico no se puede obtener DNA intacto de peso molecular mayor a 50 Kb (1,2). En las técnicas convencionales de extracción, el DNA sufre toda una suerte de manejos

regulares; como son la centrifugación, las fuerzas de fricción con las paredes, las puntas de las pipetas durante la medición de los volúmenes de la solución, agitación, etc. que contribuyen a este rompimiento hidrodinámico. Para la preparación de la muestra se debe cuidar el DNA de los replicones para que permanezca intacto y el patrón de bandas durante la corrida sea representativo de la geometría cromosómica del genoma del microorganismo.

En la electroforesis CEPGA la migración de las muestras de DNA a lo largo el gel se describen por lo menos tres fases de definición para la separación. Estas se encuentran bien caracterizadas en la bibliografía especializada y se dividen de la siguiente forma:

Fase I. Esta es la fase más cercana al origen, también es la más angosta y casi nunca se toma en cuenta pues presenta muy poca definición, por lo que no es posible definir muy bien las bandas una de otras, ni hacer interpretaciones adecuadas para asignar el peso molecular de las bandas encontradas en esta zona (4, 19).

Fase II. Es la fase donde se encuentra la mejor separación y definición de las bandas, y también una de las más grandes, por lo que las interpretaciones en cuanto al peso molecular son muy confiables y es esta la fase que se debe procurar sea lo más ancha posible (4, 19).

Fase III. Es la fase de definición mediana o satisfactoria y presenta una amplitud similar a la anterior, es una zona adecuada para hacer interpretaciones de peso molecular (4, 19).

Se han ideado diversas estrategias para alargar la fase II en la corridas de electroforesis CEPGA, una de ellas es el cambio del intervalo entre pulsos a lo largo del tiempo de corrida de forma constante y gradual que esta controlado por la computadora del CHEF (ramping) (4). Esto genera una especie de unión o promedio entre las fases II y III principalmente, lo cual empobrece un poco la definición de la fase II pero en cambio deja una zona de definición aceptable muy amplia. Para el sistema TAFE (Transversal Applied Field Electrophoresis) la computadora que se utilizó sólo tenía la opción de cambiar abruptamente los tiempos entre pulsos en un determinado punto de la migración. El punto de la migración donde se cambia es proporcionado a la computadora por el usuario, éste determina cuantos pulsos de determinado tiempo se desea que la computadora emita, y la computadora muestra el tiempo total que requiere para emitir la cantidad de pulsos deseada. Si se hace correctamente, se obtiene una zona de definición óptima bastante amplia (18, 19).

Hay que señalar que existen ciertos factores físicos muy importantes para el éxito de la separación del DNA y cuya selección de los parámetros óptimos durante la corrida determinan la obtención de buenos resultados. Entre estos los que se deben manejar en forma constante en la mayoría de los experimentos que se realicen estan: la temperatura y la velocidad del flujo de la solución amortiguadora en el sistema de recirculación en la cámara de electroforesis (1,2,4).

Algunos otros factores que es necesario considerar para mejorar la separación de ácidos nucleicos son:

-Tiempo entre pulsos. Cuando se varía el tiempo y se usan intervalos muy cortos entre cada pulso hay escasa posibilidad de cambio de conformación de las moléculas más grandes y la separación será mínima en la región donde se separan mejor estas moléculas. Esta variable nos proporciona un factor para la selección en cuanto a la zona de nitidez deseada en el gel, dándonos a escoger entre los intervalos de peso molecular que deseamos separar (2,4).

-Voltaje. Es la fuerza de atracción hacia el electrodo que ejercemos sobre las moléculas cargadas. Esta variable posibilita disminuir los tiempos de corrida y el intervalo entre los pulsos cuando aplicamos mayor intensidad al campo eléctrico al gel. Sin embargo se debe tomar en cuenta que a mayor voltaje aplicado es mayor el calentamiento del amortiguador y el gel en la cámara de electroforesis y por lo tanto la viscosidad del amortiguador y las interacciones con el gel cambiarán. De no tener integrado un sistema refrigerante que mantenga la temperatura constante y evite las alteraciones en la matriz del gel y las moléculas que están siendo separadas el calentamiento excesivo de la matriz desnaturaría las moléculas dentro de la misma ocasionando una mala separación del DNA. El mantener una temperatura óptima de 12 °C constante durante la corrida conduce a una mejor separación de las bandas de peso molecular cercano (2,4).

-Tiempo de corrida. El tiempo determina el número de bandas individuales de alto peso molecular que se pueden separar y que son visualizadas en el gel. Por lo tanto hay que tomar en cuenta que el tiempo de corrida es directamente proporcional a la separación entre las bandas de peso molecular muy cercano. Sin embargo, si se corre por un tiempo excesivamente largo existe

la posibilidad de que se salgan del gel las bandas de menor peso molecular o que no entren del todo al gel los DNA's de mayor peso si se usan tiempos demasiado cortos (2,4).

-Concentración de agarosa. Cuando la agarosa gelifica adquiere una forma molecular a manera de una rejilla tridimensional, y los "poros" tridimensionalmente se cierran más a medida que la concentración del polímero se incrementa. Mientras más concentrada sea la agarosa el entramado molecular es más complejo y estrecho. Así, las moléculas de DNA serán más retenidas por fricción y les tomará mayor tiempo reorientarse con una sensible disminución de su movilidad a través de los poros, por lo que será necesario alargar el intervalo entre los pulsos. Cuando la agarosa esta diluida el gel pierde su efecto de tamiz molecular y se vuelve extremadamente quebradizo (2,4).

-Incremento lineal en el tiempo de corrida ("ramping"). Esta estrategia sólo es aplicable en los aparatos comerciales que permiten variar éste factor. En ellos se incrementa progresivamente y de manera lineal el tiempo que se da para cada pulso eléctrico en cada serie de par de electrodos. Así se genera una separación uniforme entre las bandas, la cuál es el promedio de las separaciones de los tiempos fijos, entre los cuales se desarrolla el intervalo. Este "promedio" genera como ventaja la posibilidad de relacionar más directamente la distancia recorrida por la banda con su peso molecular, pero provoca la sensible disminución de resolución en la zona de mayor separación propia del tiempo de corrida. Estas características varían considerablemente de tiempo a tiempo permitiendo de manera selectiva el separar las moléculas de cierto peso molecular utilizando un tiempo determinado entre los pulsos (2,4).

Con la técnica de electroforesis CEPGA se han encontrado evidencias recientes en varios géneros bacterianos que contradicen las ideas clásicas de la organización genómica como se estableció inicialmente en el genóforo de *E. coli* (24, 21). Existe una gran diversidad en la geométrica cromosomal de las bacterias, pues hay especies bacterianas como *Rhodobacter sphaeroides* que contiene dos cromosomas circulares. También se ha descrito un sólo cromosoma lineal en *Borrelia burgdorferi*, *Rodococcus fascians* y en *Streptomyces lividans*; *Brucella melitensis* tiene dos cromosomas y *Rhizobium meliloti* posee un cromosoma y tres megaplásmidos circulares de 2.4, 1.7 y 1.4 Mpb respectivamente (1, 10). Al ser ineficaz la curación de cepas con megaplásmidos, se ha empezado a poner en duda la pertinencia de seguir considerando estos replicones como factores genéticos accesorios.

Debido a que la electroforesis CEPGA es una técnica donde trabajamos con DNA intacto embebido en agarosa, se dificulta la acción de las enzimas que se usan para linealizarlo, se ha explorado la utilización de otros métodos para la linealización del DNA, uno de los métodos reportados por Allardet Servent et al., (1), es la utilización de rayos X y rayos γ con una fuente de emisora de ^{60}Co (4), gracias a la energía de este tipo de radiaciones X se pueden romper los enlaces del DNA cuando los rayos inciden en los átomos involucrados en el enlace, con una cantidad de radiación controlada se puede lograr que solo se linealicen la mayoría de las moléculas de la población de DNA.

Los rayos X pueden considerarse equivalentes a los rayos gama, pues ambos son radiaciones del tipo no particuladas, sin embargo tienen diferencias, una de ellas es que los rayos

X son radiación fotoeléctrica, la cual descarga su energía en el punto donde impacta y no tiene posibilidad de reproducción, es decir el átomo donde impacta absorbe toda la energía, en cambio en los rayos gama que son radiación nuclear pueden lograr que los electrones del átomo donde impacta generen radiación nuevamente aunque de menor energía y esta a su vez impacte otro átomo repitiendo el proceso hasta llegar a un nivel bajo de energía en el cual ya no se pueda continuarla la cadena, a esto se le conoce como efecto compton, y el resultado es que la cantidad de reacciones que producen los rayos gama se multiplica (12).

El género *Agrobacterium* está comprendido por bacterias Gram negativas con ubicación taxonómica muy cercana al género *Rhizobium* (fig. 1) y ambos géneros forman la familia de las Rhizobiaceas (14). Los estudios de mapeo por restricción del genoma de las agrobacterias han dado evidencias de que el tamaño corresponde a un cromosoma circular cerrado de 5.1 Mpb (1). De igual forma se interpretaron los resultados como había dado la evidencia de la geometría en el genoma al de *E. coli*.

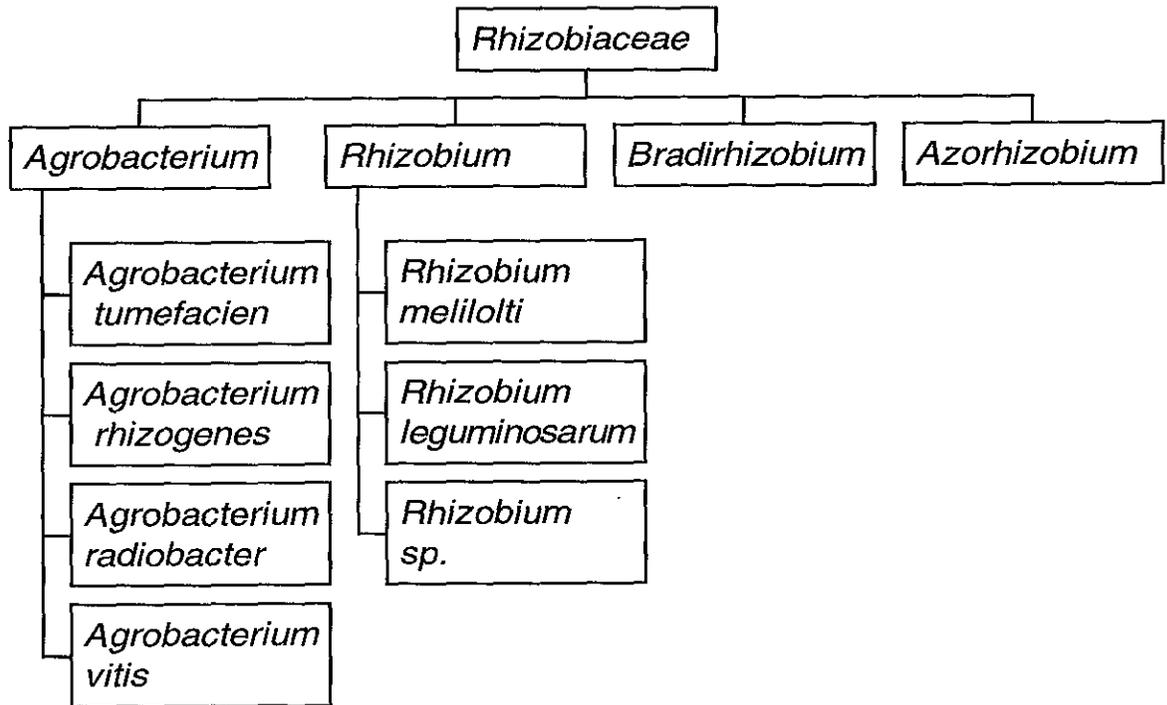
Utilizando la electroforesis CEPGA en *A. tumefaciens* C58 se encontró que esta cepa tiene un cromosoma lineal y uno circular, además de dos megaplásmidos circulares. Ningún otro reporte ha aparecido desde 1994 para poner a prueba los resultados anteriores, ni se ha tratado de comparar otras cepas de *A. tumefaciens*, ni de *A. rhizogenes*. Además no está claro el mecanismo de intercambio de estos replicones entre las diferentes agrobacterias ni se entiende como estos replicones han alcanzado su gran tamaño actual, ni el papel evolutivo que han jugado los replicones independientes para diferenciar al género *Agrobacterium* del género *Rhizobium*, el

cual representa un grupo de organismos simbiotes de suma importancia en los procesos de fijación del nitrógeno (7, 9, 10).

Por su importancia económica desde el punto de vista agronómico; por su carácter fitopatogénico y su utilización en la ingeniería genética en plantas nos interesó conocer y caracterizar la organización genómica del género *Agrobacterium*. Además de su cercanía con otro género, *Rhizobium*, miembros ambos de la familia Rhizobiacea (fig. 1). Queda por demostrar si las características compartidas entre ambos géneros pueden aportar conocimiento de valor genético y taxonómico que explique el posible intercambio de DNA entre éstas y otras bacterias saprofiticas del suelo.

En el presente trabajo se extendió el estudio de la organización genómica de la cepa C58 al estudiar otras cepas de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* mediante la utilización de la electroforesis de campo eléctrico pulsado en geles de agarosa en dos aparatos diferentes.

Figura 1
Situación
Taxonomica
de
Agrobacterium (13)



Objetivo general

Con base en lo anterior el objetivo del presente trabajo fué.

Determinar el tamaño y la forma de los replicones en el genoma de dos especies del género *Agrobacterium* por medio de la electroforesis CEPGA.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar el número y forma de los cromosomas y megaplásmidos presentes en las cepas, enfocándonos preferentemente a la parte cromosomal, para tratar de extender los resultados generados con el previamente reportado con una sola cepa de *A. tumefaciens* la denominada C58C1.
- 2) Comprobar la presencia del megaplásmido críptico en cada una de las cepas bajo estudio y el peso molecular de los distintos megaplásmidos presentes entre las cepas en estudio después de la linealización.
- 3) Obtener los patrones de restricción del DNA cortado con la enzima Swa I y se calcular el peso molecular del DNA genómico de las cuatro cepas de estudio y se compararon nuestros resultados con los previamente reportados en la cepa C58C1

Material y Métodos

Cepas bacterianas utilizadas

Se utilizaron como cepas control por tener un fondo genético de *A. tumefaciens* C58C1 a las cepas de *A. tumefaciens* pRi 1601, pGV 3850 y EHA 105.

