



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Formación y caracterización de una banca de mutantes  
sensibles a la salinidad de la cepa *Ensifer* sp.  
(*Phaseolus filiformis*) LEM451.**

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
PRESENTA:

Danaee Rojas Arellano

DIRECTOR: D.C. José Antonio Munive Hernández  
CO-DIRECTOR: M.C. Guadalupe Rocha Bonilla



Septiembre-2016

## **AGRADECIMIENTOS**

**AI D.C. JOSE ANTONIO MUNIVE HERNANDEZ Y A LA M. en C. GUADALUPE ROCHA BONILLA POR LA CONFIANZA, LOS CONSEJOS, LOS CONOCIMIENTOS Y TECNICAS QUE ELLOS AMABLEMENTE ME PROPORCIONARON, POR ORIENTARME Y SERVIR SIEMPRE DE APOYO CADA VEZ QUE LO NECESITABA. POR ACEPTARME DENTRO DE SU GRUPO DE TRABAJO Y COMPARTIR ESPACIO Y TIEMPO VALIOSOS.**

**A TODOS LOS CHICOS DEL LABORATORIO DE ECOLOGIA MOLECULAR, CON QUIENES PASE EXCELENTES RATOS.**

**A MIS COMPAÑEROS DE CLASES DE LA ESCUELA DE BIOLOGIA QUE SIEMPRE SUPIERON COMO HACERME REIR Y TOLERARME DURANTE LA MAYORIA DE LOS DIAS DE ESTA HERMOSA CARRERA.**

**A LA ESCUELA DE BIOLOGIA, DOCENTES Y PERSONAL ACADEMICO POR LA BUENA ORIENTACION Y FORMACION QUE RECIBI DE ELLOS.**

**A MI MADRE MONICA HAYDEE ARELLANO AGUILAR POR SERVIR DE BUEN EJEMPLO, POR SU APOYO INCONDICIONAL Y ESTAR SIEMPRE PENDIENTE DE MI, A MI PADRE HUMBERTO ROJAS PEÑA POR SU APOYO Y COMPRESION DURANTE TODA ESTA CARRERA Y A MI PEQUEÑO HERMANO HECTOR ROJAS ARELLANO CON QUIEN SIEMPRE PASO BUENOS RATOS DE OCIO SALUDABLE.**

**A MI FAMILIA ROJAS, TIOS, PRIMOS Y MI ABUELA GLORIA PEÑA ALBA POR ESTA SIEMPRE APOYANDOME Y GUIANDOME POR EL BUEN CAMINO.**

**A LUZ MAYRA POR AYUDARME CON TANTOS RATOS MARAVILLOSOS LLENOS DE SUS SONRISAS.**

***DEDICATORIA:***

***A MI MADRE MONICA HAYDEE ARELLANO AGUILAR POR TODA UNA VIDA DE TRABAJO AL  
SERVICIO DE LA FAMILIA***

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1 Leguminosas	3
2.2 Rhizobia	4
<u>2.2.1</u> Genero Énsifer/Sinorhizobium	7
2.3 Salinidad en suelos de cultivo	7
2.4 Plásmidos	10
2.5 Transferencia de material genético (ADN) en bacterias	10
2.6 Transposones o elementos genéticos transponibles (EGT)	12
<u>2.6.1</u> Transposones ADN	14
<u>2.6.2</u> pUT-MiniTn5	14
2.7 Justificación	17
<b>III. HIPÓTESIS-OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1 Hipótesis	18
3.2 Objetivo General	18
3.3 Objetivos Particulares	18
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
Objetivo 1: Conjugación biparental - <i>Escherichia coli</i> S17.1 y <i>Ensifer</i> sp. ( <i>Phaseolus filiformis</i> ) LEM 451	19
4.1 Condiciones y medios de crecimiento	19
4.2 Condiciones de conjugación	19
4.3 Recuperación de conjugación y diluciones empleadas	20
4.4 Selección y contra selección de transconjugantes	20
Objetivo 2: Evaluación de crecimiento a estrés salino	20
4.5 Pruebas de crecimiento en sal de cepas mutantes.	20
4.6 Evaluación cuantitativa de crecimiento de transconjugantes sensibles a sal	21
<u>4.6.1</u> Ensayo Drop Plate	21
4.7 Extracción de ADN plasmídico y genómico:	22
4.8 Amplificación de cassette de resistencia a gentamicina	22
Objetivo 3: Caracterización de cepas mutantes sensibles a NaCl	22
4.9 Pruebas moleculares a cepas mutantes sensibles a NaCl	

4.9.1 Amplificación del gen <i>rpoB</i>	23
4.9.2 Amplificación del gen 16SrRNA	24
4.9.3 Análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	24
4.9.5 PCR arbitraria	25
4.9.6 Secuenciación de productos de PCR arbitraria y búsqueda de secuencias similares en NCBI.	27
4.9.7 Prueba de resistencia a antibióticos	27
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.1 Construcción de la banca de transconjugantes mediante transposición insercional.	28
5.2 Pruebas en NaCl de banca de mutantes	29
5.3 Amplificación y digestión del cassette de resistencia a Gm	29
5.4 Evaluación cuantitativa de crecimiento de transconjugantes sensibles a sal	30
5.5 Análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	33
5.6 PCR arbitraria	34
5.7 Secuenciación de productos de PCR arbitraria y búsqueda de secuencias similares en NCBI.	35
5.8 Resistencia a antibióticos	36
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>VII. CONCLUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>40</b>
<b>IX. Anexos</b>	<b>46</b>





## I. RESUMEN

La salinidad en los suelos agrícolas es una adversidad que se presenta en diferentes puntos del planeta Tierra (Wicke *et al.*, 2011; Shrivastava y Kumar *et al.*, 2015) afectando la producción de alimentos y la economía de las naciones. A pesar de que algunas plantas presentan la capacidad de ser cultivadas en suelos con altas concentraciones de sales esta resistencia disminuye con el tiempo y con la pérdida de este tipo de plantas gran parte del suelo permanecería incultivable e improductivo. En una población que crece a un ritmo acelerado y debido a la demanda de alimentos que este crecimiento conlleva (OMS, 2009) es imprescindible contar con la producción de alimentos de origen vegetal ya que son estos los que constituyen la base de alimentación de las diversas sociedades. Dentro de la amplia variedad de los cultivos de plantas, la familia de las leguminosas ocupa el segundo lugar en importancia económica a nivel mundial (Judd *et al.*, 1999, 2002); en esta familia se encuentran plantas que han sido las pioneras en establecer una relación positiva con el humano al ser parte insustituible en su alimentación desde los inicios de la civilización, leguminosas como las habas (*Vicia*), las lentejas (*Lens*), el maní (*Arachis*) y el frijol (*Phaseolus*) han estado presentes desde tiempos remotos en la dieta de diversas civilizaciones debido a su gran aporte energético y el manejo relativamente fácil de este tipo de cultivos (García-Barriga & Forero, 1968). Dentro de las leguminosas el género *Phaseolus* contiene especies que son consumidas en todo el mundo gracias a su vasta producción y al bajo costo de la semilla a lo largo del año, sin embargo, los precios de esta leguminosa en ocasiones pueden incrementarse debido a la escases del cultivo o semillas (FAO, 2008). Es por esto que es necesario buscar el aseguramiento de un correcto desarrollo de este género tan importante de plantas para la obtención de alimentos incluso en suelos con poco potencial debido a altas concentraciones de sales.