Con fines de estudio experimental se usaron a las siguientes cepas:

De *A. tumefaciens* una cepa que fue aislada, como cepa silvestre en un cultivo de jitomate infectado, por miembros del laboratorio de fitopatología del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, la cual denominamos *A. tumefaciens* E.N.C.B. IPN

De *A. rhizogenes* utilizamos las cepas AR 12, A4, pRi 15834 del cepario del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Unidad de Morfología y Funcion de la UNAM Campus Iztacala.

Mantenimiento de las cepas y crecimiento: La cepas fueron mantenidas en medio YEB sólido, resemebrando cada 60 días, dejando en incubación a 28°C durante 48h, y manteniéndolas en el cuarto frío a 4°C hasta una nueva resiembra que se realizó cada 2 meses.

Para la liberación del DNA se tomó una colonia aislada de la cepa seleccionada, y se pasó a 10 ml de medio YEB líquido, y se dejó incubar durante 48 h. hasta que el cultivo tuvo una D.O. (densidad óptica) de 0.8-1.0 leído a 590 nm con lo que se obtiene la concentración de Dna recomendada al final del proceso.

Preparación de bloques de agarosa con el DNA: Para la inclusión de DNA bacteriano total en celdillas o bloques en gel se usó Agarosa de Bajo Punto de Fusión de Sigma (ABPF) como se describe enseguida:

(Técnica de inclusión de DNA de alto peso molecular en celdillas de agarosa BPF.)

1. Se crecieron las células bacterianas por 36 a 48h. en 10 ml de medio YEB en agitadora orbital ajustada a 200 rpm y 28 °C
2. Centrifugar a 8000rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada estabilizada a 4 grados centígrados.
3. Se lavó y resuspendió en 2 ml (la 5ª parte del volumen inicial) de 200mM NaCl, 10mM tris pH 7.2 100mM EDTA, solución A y centrifugó a 400 g por 10 min.
4. Se quitó sobrenadante y agregó 0.5 ml de solución A, se resuspendió e incubó a 37 °C.
5. Se mezclaron las células en volumen igual de agarosa al 2% de bajo punto de fusión estabilizada a 42 °C y se vació en los moldes.
6. Se enfrió la mezcla a 4 °C hasta que gelificaron los bloques (15 minutos aproximadamente)
7. Se sacaron los bloques de agarosa formados y se colocaron en tubos cónicos "Falcon" de 15ml.
8. Incubar con la solución de lisis con lisozima fresca 1 ml. a 37 °C con agitación suave de 2-6h.
9. Quitar la solución de lisis y agregar de 2 a 3 volúmenes de BD con proteinasa K y RNAasa 0.5%
10. Incubar por 1 o 2 días a 50 °C con agitación suave
11. Se puede almacenar muestras a 4 grados centígrados en el buffer de digestión por un corto tiempo.

12. Lavar con solución amortiguadora TE 1X y se almacena a 4°C para evitar degradación por nucleasas contaminantes.

Solución amortiguadora BD (Buffer de Digestión).

Buffer de Digestión	Conc. final 0.5X
EDTA pH 8.0	0.5M
Lauroyl Sarcosina sal sódica (Catalogo Sigma #L5125)	1 %
Proteinasa K	0.5 mg/ml

Solución de lisis para bacterias

Reactivos	Concentración	Sol. Stock	p/preparar 50ml
Tris	10 mM	1 M	0.5 ml
NaCl	50 mM	4 M	0.625 ml
EDTA	100 mM	0.5 M pH 8.0	10.0 ml
Deoxicolato de Sodio	0.2%	Cat Sigma #D6750	0.1 g
Sarcosyl sal Sodica	0.5%	Cat. Sigma #L5125	0.25 g

(Ajustar a pH 7.5)

Aparatos utilizados para la electroforesis CEPGA: Se usaron dos equipos diferentes, un aparato CHEF DR-II producido por la compañía BioRad (No. de Cat. 170-3612). Este equipo presenta seis electrodos distribuidos hexagonalmente en una celda donde se puede colocar uno o dos geles de 12 x 14 cm apilándolos uno sobre otro, y aproximadamente 2.5 lt. de solución

amortiguadora. En este aparato, el campo eléctrico gira 120° periódicamente controlado por una unidad electrónica que regula el tiempo entre cada período. A través del controlador electrónico se puede activar el aparato con un programa de pulsos complejo denominado “ramping” bastante elaborado que consiste en un incremento progresivo y lineal del tiempo entre pulsos. Además puede orientar el patrón de corrida hacia algún lado del gel en vez de dejarlo por el centro como ocurre normalmente con otros equipos (2,4).

El sistema TAFE es también un sistema de corrimiento de campos pulsados homogéneo pero a diferencia del que fue descrito anteriormente. Este sólo está formado por cuatro electrodos los cuales generan dos campos eléctricos que liberan pulsos alternantes en ángulos de 90° en un gel colocado de forma vertical, en una cámara con capacidad para 3.5 lt. de sol. amortiguadora. Al mismo sistema se le puede conectar una computadora convencional con un programa de pulsos, en el caso del que nosotros ocupamos estaba conectado a una computadora 486 marca Acer. Gracias a que no se pierde la memoria de los tiempos de corrimiento real se puede continuar el desarrollo de la corrida aún después de interrupciones de corriente, hasta completar el total del tiempo seleccionado para cada experimento.

Ya que el equipo CHEF es el único que cuenta con la opción de programación ramping, se usó regularmente con una selección de un rango de 90 a 300 seg como se encontró en la bibliografía consultada y que es óptima para lograr la mejor resolución de las bandas del elevado peso molecular de los cromosomas y los megaplásmidos linealizados de manera semejante a como se ha reportado en otras especies bacterianas (19, 4).

Linealización del DNA. Se usaron dos métodos para linealizar los replicones circulares cerrados incluidos en los bloques de agarosa:

i) Irradiación con rayos gama. Para realizar la ruptura de los enlaces fosfodiéster del DNA se ocupó la energía de la radiación gama emitida por la desintegración del ^{137}Cs de un aparato Gamacell. Se usó un intervalo de radiación en los bloques del DNA de entre 1-4 Krads para tratar de optimizar la intensidad más apropiada en el rompimiento único en cada una de las hebras de la doble cadena del DNA. Se seleccionó éste intervalo con la finalidad de encontrar la energía más conveniente para inducir rompimientos únicos en la doble cadena y para obtener la linealización de los replicones circulares covalentemente cerrados. Fue necesario la optimización para evitar la sobredosis y el obtener una fragmentación excesiva y la consiguiente aparición de múltiples bandas (19). El equipo Gammacell 1000 elite de la compañía Nordion que nos fue permitido usar para irradiar nuestros bloques de DNA se encuentra en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

ii) Tratamiento con S 1. Esta enzima la nucleasa S 1 (Boehringer) actúa sobre el DNA de cadena única lo que la hace ideal para su uso en material genético superenrollado como son plásmidos de peso molecular elevado. La linealización de estos elementos genéticos se efectúa por cortes de la doble cadena con muy poco grado de especificidad en cuanto a reconocimiento de secuencias (2).

Para la utilización de la enzima S I se realizó el siguiente protocolo

1. Se lavó el material con 1 volumen de Tris HCl 100mM pH 7.5 por 10 min. con agitación suave.
2. Decantar.
3. Repetir el paso 1.
4. Se lavó una vez mas con bufer para enzima S1 durante 10 min. con agitación suave.
5. Decantar.
6. Agregar 1 volumen del bufer de lisis y una alícuota de 5 µl de enzima S1.
7. Incubar a 4°C por 8 hr.
8. Incubar a 37°C por 2 hr.
9. Parar la reacción con bufer TE 1X y dejar los bloques tratados con la enzima en éste mismo buffer a 4°C hasta el momento de ser usados.

Restricción del DNA de los bloques.

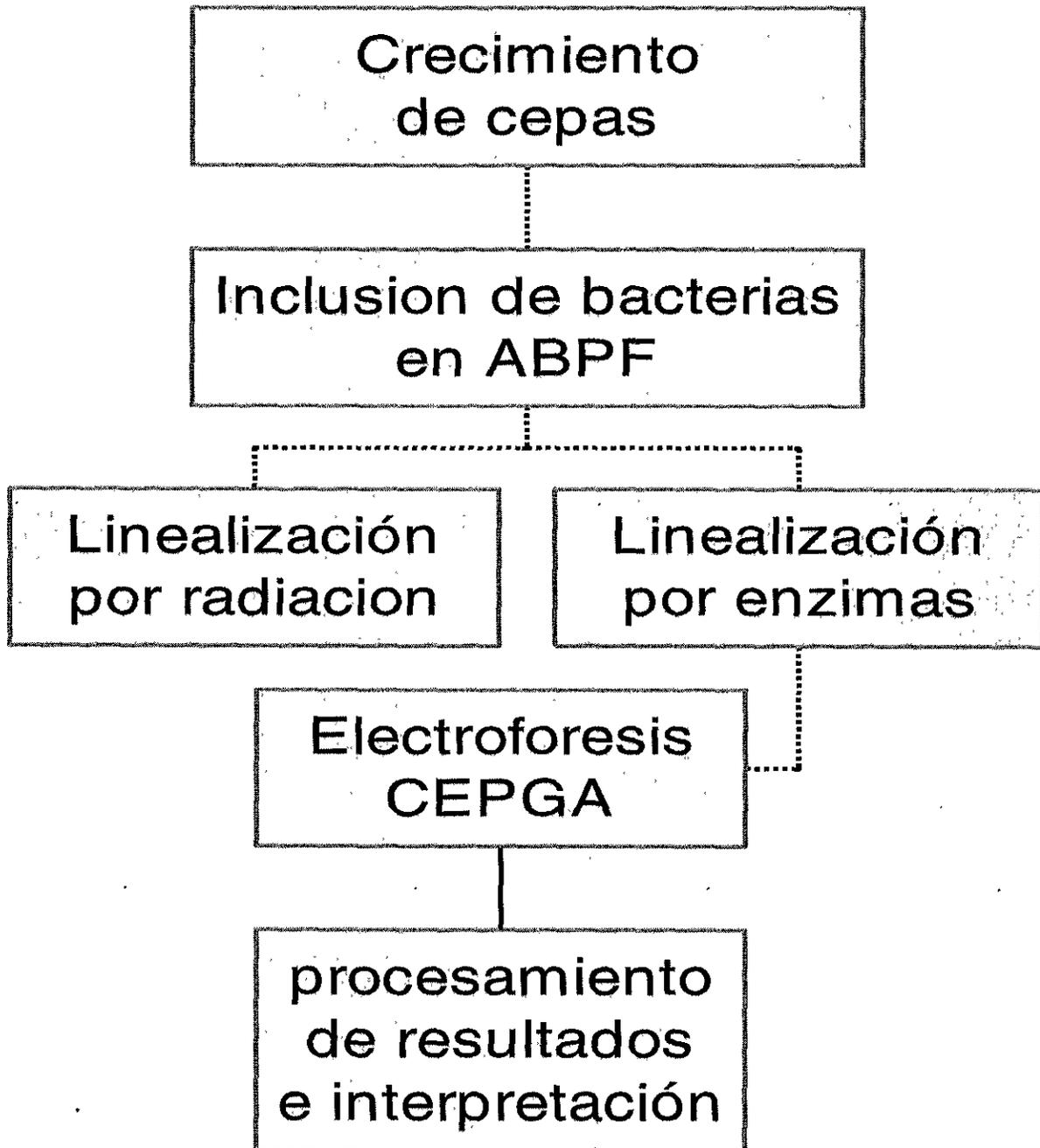
Restricción enzimática. Para esta técnica se utilizaron enzimas de restricción con reconocimiento de sitios específicos de hexanucleótidos (Eco RI y Hin DIII) y octanucleótidos como la SmaI (Boehringer).

Como ya se ha mencionado se tuvo la necesidad de usar una alícuota de enzima muy concentrada (40 U/µl) por largo tiempo para que esta pudiese cortar el material genético de los bloques de agarosa:

Se tomó un trozo pequeño de agarosa, de aproximadamente 2 x 5mm, y se lavó tres veces con Tris HCl 100 mM a pH 7.5 para eliminar el buffer TE, ya que el EDTA del amortiguador se une al Mg^{++} del buffer de restricción inhibiendo la acción de las enzimas.

Se usó 2 μ l. de enzima en 100 μ l. de buffer con un trozo de la agarosa con el DNA, se dejó incubar a 4°C durante 8h para que la enzima difundiera en la agarosa, después un periodo de digestión de 8h a 36 °C, y nuevamente se puso una alícuota de 2 μ l. de enzima dejando 8h a 4°C y 8h a 36 °C nuevamente

Figura 2
diagrama de flujo



Resultados y Discusión

Corridas sin tratamientos.

- Tiempos de corrida y agotamiento del buffer.

En las primeras electroforesis usamos tiempos de corrida de 24-48h y ocasionalmente de 72h. Para optimizar recursos se decidió reciclar el buffer usado en corridas anteriores en una proporción de 1:1 v/v amortiguador fresco/usado para los corrimientos del DNA. Se puede ver en las figs. (4, 5) con y sin reciclamiento respectivamente que la separación del DNA no se ve afectada por el reciclamiento del amortiguador usado en una sola ocasión.

Geles sin tratamientos. En éste primer grupo de geles se intentó hacer una caracterización como fase inicial de las muestras de DNA de las cepas que teníamos en el laboratorio, y adicionalmente se probaron diversas condiciones de corrimiento en los equipos CHEF II y TAFE variando el tiempo entre pulsos y voltaje.