En el presente trabajo se realizó, parcialmente, una mutateca por transposición al azar utilizando como estrategia la conjugación biparental, involucrando a la cepa ***Escherichia coli* S17.1(pUT mini Tn5-Gm)** como la cepa donadora de material genético, la cual contiene un plásmido de entrega con un transposón con casete de resistencia a antibiótico gentamicina (Gm) (pUT mini Tn5-Gm) y ampicilina (Ap) este último se encuentra en un vector suicida (De Lorenzo *et al.*, 1990). La cepa aceptora ***Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM 451** presenta sensibilidad a gentamicina (Gm) pero resistencia a kanamicina (Km). De trabajos previos (Rocha-Bonilla, Tesis de Maestría, 2012) se conoce que la cepa *Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM 451 es una cepa que

presenta gran tolerancia al estrés salino en cloruro de sodio (NaCl), diversos pHs y altas temperaturas.

Se generaron un total de 6300 cepas mutantes las cuales fueron sometidas a una primera prueba cualitativa de crecimiento en medio Triptona-Levadura (TY) con dos concentraciones de Cloruro de Sodio (NaCl) (200mM y 300mM). Si existían deficiencias en el crecimiento de las mutantes se elaboró una segunda prueba de crecimiento (cuantitativa) para realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio TY con concentraciones de NaCl (100, 200, 300, 400, 450mM). Las pruebas en crecimiento con NaCl arrojaron 5 candidatas (**003-H1, 003-A6, 003-D11, 036-B12 y 041-G1**) a cepas mutantes sensibles al crecimiento en medio con NaCl, a estas cepas mutantes sensibles a sal se les aplicó un ensayo RFLP para comprobar que fueran mutantes de la cepa silvestre, así mismo también se les realizó la amplificación y digestión del casete de resistencia a Gm, finalmente estas cepas mutantes sensibles a sal fueron caracterizadas mediante prueba de resistencia a antibióticos y secuenciación de ADN obtenido por el método de PCR arbitraria y comparación del producto obtenido en bases de datos de Centro Nacional para la Bioinformación mediante la herramienta BLASTn.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Leguminosas

África ha sido propuesta como el sitio de origen una de las familias más importantes de plantas para el ser humano: la familia *Leguminosae* (Raven y Polhill, 1981). Las leguminosas son una familia de plantas que ocupa el tercer lugar en tamaño entre las angiospermas. Existen alrededor de 730 géneros y cerca de 19,400 especies (Lewis *et al.*, 2005; Stevens, 2009) que se presentan en diferentes formas, existen herbáceas, arbustos y enredaderas. Actualmente se distinguen 3 sub-familias: *Mimosoideae*, *Caesaelpinioideae* y *Papilionoideae* (*Faboideae*), la sub-familia *Mimosoideae* incluye entre 50 y 60 géneros y unas 2,500 especies que son plantas leñosas que se encuentran en el trópico, sub-trópico y zonas templadas; la subfamilia *Caesaelpinioideae* incluye 150 géneros y unas 2,700 especies, la mayoría son plantas tropicales leñosas y la sub-familia *Papilionoideae* incluye 429 géneros y 12,615 especies en su mayoría son plantas herbáceas (Forero *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005).

La gran diversidad de leguminosas presentes en el mundo se utiliza de diversas maneras, la principal utilización es para consumo humano y animal, también se obtienen diferentes productos, se obtienen ceras, alcoholes, ácidos orgánicos y tintes, se utilizan como plantas decorativas en algunas regiones de América del Sur y gran parte de estas plantas se utilizan como medio de protección contra la erosión (Forero *et al.*, 2005). En la actualidad el cultivo de leguminosas ha disminuido por hectárea debido a falta de técnicas agronómicas correctas para su cultivo y a la escasez de nutrientes en suelos desgastados por monocultivos (COAG, 2008).

La familia de las leguminosas se sitúa en segundo lugar por detrás de las gramíneas como plantas de importancia económica a nivel mundial (Judd *et al.* 1999, 2002). Existen especies que proporcionan maderas que son ampliamente utilizadas para la construcción, así como también especies que han proporcionado semillas como alimento al hombre desde tiempos ancestrales (lenteja, frijol, soya).