En la mayoría de los geles (fig. 3, 4, 5,) pudimos observar dos bandas que aparecen muy juntas en una formación poco común para las bandas de DNA. Estas se presentan en forma de trapecoide y en ellos se pueden observar en las muestras menos cargadas que se componen de una banda bien definida en la posición más lejana al origen y abajo está una banda más tenue y pesada que corresponde al cromosoma circular. La linearización del mismo probablemente se deba al rompimiento de una pequeña fracción durante el manejo y la liberación del DNA de las

células

En Kpb

1 2 3 4 5

3000
2100

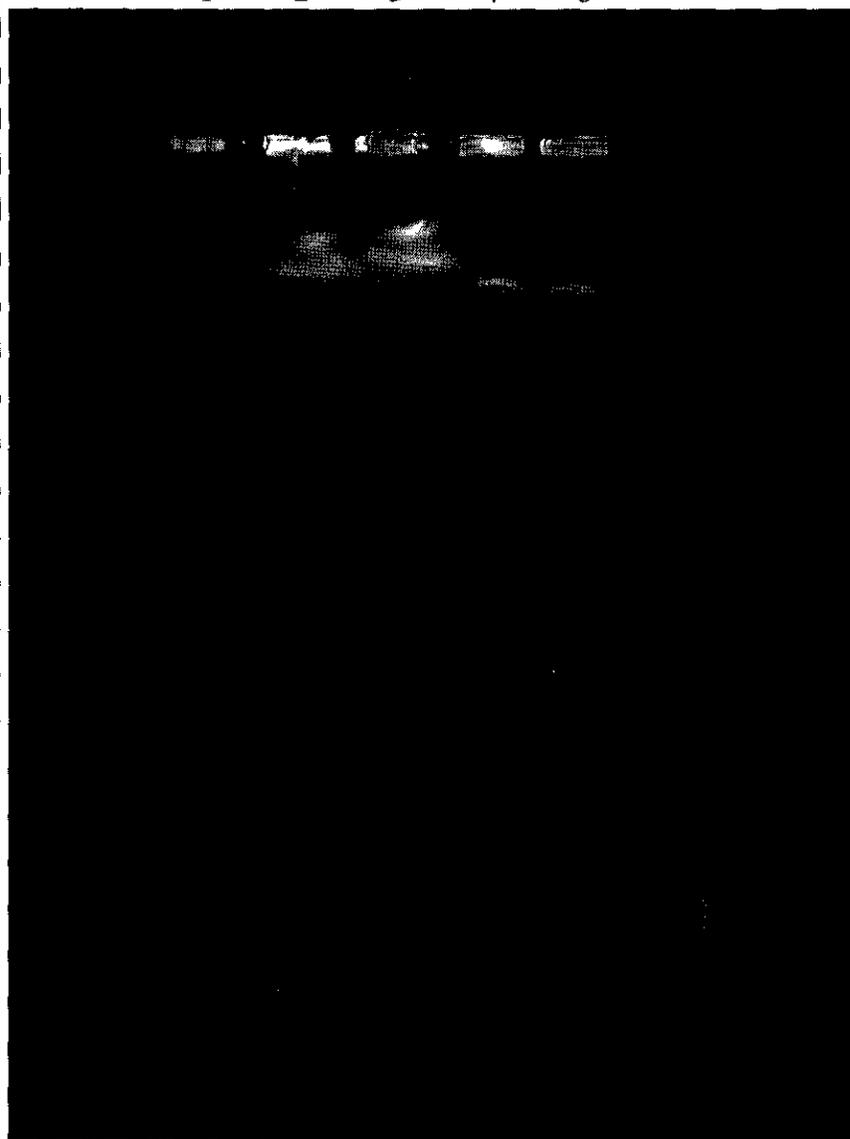


Figura 3. Electroforesis en equipo CHEF, muestras sin tratamiento. Electroforesis en sistema CHEF-DR II con duración de 24h a 180v con intervalo entre pulsos de 45 s en agarosa de baja electroendosmosis al 0.8%. Marcador cromosomas de *S. pombe* (carril 1) DNA sin tratamiento de las cepas: *A. tumefaciens* PGV 3850, *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. rizhogenes* pRi 15834, *A. tumefaciens* ENCB carriles 2, 3, 4, 5 respectivamente.

En Kpb

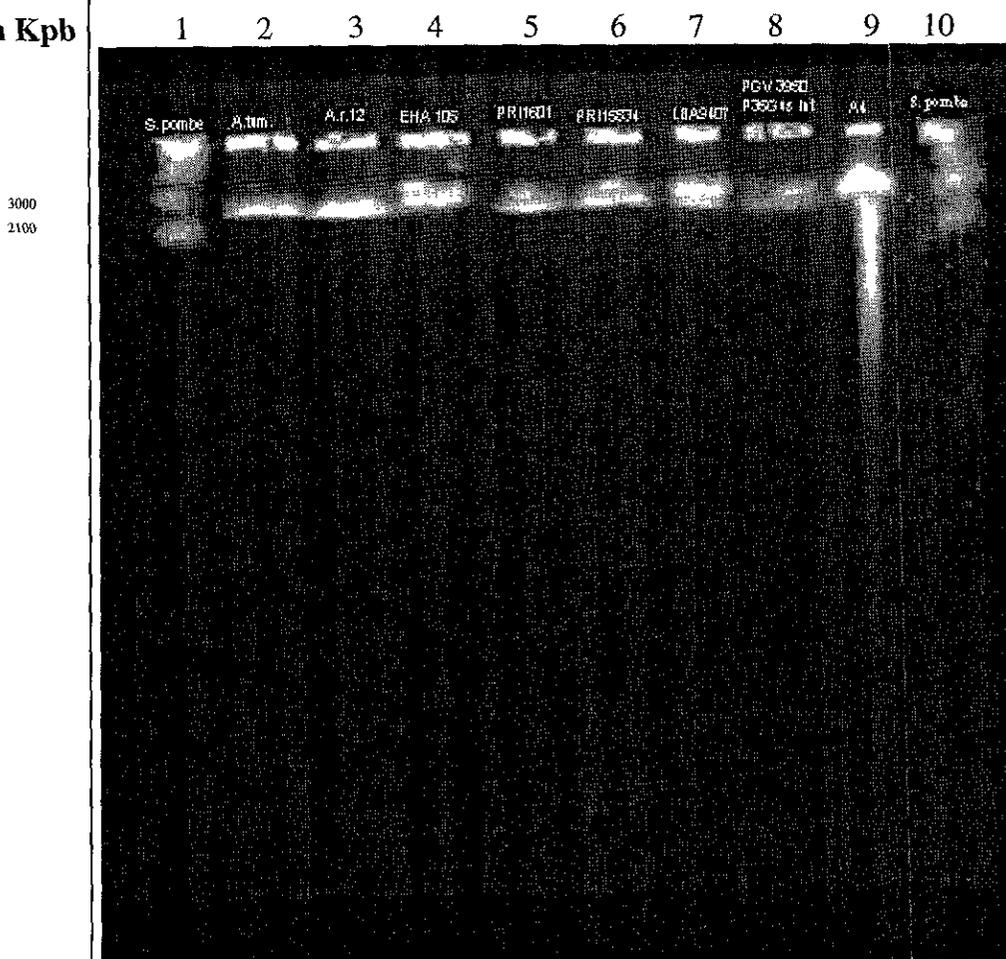


Figura 4. Electroforesis en equipo CHEF, muestras sin tratamiento con agarosa de grado cromosomal. Electroforesis en sistema CHEF-DR II con duración de 48h a 150v Intervalo entre pulsos ramping 90 a 300 s en agarosa grado cromosomal al 0.8%. Marcador cromosomas de *S. pombe* (carriles 1 y 10) DNA sin tratamiento de las cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* AR12, *A. tumefaciens* EHA 105, *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. rizhogenes* pRi 15834, *A. rizhogenes* LBA 9402, *A. tumefaciens* PGV 3850, *A. rizhogenes* A4, carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 respectivamente.

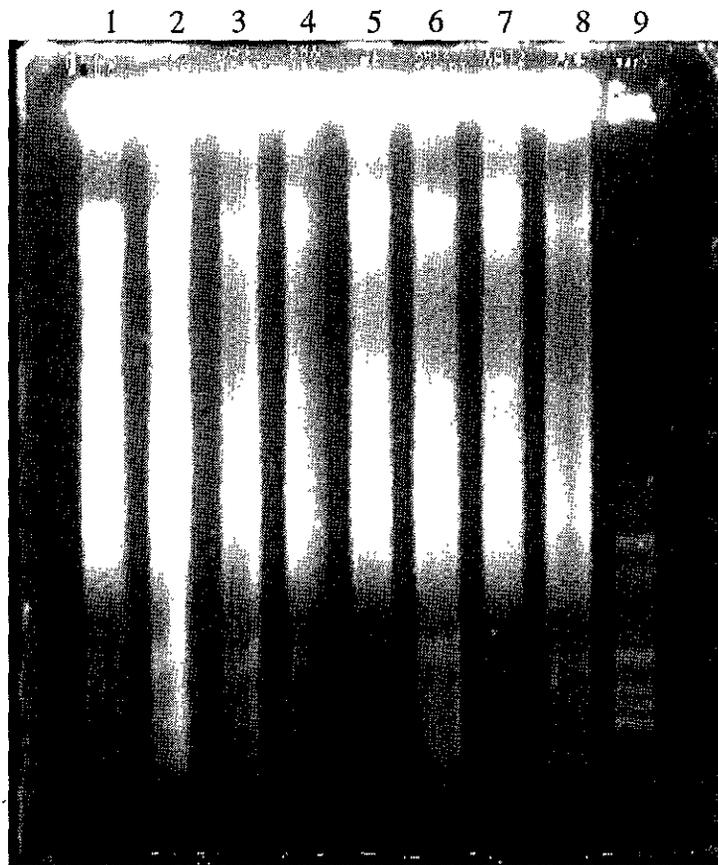


Figura 5 Electroforesis en equipo TAFE, muestras no tratadas, y tratadas con enzima Eco R1. 48 h; 120 v; agarosa de baja electroendosmosis 1%; 3 pulsos 1° 75 s 16 h, 2° 150 s 16 h, 3° 300s 16 h Marcador cromosomas de *S. cereviceae* (carril 9) DNA sin tratamiento de las cepas: *A. rizhogenes* LBA 9402, *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. tumefaciens* EHA 105, *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* AR12, *A. rizhogenes* A4, carriles 1, 3, 4, 5, 7, 8 respectivamente; DNA tratado con la enzima de restriccion Eco R1 de las cepas: *A. rizhogenes* LBA 9402, *A. rizhogenes* AR12, carriles 2 y 6 respectivamente.

embebidas en la agarosa. O tal vez a los cortes únicos en la doble cadena que se generaron por el voltaje aplicado durante la corrida. Esta banda es la responsable de la observación de una figura con forma de trapecoide, pues en su punto más cercano al origen es estrecha, y debido a la escasa separación de ambas bandas dan una apariencia de ésta figura geométrica.

Se puede observar en las fotografías de las primeras corridas (figs. 3, 4, 5) que no fue posible observar en ningún caso la aparición de bandas correspondientes a los plásmidos circulares cerrados covalentemente que tienen cada una de las cepas estudiadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros grupos que han utilizado la electroforesis CEPGA y nos indica que no puede separar plásmidos circulares cerrados de pesos moleculares superiores a los 50,000 pb, ya que éstos no entran al gel y se quedan en el pozo de aplicación (26, 20). La ausencia de los plásmidos en el gel se debe a la conformación tridimensional de estos como replicones circulares, ya que por ser moléculas circulares cerradas y con superenrollamiento que les confiere una conformación muy ovillada y con esta estructura tridimensional es difícil que entren a los poros de la matriz de la agarosa.

Se intentó desde el inicio la optimización de los parámetros de corrimiento por lo que se fijaron las mismas condiciones de corrimiento que se indican en el manual de usuario del aparato, y las previamente reportadas por Allardet Servent et al., (1) ya que coincidimos con estos investigadores en la utilización del mismo aparato (CHEF-DR II Biorad) para realizar una parte del presente estudio. Con las primeras condiciones obtuvimos los mejores resultados para la electroforesis en un tiempo total de 48h., con un intervalo de tiempo entre pulsos que va de los

90s al principio de la corrida los 300s al final, variando el intervalo en forma gradual y constante durante el tiempo que dura la electroforesis por medio del incremento lineal del tiempo (ramping). Casi la totalidad de los investigadores del mismo campo coinciden en recomendar como una condición óptima el hacer las corridas entre 10 y 13 °C. Como el equipo CHEF utilizado carece de refrigerante decidimos utilizar el sistema en el cuarto frío con una temperatura de 4°C y tratando de mantener entre 10 y 13° C la temperatura del amortiguador.

En Los primeros resultados que obtuvimos con esta técnica de electroforesis en varias cepas de *Agrobacterium* se trató de probar a las muestras de DNA de cepas con fondo celular de *A. tumefaciens* C58C1 (fig. 3). El propósito fue saber si podíamos obtener el mismo resultado que presentaron previamente Allardet Servent et al., (1). En el trabajo referido se probaron diferentes condiciones de corrimiento con respecto al intervalo de tiempo utilizado con el fin de optimizar la separación de las bandas de DNA intacto y restringido con endonucleasas.

Lo más notorio de esta figura es la similitud de nuestros resultados con los encontrados por Allardet Servent et al., (1), y la manera en que las distintas modificaciones afectan el desarrollo de la corrida. Encontramos además que las condiciones que afectan de manera más significativa la definición de las bandas son el tiempo total de la corrida y el incremento lineal de cambio del tiempo inicial y final entre los pulsos aplicados durante la corrida (ramping). Con la utilización del “ramping” se obtuvo una zona de definición óptima más amplia en casi todo lo largo del gel, lo cual fue idóneo para los fines del proyecto donde se pretendió obtener la separación máxima entre los cromosomas y los megaplásmidos.

Comparación del corrimiento de los DNAs con diferentes agarosas.

En éste experimento quisimos comparar los resultados obtenidos en agarosa con alto grado de pureza para electroforesis convencional contra los que se obtuvieron con agarosa grado cromosomal según señalan las recomendaciones de las compañías que fabrican reactivos para el trabajo en Biología Molecular y que especifican únicamente en éste tipo de agarosa para la óptima separación de los marcadores de peso molecular, como los cromosomas de levaduras durante la electroforesis CEPGA. Suponíamos que las diferencias en la composición y/o gelificación entre las agarosas de alguna manera podrían influir en el corrimiento de las bandas de DNA cromosomal de nuestras muestras, ya que al inicio del proyecto estábamos preocupados por la mala resolución de las bandas cromosomales que obteníamos a causa del uso inapropiado de agarosa para la electroforesis convencional, en vez de usar agarosa de grado cromosomal, recomendada para la electroforesis de campos eléctricos pulsados. Por lo cual decidimos correr algunos geles con agarosa grado cromosomal y que de acuerdo a los protocolos encontrados en la mayoría de los artículos donde se ha reportado el uso de la electroforesis CEPGA solo se describe el uso de la agarosa específica para este tipo de trabajo.

Se trató de usar muestras con una concentración de DNA similar, como se puede observar en la fig. (4). Es evidente de nuevo que en el gel preparado con agarosa de grado DNA cromosomal no fuimos capaces de mejorar la resolución de las bandas y resultaron similares a los patrones de corrimiento del DNA obtenidos en geles de agarosa convencional. En ambos tipos de geles puede observarse que bastante material genético permaneció en los pozos de aplicación, y

el corrimiento de las bandas del marcador de peso molecular es muy similar en ambos. La similitud en la migración de los DNA's en las diferentes corridas (figs. 3 y 4), nos indicaron claramente que la agarosa para electroforesis convencional utilizada para los experimentos iniciales tenia características equiparables a la agarosa de grado cromosomal. Por lo tanto y debido a la diferencia en costos entre las agarosas para geles convencionales y la para la electroforesis CEPGA se prefirió usar la primera en toda la experimentación realizada. Por lo cual se uso indistintamente ambos tipos de agarosa a través de todo el estudio realizado y de preferencia la agarosa para electroforesis convencional.

Mediante un análisis cuidadoso de cada gel hemos comprobado que realizamos una selección adecuada de parámetros de corrimiento en los geles para la electroforesis CEPGA porque pudimos obtener perfectamente las tres fases que se han reportado deben desarrollarse en los geles de agarosa, cuando hay una buena selección de los mismos.

Linealizaciones del DNA. Debido a que no se obtuvieron resultados convincentes de la existencia o no de los dos cromosomas y la presencia de los plásmidos para cada una de las muestras de las cepas en estudio, se procedió a aplicar dos diferentes procedimientos de linealización del DNA de alto peso molecular embebido en agarosa para poder observar más claramente la existencia de los cromosomas en éste grupo de bacterias y así lograr obtener un patrón de bandas que nos permitiera comparar nuestros resultados con el previamente reportado por el grupo francés (1).

Linealización por radiación. Allardet Servent et al., (1), reportaron la utilización de rayos X para la linealización del DNA del cromosoma circular de *A. tumefaciens* C58C1. Este grupo francés encontró que la aplicación de rayos X con una emisión de 4krad de radiación e intensidad de 6Mev era la óptima para la linealización del DNA circular (1). Según los cálculos realizados de nuestra previa experiencia radiológica creemos que dicha intensidad es más que suficiente para atravesar las paredes de plástico de los tubos donde se encontraban las muestras, así como también el buffer y la matriz de agarosa. Indagando las especificaciones técnicas de varios aparatos de emisión de rayos X nos dimos cuenta de que para alcanzar la intensidad que se había reportado, sólo se obtendría si se usaba un sistema de bombardeo lineal como el que se utiliza para el tratamiento del cáncer. Por lo cual tener acceso un equipo con las características mencionadas en México sería muy difícil de conseguir para ser utilizado con fines de experimentación. Así que se decidió usar una fuente de radiación alternativa del equipo Gama Cell con fuente de ^{137}Cs con una intensidad de 5Mev que emite radiación gama. Al hacer los cálculos se encontró que esta intensidad era más que suficiente para que la radiación llegase a la muestra, aunque tuvimos que corroborar lo anterior experimentalmente.

Aunque al principio, al tratar de seguir al pie de la letra la metodología del trabajo de Allardet Servent et al., (1) se sometieron nuestros bloques de agarosa con las muestras a una radiación de 4krad de rayos gama. Al someter el DNA a corrimiento en geles de agarosa nos percatamos de que el tratamiento fue excesivo ya que no se observaron bandas definidas, sino un barrido a lo largo del gel (fig. 6) *A. tumefaciens* pRi 1601 4Krad, *A. rizhogenes* AR12 4Krad y *A. rizhogenes* A4 4Krad, carriles 3, 7, 9. Por esta razón dedujimos que el tratamiento fue demasiado

intenso promoviéndose la degradación excesiva del DNA de acuerdo a los fines fijados desde el inicio. Por lo tanto tuvimos que experimentar con otras cantidades de radiación de menor intensidad; 1 y 2 krad y encontramos que la más favorable para obtener rompimientos únicos en la doble cadena para linealizar el DNA circular, fueron las muestras tratadas con 2 krad (fig. 6) *A. tumefaciens* pRi 1601 carriles 1 y 2; *A. rhizogenes* AR12 carriles 5 y 6; y *A. rhizogenes* A4 carriles 8 y 10.

En las fig. (7 y 8) se puede observar en el carril 2 esta cargado el DNA de la cepa ENCB con un tratamiento de 2 krad. se obtuvieron bandas claramente definidas, y partiendo de origen tenemos primero una banda muy pesada de alrededor de 3.0 mpb, la siguiente banda es muy gruesa y corresponde a los 2.1 mpb, y finalmente tenemos una banda correspondiente a un megaplásmido de 450 kpb. La fotografía que se tomó después de las 20 h aparecen 3 bandas también, pero en realidad aparece una o quizás dos bandas nuevas de bajo peso molecular y aún no es suficiente tiempo para que entrará la banda de 3.0 mpb. También se puede observar en el 3er carril DNA de la cepa LBA 9402 tratada con 2 krad. Pueden apreciarse 4 bandas, aunque la banda de 3 mpb no se ve muy bien definida, nuevamente tenemos una banda de 2.1 mpb muy marcada, y 2 bandas de megaplásmidos de 530 kpb y 400 kpb. Después de 20 h en éste carril sólo se ve una banda, la de 2.1 mpb. La cepa *A. rhizogenes* A4 con tratamiento de 2 krad (fig. 8), aparecen por lo menos 2 bandas bien definidas y una tercera, que no se ve del todo clara, la banda que se ve muy poco es de 3.0 mpb, la siguiente es la banda de 2.1 mpb, y finalmente una banda de un megaplásmido de tamaño 335 kpb.

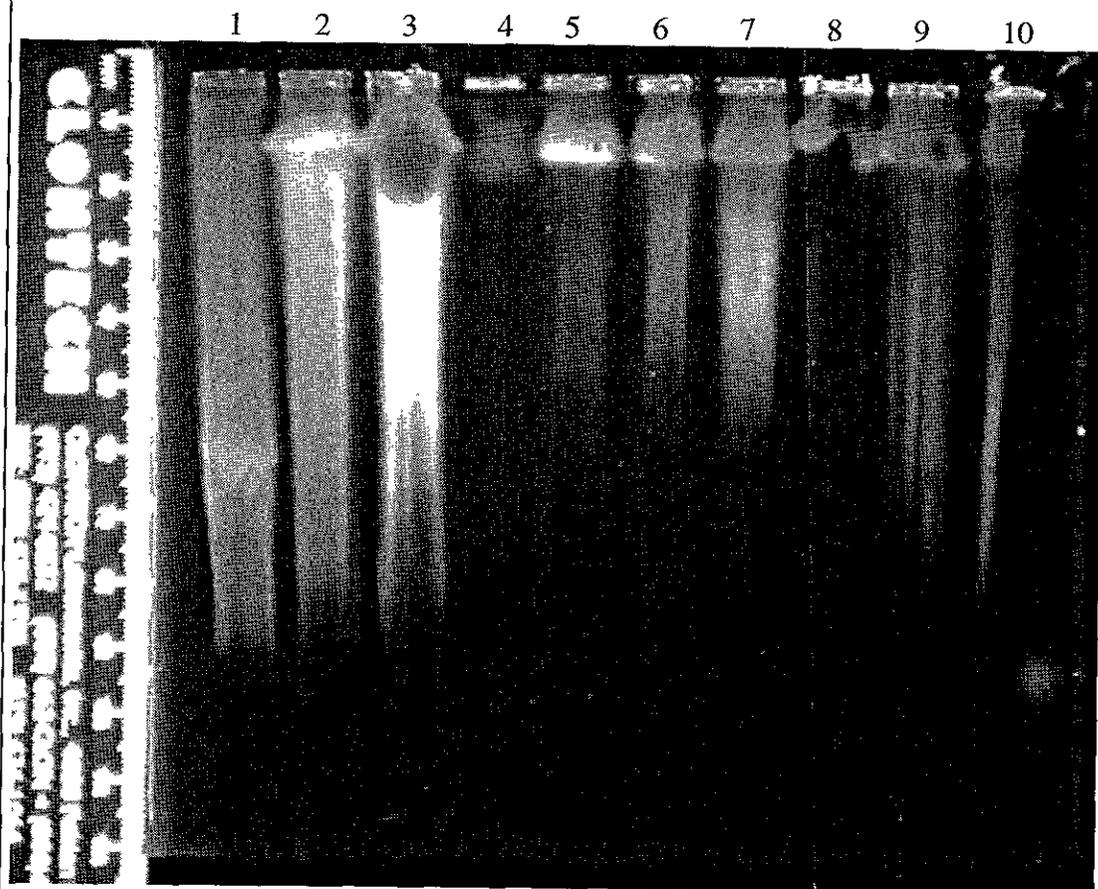


Figura 6. Electroforesis en equipo CHEF, muestras tratadas con radiación. con 48 h, 150v, ramping 90 a 300 seg, Agarosa de baja electroendosmosis 1.0% Marcador cromosomas de *S. pombe* (carril 4) DNA tratado con 1 Krad de las cepas: *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. rizhogenes* AR12, *A. rizhogenes* A4, carriles 1, 5, 10 respectivamente. DNA tratado con 2 Krad de las cepas: *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. rizhogenes* AR12, *A. rizhogenes* A4, carriles 2, 6, 8 respectivamente. DNA tratado con 4 Krad de las cepas: *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. rizhogenes* AR12, *A. rizhogenes* A4, carriles 3, 7, 9 respectivamente.

en Kpb

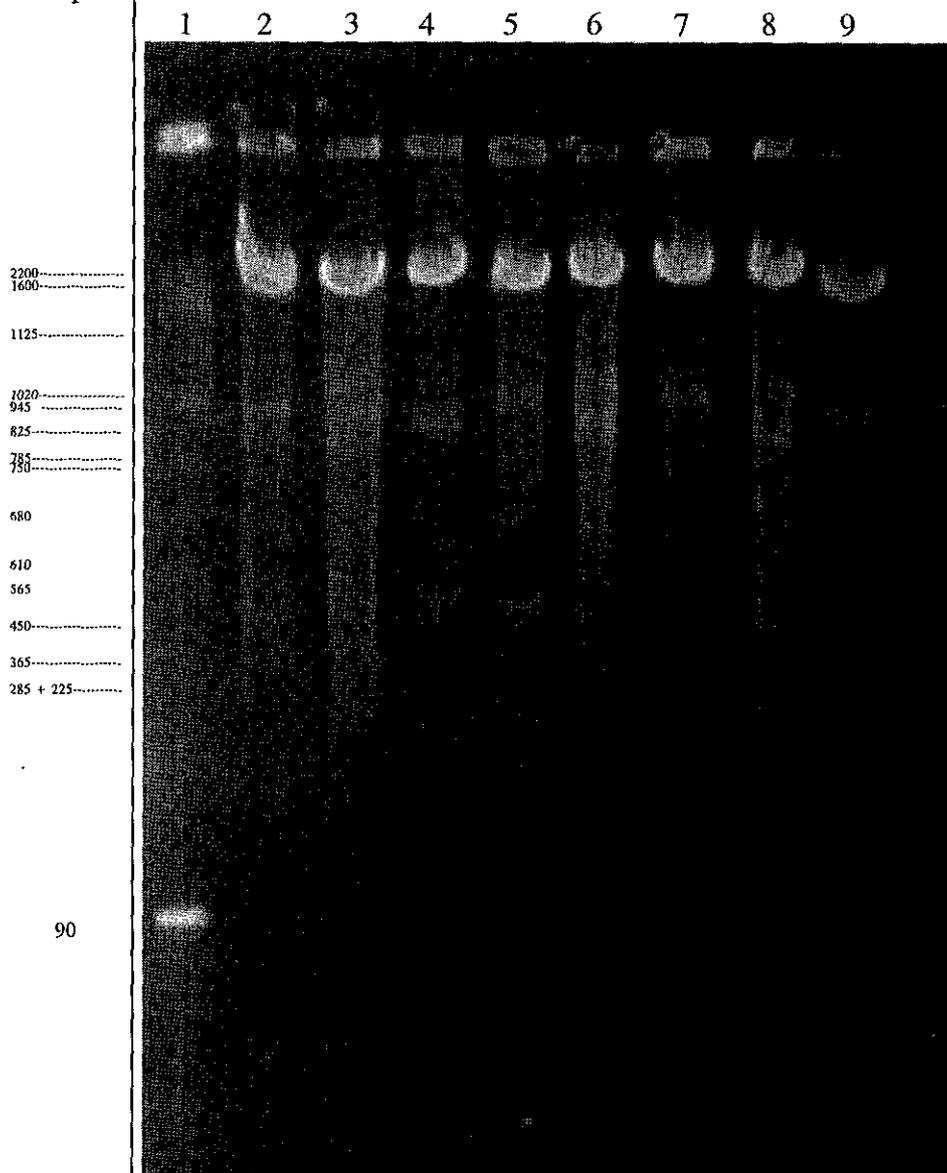


Figura 7. Electroforesis de 20 h en equipo TAFE, muestras tratadas con radiación y con la enzima Swa 1 con 32 h de tratamiento. Electroforesis de 45 h, 150v, 7 pulsos: 1° 10s X 5h; 2° 20s X 5h; 3° 30s X 5h; 4° 60s X 5h, Agarosa de baja electroendosmosis 1.0% Marcador cromosomas de *S. cereviceae* (carril 1) DNA tratado con 2 Krad cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* LBA 9402, *A. rizhogenes* A4, carriles 2, 3, 9 respectivamente. DNA tratado con enzima Swa 1 cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. tumefaciens* EHA 105, *A. rizhogenes* A4, *A. rizhogenes* AR12, *A. rizhogenes* LBA 9402, carriles 4, 5, 6 ,7, 8 respectivamente.