Los amplios cultivos de leguminosas presentan numerosas relaciones interespecíficas y estas proporcionan beneficios a los organismos que interactúan con ellas, la planta *Acacia* brinda refugio a hormigas de distintas especies y la mayoría de leguminosas con flores son fuente de alimento para gran diversidad de insectos, así como también sus frutos y semillas lo son para las aves. Es imprescindible destacar que la mayoría de las

leguminosas pueden establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, estas bacterias se encuentran en las raíces donde forman una estructura u órgano llamada **nódulo** desde donde llevan a cabo la función de fijación del nitrógeno, de esta manera la planta se ve beneficiada por el aporte constante de compuestos derivados del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) por parte de la bacteria y esta se ve beneficiada con un nicho y alimento de diversas sustancias que le proporciona la planta, la mayoría de bacterias con capacidad para nodular y fijar nitrógeno en leguminosas son microorganismos pertenecientes al grupo de los rhizobia, de esta manera tanto las leguminosas como los rhizobia en asociación simbiótica juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno en la Tierra (Burkart, 1952) y juntos representan una alternativa para reducir el consumo de fertilizantes nitrogenados que en severas ocasiones son mal empleados y representan problemas de contaminación de suelos y agua.

## 2.2 Rhizobia

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso importante para mantener la vida en el planeta pues provee cerca del 70% del nitrógeno requerido por los ecosistemas naturales (Burns y Hardy, 1975). Debido a que el nitrógeno forma parte esencial en la estructura de proteínas y ácidos nucleicos es indispensable que cualquier organismo obtenga este elemento para su subsistencia y crecimiento, para las plantas, al no ser móviles, es necesario que el medio en que se desarrollan presente fuentes disponibles de nitrógeno, principalmente en forma de nitratos ( $NO_3$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ), en situaciones donde el suelo carece de estas formas de elementos las plantas necesitan un aporte constante de este tipo de nutrientes para su correcto desarrollo, en este caso la familia de las leguminosas son capaces de establecer interacciones beneficiosas con microorganismos que son capaces de proporcionar los elementos nitrogenados que la planta necesita para su subsistencia y crecimiento, estos microorganismos son conocidos como rhizobia los cuales tienen la capacidad de tomar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) y convertirlo a formas asimilables para las plantas por medio de la acción de la enzima nitrogenasa y la hidrólisis de ATP (adenosín trifosfato) (Alvarado, 2010).

Los rhizobia son un grupo (sin relación taxonómica directa) de bacterias gram-negativas, aeróbicas, nodulantes y fijadoras de nitrógeno que se encuentran en los dos grandes grupos de bacterias; las alfa-proteobacterias y beta-proteobacterias, dentro de las alfa-proteobacterias se encuentran los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Methylobacterium*, *Devosia*,

*Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* y *Shinella* (de Lajudie *et al.*, 1994, 1998; Jordan, 1984; Jarvis *et al.*, 1997) mientras que dentro de la clasificación de beta-proteobacteria se encuentran los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum* la principal característica de este grupo de bacterias es la capacidad de generar una interacción interespecífica con las raíces de plantas de la familia de las leguminosas mediante un proceso llamado nodulación cuyo objetivo final es formar un órgano nuevo donde la bacteria pueda desarrollarse, por este motivo es que también se les llama Bacterias Nodulantes de Leguminosas (BNL's), a través de este proceso las BNL's propician la fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) que la planta utiliza para su desarrollo, al resultar ambos organismos beneficiados de las acciones del otro este proceso es conocido como **simbiosis**, proceso que ha ocasionado que las BNL's sean ampliamente estudiadas para conocer, entender y manipular su proceso de nodulación y fijación de nitrógeno (Brill, 1981; Hirsch *et al.*, 2001).