en Kpb

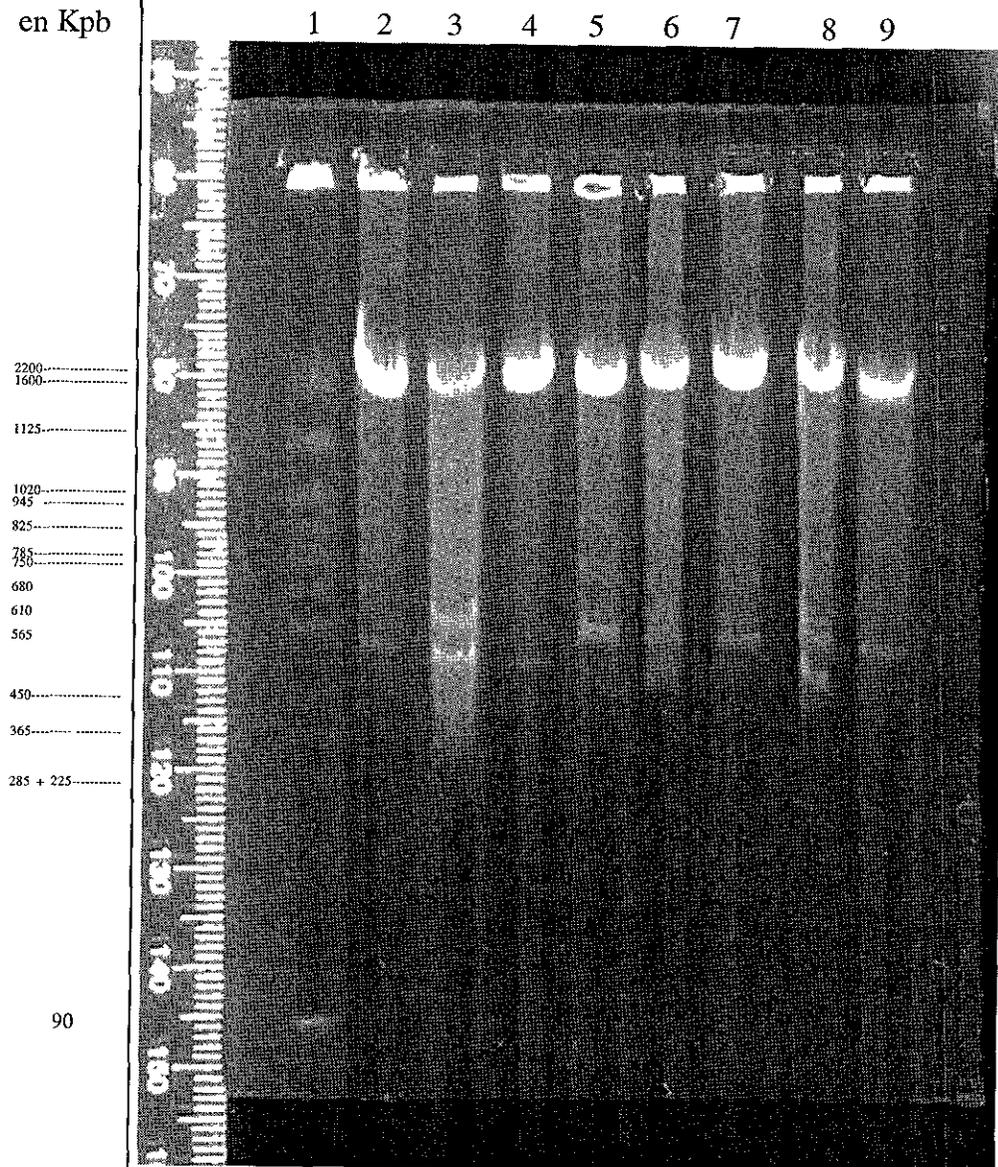


Figura 8. Electroforesis de 45 h en equipo TAFE, muestras tratadas con la enzima Swa 1 y con radiación con 32 h de tratamiento. Electroforesis de 45 h, 150v, 7 pulsos: 1° 10s X 5h; 2° 20s X 5h; 3° 30s X 5h; 4° 60s X 5h; 5° 90s X 5h; 6° 120s X 5h; 7° 150s 5h., Agarosa de baja electroendosmósis 1.0% Marcador cromosomas *Sacaromices cereviceae* (carril 1) DNA tratado con 2 Krad cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizophogenes* LBA 9402, *A. rizophogenes* A4, carriles 2, 3, 9 respectivamente. DNA tratado con enzima Swa 1 cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. tumefaciens* EHA 105, *A. rizophogenes* A4, *A. rizophogenes* AR12, *A. rizophogenes* LBA 9402, carriles 4, 5, 6, 7, 8 respectivamente.

Posterior a la optimización de radiación gama aplicada a los bloques de DNA y que correspondió a los 2 Krad, pudimos observar la aparición clara de al menos 2 plásmidos en todas las muestras y muy específicamente se observó también la aparición de un tercer plásmido en las cepas ENCB y A4 (fig 6). La única explicación que tenemos actualmente para éste resultado inesperado es la presencia de cointegrados de los plásmidos pRi y críptico, en las cepas A4 y pRi 15834, como lo han reportado previamente otros investigadores. Hasta ahora no tenemos una explicación que justifique el porque se da la aparición de este tercer plásmido sólo en algunas cepas y no en todas las agrobacterias estudiadas, ya que muy probablemente en todas las cepas existan secuencias repetidas como transposones y secuencias de inserción sobre ambos replicones, lo que resulta en igual posibilidad de formar cointegrados en cada una las cepas o puede tratarse de algún tipo de artefacto generado por los tratamientos aplicados.

También se observan dos bandas correspondientes a los cromosomas en cada cepa, y los pesos moleculares son muy parecidos en todas ellas. Además, fueron muy similares a los de la cepa C58C1 (fig. 6) *A. tumefaciens* pRi 1601 carril 2; *A. rizhogenes* AR12 carriles 5 y 6. Sin embargo se ha reportado que dependiendo de la concentración de DNA en la muestra los pesos moleculares obtenidos a partir de la distancia de migración de las bandas, pueden variar por sobrecargar la capacidad de resolución del gel, siempre y cuando no se esté en la zona I o de compresión (5).

Pensamos que la diferencia entre la cantidad de radiación que usaron Allardet y cols y la que nosotros encontramos experimentalmente como más adecuada para la linealización del DNA

se debe a que la radiación γ es más ionizante debido a que la fuente que nosotros usamos emite rayos que provocan efecto Compton y efecto fotoeléctrico. Por lo que obtenemos multiplicidad de efectos y esto ocasiona que cada unidad de energía en los rayos gamma pueda causar el doble o triple del daño que ocasionan los rayos X los cuales sólo logran el efecto fotoeléctrico debido a las características físicas de su fuente emisora.

En cuanto a los resultados que obtuvimos con esta técnica puede mencionarse que en cierto modo fueron los esperados en cuanto a que fuimos capaces de encontrar la radiación adecuada para la linealización del cromosoma circular y los megaplásmidos. Aunque está la situación de resultados un poco diferentes en algunos casos debido principalmente a la diferente concentración del DNA en las muestras, que resultó en algunos casos en una movilidad un poco anormal de las bandas.

b) Linealización por medio de la endonucleasa S1. A pesar de haber logrado la linealización de nuestros replicones circulares con irradiación gamma, quisimos corroborar nuestros resultados e intentamos otro método de linealización de nuestros replicones circulares. Se intentó comprobar si el método de digestión controlada con la nucleasa S1 era útil para la linealización de genóforos bacterianos circulares cerrados covalentemente, ya que el método de linealización con la endonucleasa S1 se había usado con éxito para plásmidos circulares cerrados de mediano peso molecular y megaplásmidos circulares incluidos en bloques de agarosa. Hasta donde sabíamos esta técnica no se había intentado utilizar para la linealización de moléculas de cromosomas circulares.

Los resultados que obtuvimos por éste método de linealización no fueron muy alentadores o favorables para el DNA del cromosoma circular (fig. 9) *A. tumefaciens* pRi 1601 S1 carril 7 y *A. tumefaciens* EHA 105 carril 8. Sin embargo éste tratamiento sí parece haber funcionado para los megaplásmidos en las mismas muestras ya que se pueden observar la aparición de bandas de pesos moleculares menores a las 500kpb por lo que podemos deducir se trata de las bandas de plásmidos crípticos, pTi y pRi linealizados por el tratamiento. Una posible explicación para la falta de susceptibilidad al tratamiento con S1 para linealizar nuestros cromosomas se puede deber a posibles diferencias en la conformación espacial entre las moléculas de DNA circular del cromosoma al ser liberado durante la lisis bacteriana en los bloques de agarosa y los plásmidos. Esto impediría la formación con igual facilidad las regiones de cadena sencilla que parecen ser los sitios que reconoce y corta la enzima S1 (2), ó también podría interpretarse como una falta de liberación completa de las proteínas asociadas al DNA cromosomal por lo que los posibles sitios de corte para enzima no se forman espontáneamente en el cromosoma durante las condiciones usadas para el ensayo.

Electroforesis con el sistema TAFE. Poco tiempo después del inicio del proyecto se presentó la oportunidad de realizar las electroforesis en otro sistema de geles de campos pulsados, el sistema denominado TAFE de Beckman. Ante la oportunidad de poder comparar los corrimientos logrados en el sistema CHEF II se realizaron corrimientos de algunas muestras seleccionadas tanto no irradiadas como irradiadas con éste sistema. Como se puede apreciar en las fig. (5, 10 y 11) el corrimiento de nuestras muestras en éste sistema se obtuvieron mejores

en Kpb

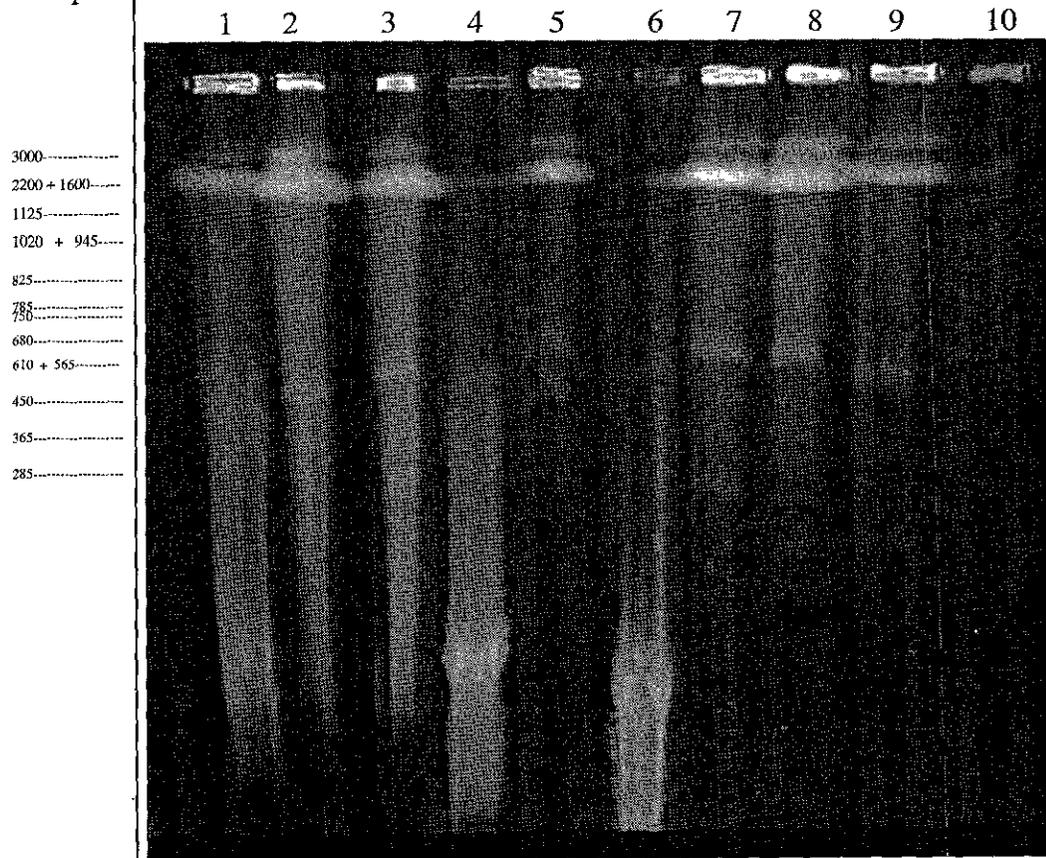


Figura 9. Electroforesis en equipo CHEF, muestras tratadas con la enzima de restricción Hin DIII. y endonucleasa S1. Electroforesis de 35 h, 170 v, 2 pulsos: 1er pulso 15h. con ramping de 10 a 30 s; 2do pulso 30h. con ramping de 90 a 150 s Agarosa de baja electroendosmosis 1.0% Marcador cromosomas de *S. cereviceae* (carril 10) DNA sin tratamiento cepas: *A. rizophogenes* A4, *A. tumefaciens* ENCB, carriles 5 y 9 respectivamente. DNA tratado con enzima Hin DIII cepas: *A. rizophogenes* LBA 9402, *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizophogenes* A4, *A. tumefaciens* pRi 1606, *A. tumefaciens* EHA 105 carriles 1, 2, 3, 4, 6 respectivamente. DNA tratado con enzima S1 cepas: *A. tumefaciens* pRi 1606, *A. tumefaciens* EHA 105, carriles 7 y 8 respectivamente.

en Kpb

1 2 3 4 5 6 7 8 9

2200-----
1600 + 1125-----
1020-----
945-----
825-----
785 + 750-----
680-----
610-----
565-----

450

365
285
225

90

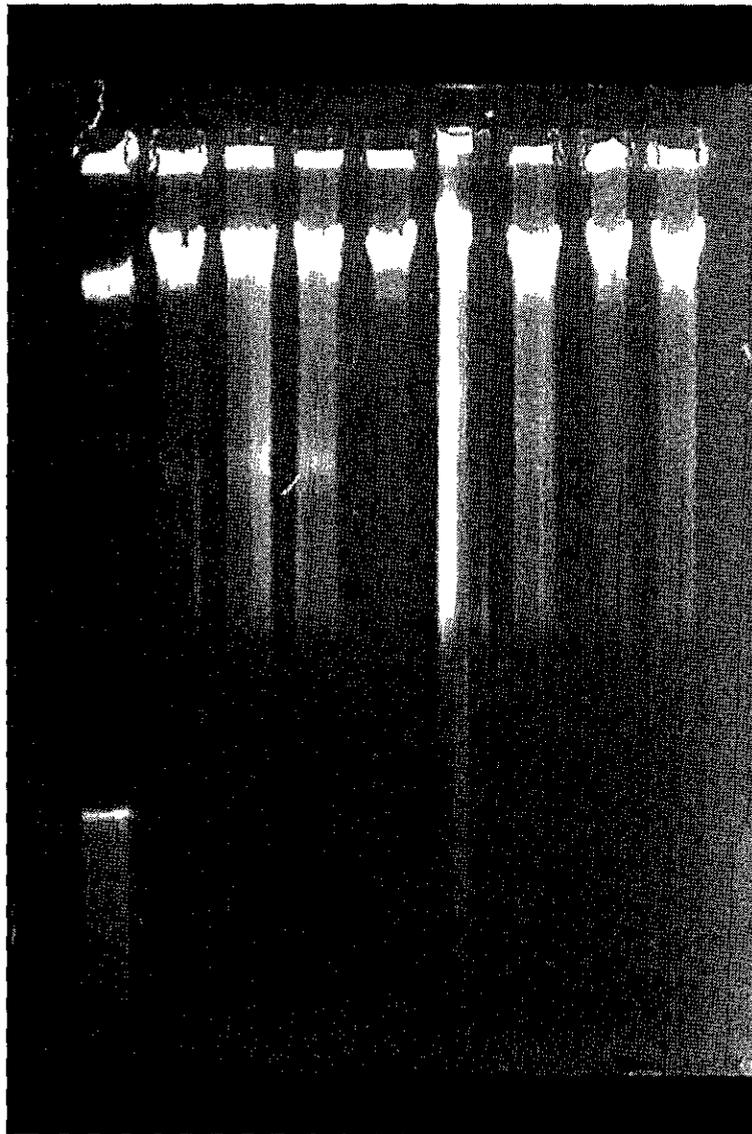


Figura 10 Electroforesis de 20 h en equipo TAFE, muestras sin tratar, tratadas con la enzima Swa 1 y con Eco R1. con 8 h de tratamiento. Electroforesis de 20 h, 150v, 4 pulsos: 1° 10s X 5h; 2° 20s X 5h; 3° 30s X 5h, 4° 60s X 5h, Agarosa de baja electroendosmosis 1.0% Marcador cromosomas de *S. cereviceae* (carril 1) DNA sin tratamiento cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* A4, *A. rizhogenes* LBA 9402, carriles 2, 5, 8 respectivamente. DNA tratado con enzima Eco R1 cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* A4, carriles 3, 6 respectivamente. DNA tratado con enzima Swa 1 cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* A4, *A. rizhogenes* LBA 9402, carriles 4, 7, 9 respectivamente.

en Kpb

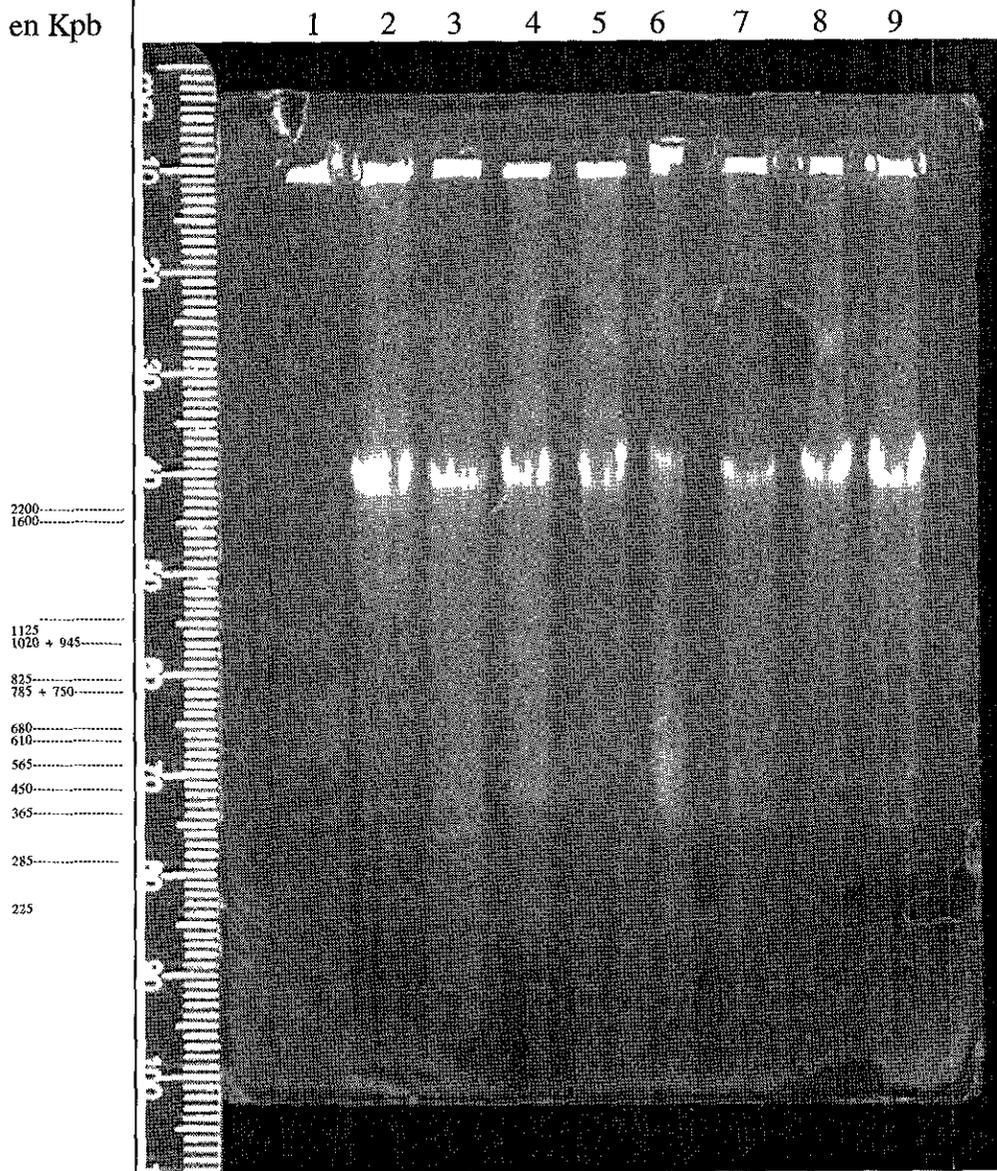


Figura 11 Electroforesis de 45 h en equipo TAFE, muestras sin tratar, tratadas con la enzima Swa 1 y con Eco R1, con 8 h de incubación. Electroforesis de 45 h, 150v, 7 pulsos: 1° 10s X 5h; 2° 20s X 5h; 3° 30s X 5h, 4° 60s X 5h; 5° 90s X 5h; 6° 120s X 5h; 7° 150s X 5h., Agarosa de baja electroendosmosis 1.0% Marcador cromosomas *S. cereviceae* (carril 1) DNA sin tratamiento cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* A4, *A. rizhogenes* LBA 9402, carriles 2, 5, 8 respectivamente. DNA tratado con enzima Eco R1 cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* A4, carriles 3, 6 respectivamente. DNA tratado con enzima Swa 1 cepas: *A. tumefaciens* ENCB, *A. rizhogenes* A4, *A. rizhogenes* LBA 9402, carriles 4, 7, 9 respectivamente.

resultados en la separación y resolución de las bandas que las obtenidas en el sistema CHEF. También se decidió utilizar el sistema TAFE para resolver las muestras con tratamientos enzimáticos, aun cuando se continuo haciendo corrimientos electroforeticos para DNA irradiado con el aparato CHEF.

Pudimos comprobar por los resultados obtenidos con los distintos corrimientos de nuestras muestras en ambos sistemas que la resolución es comparativamente similar, aunque prácticamente notamos que:

Fue mas fácil la colocación del gel en la cámara de electroforesis, la conexión y programación del equipo CHEF con respecto al equipo TAFE, ya que la computadora que controla los pulsos en el aparato CHEF esta especialmente diseñada e integrada para éste propósito, y las funciones se fijan con mayor facilidad. La instalación del equipo y el gel se facilita debido a que la posición del gel es horizontal, y el tipo de conexiones están bien especificados. En el TAFE la posición vertical del gel propicia que éste se rompa con facilidad durante su manejo y colocación, y no tiene una computadora que éste diseñada específicamente para el control de la liberación de los pulsos del aparato, sino que se debe manejar a través de un software que se instala en cualquier marca de computadora, o a través de una computadora que da pulsos pero que no es especifica para éste sistema. Esto dificulta la conexión del equipo a la computadora y el manejo del programa que dirige los pulsos durante la electroforesis resulta ser muy complicado.

En cuanto a la utilidad de los componentes y el diseño del aparato, el TAFE es mejor, éste sistema tiene mayor capacidad en cuanto a volumen interior para contener al amortiguador y al gel, por lo tanto mayor capacidad para recibir buffer (2000ml CHEFF, 3500ml TAFE) lo cual ayuda a que el agotamiento de la capacidad amortiguadora sea menor en el sistema TAFE en comparación al CHEF en cualquier lapso de tiempo determinado. Además los electrodos del sistema TAFE son más cortos que los del sistema CHEFF, lo cual reduce el desgaste electrolítico del buffer, debido a estas características no se tuvo que cambiar el buffer para hacer corridas largas de tiempo (48-72h). Además utilizando el TAFE controlado con una computadora ACER y software diseñado para éste sistema se podía continuar la corrida después de percances ocasionados por apagones porque guarda en la memoria en que momento se paro la electroforesis, en cambio en el sistema CHEFF, si hay un apagón la computadora pierde la memoria del tiempo de corrida transcurrido hasta el punto del percance y por lo tanto se tiene que reiniciar de cero el corrimiento. De ésta manera no se puede saber el tiempo real de corrida hasta antes del apagón o por descompostura de un fusible por sobrecarga de energía en el sistema CHEF. Así que esto resulta ser una de las grandes debilidades del sistema.

Los mejores resultados de separación de las bandas cromosomales y de digestión con Swa I (fig. 7 y 8) los obtuvimos con el aparato TAFE, pero tomando en cuenta la versatilidad de los parámetros de cambio en las condiciones en el corrimiento en aparato CHEFF, y considerando la limitación del tiempo de vida útil del amortiguador y con las precauciones debidas de reuso de éste, con lo que respecta a los resultados también resultó muy confiable nuestra estrategia de trabajo.

Electroforesis de los bloques de agarosa tratados con las enzimas de restricción Eco RI y Hin DIII. Con el fin de comprobar si nuestras muestras estaban lo suficientemente limpias de proteínas celulares y que hubieran determinado la falta de digestión de la nucleasa S1 decidimos hacer tratamientos con varias enzimas de restricción. Se siguió el procedimiento recomendado para las restricciones de DNA embebido en agarosa (4, 5, 18, 19), que consiste en usar un volumen grande del buffer apropiado para embeber el bloque y utilizar diez veces más enzima que la requerida para hacer las reacciones de digestión del DNA en solución. Este ensayo sirvió también como prueba para saber si la pureza del material era suficientemente buena para que se realizarán reacciones de restricción con enzimas con reconocimiento a un octanucleido como lo es la Swa I, ya que esta enzima es más costosa que la Eco RI y la Hin DIII. Por lo cual no queríamos hacer pruebas iniciales con la misma y desperdiciar innecesariamente este reactivo. Con el procedimiento previamente referido, se pudo establecer las condiciones idóneas para la restricción que podrían ser usadas para el tratamiento con la enzima Swa I.

Observando el tipo de patrón de corrimiento generado en las muestras tratadas con Eco RI y Hin DIII cepas *A. tumefaciens* pRi 1601, *A. tumefaciens* EHA 105, *A. rizhogenes* AR12, (carriles 1-4, 6 fig. 9), (carriles 3, 6 fig. 10 y 11), (carriles 3, 5, 7, 8, 10; fig. 12), se demuestra que el material genético embebido en la matriz de agarosa estaba lo suficientemente limpio como para ser restringido con otro tipo de endonucleasas.