Para que una BNL establezca simbiosis tienen que llevarse a cabo una serie de pasos, el primero es la síntesis de quimioatrayentes por parte de la planta hacia el suelo donde se encuentran las BNL's mismos que serán detectados por estas últimas y buscarán el contacto con las raíces de la leguminosa para iniciar el proceso de infección y nodulación, dicho proceso por parte de las BNL's involucra la acción de genes (Nod) y exopolisacáridos que producen estas bacterias (Frayse *et al.*, 2003), el primer paso para llevar a cabo la nodulación consiste en ingresar a la raíz por medio de un canal de infección que atraviesa los pelos radicales, una vez dentro, la infección se propaga hasta la células del meristemo donde se lleva a cabo las divisiones celulares por parte de las células adyacentes al canal de infección lo que ocasiona la formación del nódulo, es importante mencionar que las bacterias quedan aisladas del citoplasma por una membrana que se deriva de la planta hospedadora que se denomina membrana peribacteroidal (MPB) (Garg y Renseigné, 2007). (Figura 1.2-1).

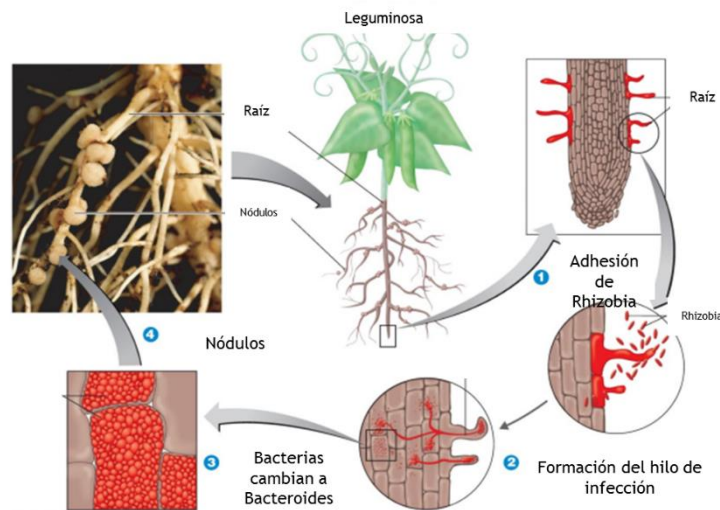


Figura 1.2-1 Proceso de formación de nódulos en leguminosas (Palma, 2009)

Una vez dentro del nódulo establecido en la planta da inicio la simbiosis la cual a pesar de ser una interacción facultativa que no es necesaria para la supervivencia de ambos organismos es promovida por la deficiencia de nitrógeno presente en la planta (Maróti *et al.*, 2014). La simbiosis establecida con la planta mediante la nodulación ocasiona que las bacterias cambien su comportamiento y morfología una vez dentro del nódulo, es así que dentro del nódulo las bacterias reciben el nombre de bacteroides y es en esta forma y ambiente donde la enzima **nitrogenasa** es capaz de metabolizar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a compuestos más asimilables como amonio, se estima que este proceso realizado por BNL's contribuye en un 60 a 80% de la fijación biológica de nitrógeno en la atmósfera (Wan *et al.*, 2006), sin embargo existen varios factores que afectan o imposibilitan la nodulación de la planta, Valdés *et al.* (2014) observaron en sus ensayos de simbiontes de *Phaseolus vulgaris* que a un pH de 4.25 y en concentraciones de salinidad (NaCl) con valor de 2.5% los rhizobia presentan muy poca actividad y supervivencia siendo así incapaces de realizar la nodulación de raíces.

La importancia de esta interacción simbiótica no pasa desapercibida para el ser humano pues su estudio y aplicación en campos de cultivos podría ayudar a reducir la aplicación de fertilizantes sintéticos y con esto disminuir los costos de producción. En Brasil se han aplicado cultivos inoculados con cepas del género *Bradyrhizobium*, la cual ha logrado remplazar completamente el empleo de dichos fertilizantes obteniendo como resultado el ahorro de grandes cantidades de dinero que anualmente se emplean en estos

fertilizantes, Moreira *et al* (2012) estiman en de que un cultivo de 57 millones de toneladas de soya se ahorra mediante el uso de esta tecnología cerca de 3.3 millones de dólares.