Electroforesis de los bloques tratados con la enzima de restricción SwaI. Una vez establecidas las condiciones más apropiadas para la digestión con enzimas mas baratas, y que

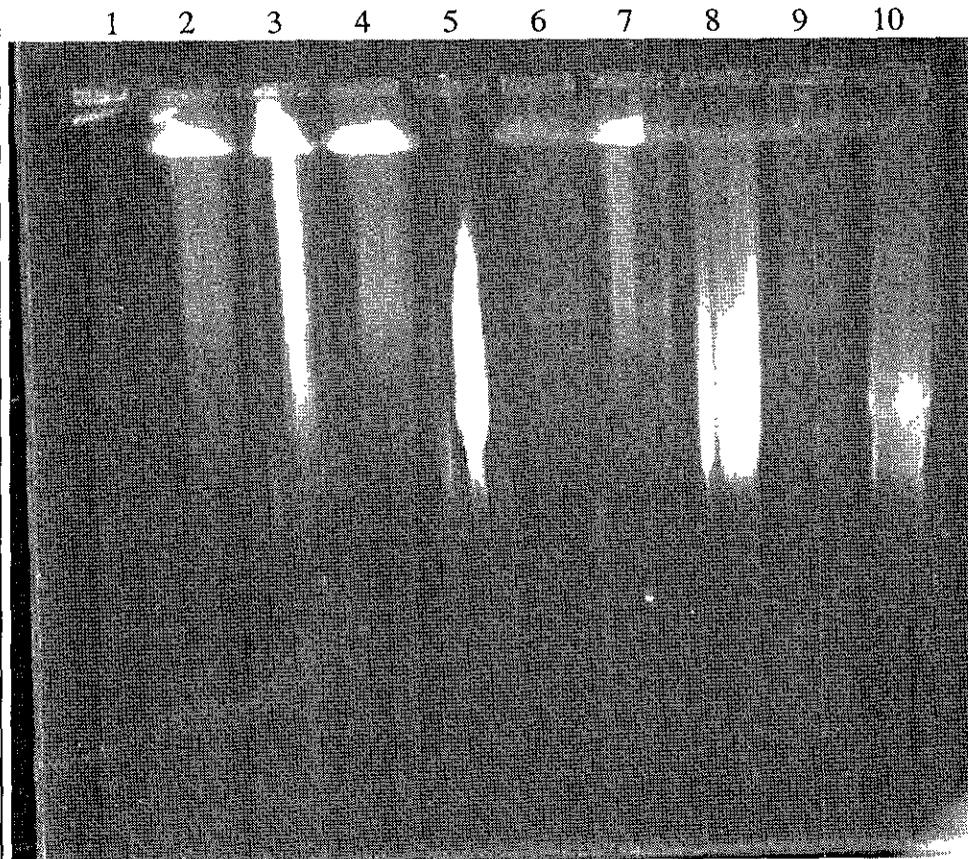


Figura 12 Electroforesis en equipo CHEF, muestras tratadas con dos diferentes enzimas de restricción y radiación. Electroforesis de 27h, 150v; 1er Intervalo entre pulsos 15 h 10 a 30 s, 2º Intervalo 12h 60 a 150 s, Agarosa de baja electroendosmosis al 1.0% Marcador de *S. cereviceae* (carril 1) DNA sin tratamiento, cepa: *A. rizhogenes* A4, carril 2. DNA tratado con enzima Eco RI cepas *A. rizhogenes* A4, *A. tumefaciens* ENCB, carriles 3 y 7 DNA tratado con enzima Hin DIII cepas *A. rizhogenes* A4, *A. tumefaciens* ENCB, *A. tumefaciens* pRi 1601, carriles 5, 8, 10 respectivamente. DNA tratado con 2Krad cepas *A. rizhogenes* A4, *A. tumefaciens* ENCB, *A. tumefaciens* pRi 1601, carriles 4, 6, 9 respectivamente.

generaban una gran diversidad de fragmentos, procedimos a realizar cortes con la enzima Swa I. En nuestro primer intento de digestión del material con ésta enzima no funcionó bien ya que el material quedó prácticamente intacto después de un periodo de incubación de 8h a 37°C fig. (11) *A. tumefaciens* ENCB *A. rizhogenes* A4 *A. rizhogenes* LBA 9402 carriles (4, 7 y 9). Por lo que extendimos el tiempo de incubación a 32 h. y con un aplicación seriada de dos alícuotas de enzima, una cada 8h y dejando previamente que la enzima difundiese por la agarosa durante 8h a 4°C con lo que logramos que se restringiera bien el DNA. En las figs. 7 y 8 puede observarse el gel con algunas muestras restringidas con Swa1, y cuyo orden en los carriles es: 1) Marcador de peso molecular de *S. cereviceae*, 2) *A. tumefaciens* ENCB 2 krad, 3) *A. rizhogenes* LBA 9402 2 krad, 4) *A. tumefaciens* ENCB Swa1, 5) *A. tumefaciens* EHA105 Swa1, 6) *A. rizhogenes* A4 Swa1, 7) *A. rizhogenes* AR12 Swa1, 8) *A. rizhogenes* LBA 9402 Swa1, 9) *A. rizhogenes* A4 2 krad. De éste gel se obtuvieron imágenes a dos distintos tiempos de corrimiento la primera imagen se obtuvo después de 20h. (Fig. 7) de electroforesis hasta ese momento en ninguno de los carriles se aprecia el cromosoma intacto, por lo que decidimos continuar con la electroforesis hasta completar 45 h (fig. 8). En la imagen de la (fig. 7) se distinguen más bandas correspondientes fragmentos pequeños de restricción, pero en la imagen que se obtuvo después (fig. 8) se obtiene la mayor definición de las bandas y más claridad para la comparación de la movilidad con respecto al marcador de peso molecular y por esta razón resulto más fácil la extrapolación de la masa molecular de cada uno de los fragmentos obtenidos de la digestión con Swa I con respecto a las bandas del marcador de peso molecular formado por los cromosomas de *S. cerevisceae*. En *A. tumefaciens* ENCB Swa1, el carril 4 (fig. 8) se presenta un corrimiento similar al del 2do evidenciando que la restricción con Swa 1 no funcionó para esta muestra por

alguna razón. Después de las 20 h hay 3 bandas dos de ellas pertenecen aparentemente a megaplásmidos. En *A. tumefaciens* EHA105 Swa1, carril 5 (fig. 8) podemos observar patrón de restricción definiéndose muy claramente por lo menos 7 bandas, de las cuales dos de ellas corresponden claramente a los dos cromosomas intactos de 3.0 mpb. y 2.1 mpb, y 5 bandas probablemente producto de una digestión parcial que delinear un patrón de restricción específico para la cepa. A las 20 h (fig. 7) aparece un bandeo de restricción borroso a causa de la mala calidad de la fotografía. En *A. rizhogenes* A4 Swa1, carril 6 (fig. 8) se observa un patrón de bandeo muy similar al anterior con la adición de una banda, en esta ocasión se presentan las siete bandas descritas para el carril anterior con intensidad similar y en la misma posición, y una banda adicional que es la de más bajo peso molecular. En *A. rizhogenes* AR12 Swa1, carril 7 (fig. 8) el patrón de bandeo es prácticamente idéntico que en el 5to carril. A las 20 h (fig. 7) aparece un bandeo borroso, en algunos puntos que se identifica claramente a las bandas aparecen prácticamente en la misma posición que las bandas del carril 5. En *A. rizhogenes* LBA 9402 Swa1, carril 8 (fig. 8) el patrón de corrida sí varía en gran medida, pues da la impresión de que aparecen 9 o quizás 10 bandas. A 20 h (fig. 7) de electroforesis éste es el único carril que presenta 15 bandas que se distinguen muy bien unas de otras.

Conclusiones

-En éste trabajo se pudo comprobar que en todas las cepas de *A. tumefaciens* con fondo genético de C58 y la ENCB, además de las 3 cepas de *A. rhizogenes* parecen compartir la organización genómica en cuanto a número de cromosomas y topología tal como fue previamente descrito por Alardet Servent et al., (1) para la única cepa estudiada, la denominada C58C1. Es decir todas las cepas presentaron dos cromosomas, uno circular de 3.0 mpb y uno lineal de 2.1 mpb y por lo menos dos megaplásmidos. Sin embargo los patrones de bandeo después de la restricción con la enzima *Swa*I parecen indicarnos que existen diferencias en la organización fina de los diferentes replicones en las distintas cepas de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* utilizadas en el presente estudio.

-Los resultados obtenidos con los dos tipos de agarosa nos demuestran que nos es necesaria la utilización de la agarosa grado cromosomal, tal y como lo recomiendan los distribuidores de equipos de electroforesis CEPGA. Por lo que a través de éste estudio casi todo el trabajo se realizó en una agarosa de baja electroendosmosis para electroforesis convencional, de esta manera abaratamos los costos en el estudio realizado. Como estrategia a seguir en futuros estudios usaremos la agarosa para electroforesis convencional para la mayoría de los experimentos, y la agarosa grado cromosomal se usara cuando se desee corroborar resultados.

- Los resultados obtenidos de la digestión con la enzima SwaI concuerdan con los obtenidos por Allardet S. et al en la cepa C58C1, aunque encontramos algunas bandas que no corresponden a la cepa C58C1 principalmente en las cepas de *A. rhizogenes*

- Como se ha reportado en las referencias bibliográficas (18) encontramos que en la migración y la separación de las bandas influyó la concentración de la muestra. Esto explica por que algunos de los distintos corrimientos difirieron en cuanto a la determinación del peso molecular de las bandas del DNA uno del otro. Sin embargo. Como comentaron Allardet Servent y cols (1) en su publicación de 1995 que es deseable aplicar muestras no irradiadas en altas concentraciones, para tener la posibilidad de observar claramente la pequeña porción de DNA circular linealizado por el manejo de las muestras y sin aplicación de tratamiento alguno.

-La presencia de los diferentes plásmidos patogénicos define el tipo de infección para cada una de las especies y ésta es la principal función que se le ha encontrado a estos replicones los cuales son diferentes en cuanto a tamaño de plásmido a plásmido y su origen evolutivo. Además también hay una diferencia en la aparición de un tercer plásmido en las cepas A4 y pRi 15384 formado probablemente como un cointegrado entre el plásmido pRi y el plásmido críptico y que no parece formarse en las otras cepas en las condiciones de crecimiento realizadas durante la actual experimentación (13).

-Las radiaciones γ y X presentan algunas diferencias en cuanto a sus capacidades ionizantes, lo cual hizo que se tuviera que optimizar la técnica para nuestras condiciones de

trabajo, y encontramos que experimentalmente la cantidad de radiación conveniente para la linealización de los replicones circulares fue de 2krad en buffer TE. Este método de linealización de replicones circularmente cerrados fue bastante reproducible a diferencia del método con S1 que parece no servir para linealizar los cromosomas bacterianos, pero si es útil para los megaplásmidos de estos organismos.

El presente estudio aporta conocimiento útil para ayudar en la determinación y ubicación taxonómica del género *Agrobacterium* en congruencia con los criterios actuales de clasificación bacteriana, los cuales se basan en que además de las pruebas quimiotaxonómicas, se deben aceptar otros criterios como son las relaciones filogenéticas y la organización genética, e incluso se llega a sugerir como criterio de clasificación la capacidad del organismo para ser patógeno estricto de cierto organismo. Debido a que este tipo de relación patogénica requiere de una estrecha interrelación entre el patógeno y el huésped y se da inclusive una coevolución de ambos organismos (23, 25, 26).

A éste respecto en nuestro estudio encontramos características coincidentes tanto en los tamaños de los replicones de los cromosomas de las cepas estudiadas como en su arreglo topológico y contenido genético, y la conservación de éste evidenciado por su patrón de restricción cacterístico. Esto es congruente con la condición de que estos organismos estén agrupados evolutivamente en el mismo género, pero quizás las coincidencias vayan mas allá y puede ser que los cromosomas de las dos especies estudiadas presenten la suficiente homología entre sí como para que sea necesario un rearrreglo en su ordenamiento taxonómico, evaluando las

características genéticas con valor taxonómico y quizás encontrando la distancia evolutiva entre una especie y la otra por medio de la hibridación entre de genes altamente conservados, y la determinación de la conservación del mismo ordenamiento de los genes en el cromosoma o cromosomas, y finalmente la secuenciación completa de los diferentes replicones en las diferentes especies de las rhizobaceas.

Incluso ya se ha sugerido que las especies y variedades del género *Agrobacterium* sean reacomodados de las cuatro especies comprendidas actualmente (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, y *A. vitis*), en solo tres (*A. radiobacter*, *A. rubi*, *A. vitis*) (26) y que sólo se deban las diferencias a la adquisición reciente de los plásmidos Ti y Ri infecciosos.

Apéndice

Medio YEB para el crecimiento de *Agrobacterium*

Bacto extracto de carne	5 g./l
Bacto extracto de levadura	1 g/l
peptona	5 g/l
sacarosa	5 g/l
MgSO ₄	2.10 ⁻³ M/l

Apéndice

Características generales del CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field) DR-II

Producto: CHEF DR-II

Fabricante: BIO-RAD Laboratories Ltd.

Descripción: Sistema para corrimiento de DNA en geles de agarosa por medio de campos pulsados homogéneamente distribuidos en cuanto a intensidad y tiempo entre pulsos.

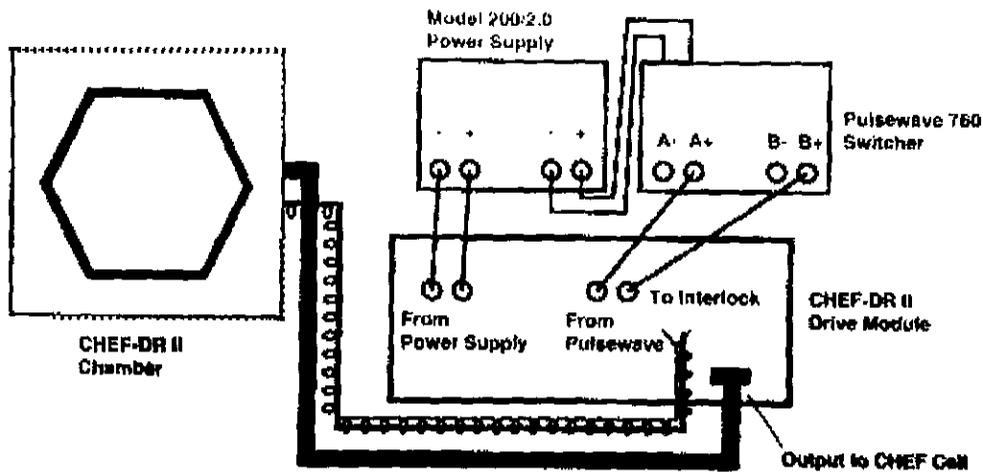
a) Cuenta con una cámara para electroforesis con seis electrodos dispuestos en forma hexagonal.

b) Una fuente de poder que puede emitir corriente directa con intensidad de hasta 200 volts

c) "Cerebro electrónico" que controla la posición del campo eléctrico entre los pulsos, además presenta varias funciones, como el incremento lineal del tiempo entre pulsos, o la orientación del patrón de corrimiento hacia alguno de los lados del gel.

d) Distribuidor de la energía, este envía la corriente y las "órdenes" del cerebro electrónico en cuanto a la posición del campo eléctrico a la cámara de electroforesis.

Es importante señalar que los cuatro sistemas descritos anteriormente funcionan de manera independiente uno de los otros, pero se necesitan todos para la electroforesis de campos eléctricos pulsados en geles de agarosa (figs 13, 14).



Wiring the CHEF-DR II system.

Figura 13. Diagrama de las conexiones del equipo CHEF. Se muestran los componentes del sistema CHEF-DR II. De izquierda a derecha y de arriba a abajo son: 1. Cámara de electroforesis con los electrodos colocados en una forma hexagonal. 2. Fuente de poder. 3. Alternador de pulsos. 4. módulo de distribución de la energía.

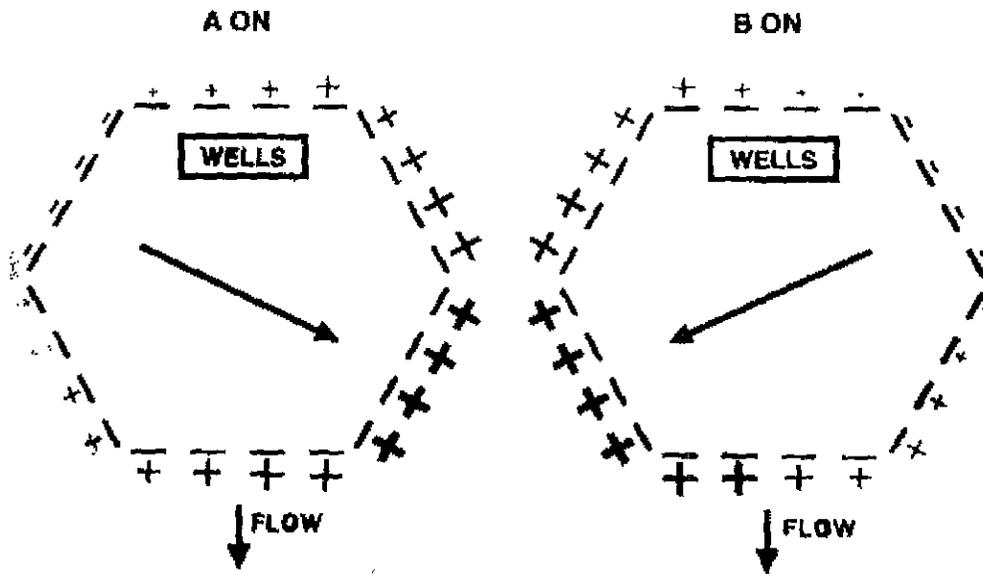


Figura 14. Diagrama de distribución de cargas en la celda CHEF en 2 pulsos. Se muestra en una secuencia de 2 pulsos la manera en que cambia la distribución de las cargas y su intensidad a lo largo de la corrida. Donde cada hexágono representa a la cámara en un cierto pulso en la corrida, los signos positivo "+" y negativo "-" son las cargas y su intensidad esta representada por tamaño del signo. Las líneas en la parte superior de cada signo son los electrodos y el rectángulo arriba y al centro de cada hexágono son los pozos de aplicación, la flecha adentro del hexágono es la dirección de migración en el momento en que se esta dando el pulso, y la flecha en la parte inferior es la dirección "promedio" de la migración durante toda la electroforesis.

Apéndice

Características generales del Gamacell

Producto: Gamacell 1000 Elite

Fabricante: Nordion International Inc. Canada.

Fuente radioactiva: ^{137}Cs

Funcionamiento: el Gamacell presenta una fuente radioactiva al centro de un escudo de plomo, el cual presenta una ventana en la parte posterior del equipo donde se presenta la muestra para ser irradiada, esto se realiza mediante un sistema de rotor que tiene una cámara para muestra montada en un segundo escudo, dicha cámara recibe la muestra en la parte frontal del aparato, y después la lleva a la "ventana" donde se expone a la muestra al material radioactivo, la cantidad de radiación que recibe la muestra esta en función al tiempo que esta permanece "frente" a la fuente radioactiva, y el tiempo se controla mediante un cronómetro que el sistema tiene integrado.

Seguridad radiológica del aparato

Escudo anti-radiación: consta de dos secciones las cuales están hechas de plomo y montadas en armazones de acero.

La protección principal es la que contiene a la fuente radioactiva

La otra protección esta destinada al rotor que contiene la cámara de muestra.

El aparato emite en condiciones típicas menos de 1mrem/h en la superficie, tomando como superficie el gabinete de fibra de vidrio, éste valor esta por debajo de lo permisible en la norma ANSI N433.1, que permite hasta 20 mrem/h a los 5 cm de la superficie (fig.15).

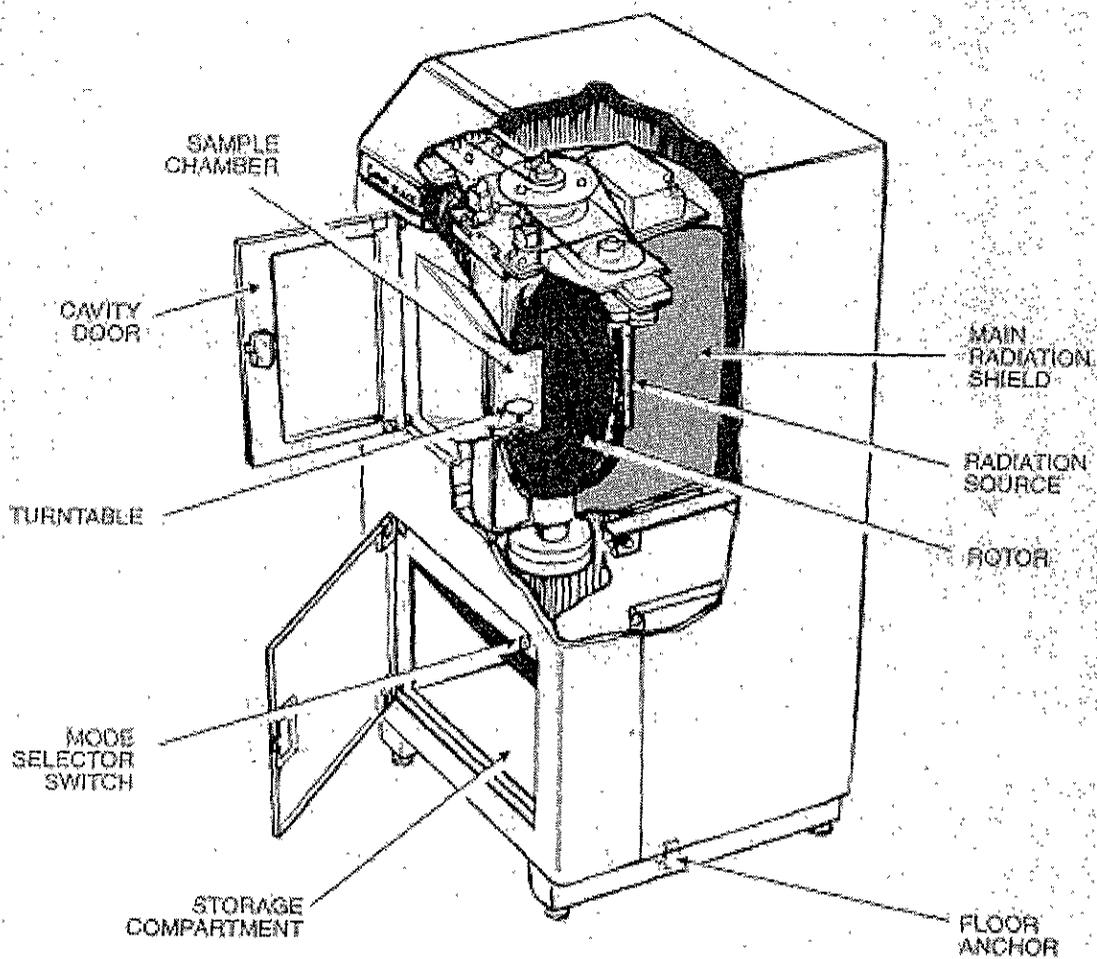


Figura 15 Características del Gamma-Cell. Se muestran las partes principales del irradiador gama, hago notar que en la cavidad donde se coloca la muestra se encuentra una base giratoria y el escudo de plomo anti radiación.

Apéndice

Características generales del digitalizador de imágenes Eagle Eye

Equipo digitalizador que cuenta con cámara fotográfica tipo reflex conectada al aditamento digitalizador, manejado mediante una computadora 486 con 8Mb de memoria RAM con un sistema de impresión en papel fotográfico

Apéndice

Soluciones amortiguadoras para la preparación de geles y corrimientos electroforéticos

Amortiguador TE

- 10mM	Tris·Cl
-1mM	EDTA
pH	7.5

Amortiguador Tris-Borato (TBE) 5X

para 1l

54g	Tris Base
27.5g	Ácido Bórico
20ml	EDTA 0.5M
pH	8.0

Amortiguador Tris-Acetato (TAE) 50X

para 1l

242g	Tris Base
57.1ml	Ácido Acético grado glacial
100ml	EDTA 0.5M

Apéndice

(Técnica de inclusión de DNA de alto peso molecular en celdillas de agarosa BPF.)

1. Crecer las células bacterianas por 36 a 48h. en 10 ml de medio YEB
2. Centrifugar a 400g durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada estabilizada a 4 grados centígrados.
3. Se lavó y resuspendió en 2 ml (La 5ª parte del volumen inicial) de 200mM NaCl, 10mM tris pH 7.2 100mM EDTA, solución A. y centrifugó a 400 g por 10 min.
4. Se Quitó sobrenadante y agregó 0.5 ml de solución A, se resuspendió y calentó hasta 37 grados centígrados.
5. Mezclar las células en volumen igual de agarosa al 2% de bajo punto de fusión enfriada a 40 grados centígrados y se vacían en los moldes.
6. Enfriar a 4 grados centígrados hasta que gelifique (15 minutos aproximadamente)
7. Se dejaron enfriar para formar los bloques de agarosa y se colocaron en tubos cónicos "Falcon" de 15ml donde se lavaron.
8. Incubar a 37 grados centígrados con agitación suave de 2 a 6 horas.
9. Quitar la solución de lisis y agregar de 2 a 3 volúmenes de BD 0.5
10. Incubar por 1 o 2 días a 50 grados centígrados con agitación suave
11. Al almacenar muestras a 4 grados centígrados en el bufer de digestión.
12. Lavar con solución amortiguadora TE 1X

Solución amortiguadora BD (Buffer de Digestión)

Bibliografía

- 1- Allardet-Servent A., Michaux-Charachon S., Jumás-Bilak E., Karayan L., and Ramuz M. 1993. Presence of one linear and circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.* **175**: 7869-7874.
- 2- Barton B.M., Harding G. P., and Zuccarelli A.J.. A general method for detecting and sizing large plasmids. 1995. *Analytical biochemistry.* **226**: 235-240.
- 3- Stephen M. Beverley. Estimation of circular DNA size using γ -irradiation and pulsed-field gel electrophoresis. 1989. *Analytical biochemistry.* **177**: 110-114.
- 4- Birren B.W. 1990. Electrophoresis of large DNA molecules. Ed. Cold Spring harbor laboratory press. New York. pp: 1-155.
- 5- Birren B. 1993. Pulsed field gel electrophoresis a practical guide. Ed. Academic press inc. The United States of America. pp: 1-251.
- 6- Drlica K., Riley M., 1990. The bacterial chromosome, American Society for Microbiology, Washington D.C. 3-13
- 7- Flores M., González V., Brom S., Martínez E., Piñero D., Davila G., Romero D., and Palacios R. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol. USA.* **169**: (12): 5782-5788.
- 8- Flores M., Brom S., Stepkowsky T., Girard M.L., Davila G., Romero D., and Palacios R. 1993. Gene amplification in *Rhizobium*: Identification and in vivo cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **90**: 4932-4936.

- 9- Flores M., Gonzales V. Pardo M.Aç., Lejija A., Martinez E., Romero D., Piñedo D., Davila G., and Palacios R. 1988. Genomic Instability in *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. 1191-1196.
- 10- Garcia de los Santos A., Brom S. and Romero D. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. World Journal of Microbiology. Biotechnology **12**: 119-125.
- 11- Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W., 1994. An introduction to Genetic analysis. W. H. Freeman and Company. U.S.A. 5th edition.
- 12- Johns et. all. 1970. Principles of radiation protection, Mc Graw Hill Book Co. 4th edition USA. 73-102
- 13- Jouanin L; Tourneur J; Tourneur C; Casse-De4lbert F, 1986, Restriction maps and homologies of three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. Plasmid USA **16**: 124-134
- 14- Krieg, N.R. 1988. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins. 964 pp.
- 15- Kwai-lin Thong, Yuet-Meng Cheong, Savithry Puthuchery, Chong-Lek Koh, Tikki Pang. 1994. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella tify* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of clinical Microbiology USA (32) **5**: 1135-1141.
- 16- Lognonne J.L. 1993. Introduction to pulsed-field Gel Electrophoresis. Methods in molecular and cellular biology **4**: 49-55.
- 17- Maslow N.J., Slutky M.A., and Arbeit D.R., Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. Applications molecular typing methods. Academic Press. pp: 563-571
- 18- Norman A. Doggett, Cassandra L. Smith y Charles R. Cantor. The effect of DNA concentration on mobility in pulsed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Research **20**: (4), 859-864.

- 19- Pühler A.; 1983. molecular genetics of the bacteria plant interaction. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp: 164-168
- 20- Quinto C., Vega H., Flores M., Leemans J., Cevallos M.A., Pardo M.A., Azpiroz R., Girard M.L., Calva E., Palacios R. 1984. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 1170-1174.
- 21- Romaling U; Grothues D; Heuer T; Tummeler B; 1992. Physical genome analysis of bacteria. Electrophoresis **13**: 626-631.
- 22- Samborook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. De. Cold Spring Harbor Laboratory Press , United States of America. Second Edition.
- 23- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., eds. 1986 Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins. 635 pp.
- 24- Suwanto A. 1994. Pulsed-field Gel Electrophoresis a Revolution in Microbial Genetics. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology **2**: 78-85.
- 25- Uldis N. Streips & Ronald E. Yadsbin. 1991. *A tumefaciens* genetics. Modern Microbial Genetics. Department of Agricultural chemistry, Oregon State University, Corvallis. Wiley-Liss pp: 431-453.
- 26- Young J.M., Takikawa Y., Gardan L., Stead D.E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology. **30**: 67-105