### 2.2.1 Genero *Énsifer/Sinorhizobium*

Casida (1982) describe la morfología y el ciclo de vida de una bacteria presente en el suelo, a través de sus estudios describe las principales características de esta bacteria: gram negativa, bacilar, aeróbica, movilidad mediante flagelos, óptimo crecimiento de 20 a 37°C, crecimiento en medios con sal (1% a 4.5%) y pH (6 a 8), forma colonias circulares, convexas y semitranslúcidas con producción de exopolisacárido, es así que Casida nombra a esta bacteria *Ensifer adhaerens* siendo *Ensifer* un nuevo género. Más tarde Cheng *et al.*, (1988) acuña el termino *Sinorhizobium* para describir a una especie perteneciente al género *Ensifer*, esto da lugar a una gran controversia que sigue presente hasta hoy puesto que el género es considerado como el mismo *Ensifer/Sinorhizobium*.

Young (2003) propone el término *Sinorhizobium* para describir a las bacterias que presentan las características que Casida previamente había descrito, sin embargo, a través de investigaciones se rectifica que el nombre *Ensifer* es prioritario para nombrar a estas bacterias pues este fue el primero en ser utilizado.

### 2.3 Salinidad en suelos de cultivo

El exceso de diversas sales (NaCl, MgSO<sub>4</sub>, MgCl etcétera) en suelos cultivables hace que estos pierdan su fertilidad y la capacidad para ser explotados por diversos organismos pues dicho exceso aumenta la cantidad de iones disueltos cuando el suelo es irrigado (de La Peña y Pueyo, 2012), esto provoca cambios en los gradientes de concentración ocasionando que las plantas presenten dificultades para absorber el agua por medio de las raíces lo cual lleva a pérdida y disminución en la asimilación de los nutrientes (SEMARNAT, 2009; Martínez *et al.*, 2011 ) sobre todo en zonas donde la evaporación superficial y la cantidad de agua absorbida por parte de las plantas es mayor que la que se precipita (Fernández *et al.*, 2014), así mismo el exceso de salinidad afecta la actividad microbiana presente en los distintos sustratos, estos microorganismos en ocasiones están en contacto directo con las raíces de las plantas y pueden llegar a establecer relaciones con estas representando así un beneficio puesto que la planta logra obtener un desarrollo óptimo, crecimiento y producción de fruto con esta interacción biológica (FAO, 2009).

Diversos cultivos se ven afectados en su desarrollo y crecimiento por el incremento en la salinidad de los suelos (Figura 1.3-1) (Wicke *et al.*, 2011; Munns, 2004). Tan solo en

México la mayoría de cultivos son sensibles a la salinidad y su rendimiento baja considerablemente cuando son cultivados en medios con altas concentraciones de sal (Zahran, 1999; Barkla *et al.*, 2007); estos cultivos son fuente de ingresos económicos, así como principal fuente de alimentación para familias. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (1998, 2000) menciona que cerca de 831 millones de hectáreas a nivel mundial permanecían afectadas por la salinidad y como resultado se ha ocasionado una creciente demanda de nuevos sitios de cultivos que llevan a la deforestación de zonas para ser utilizadas para cultivo.

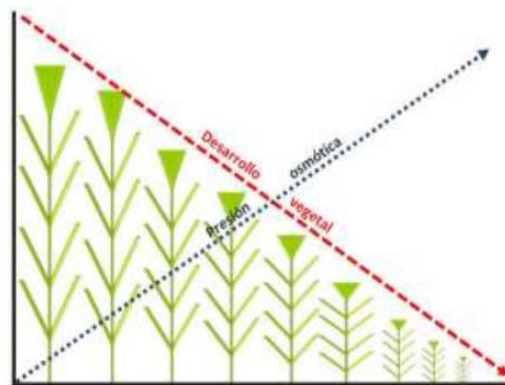


Figura 1.3-1 Desarrollo vegetal vs concentración de sales en suelo (Presión osmótica) (Mata-Fernández *et al.*, 2014).

Un factor importante que contribuye a la salinidad de los suelos es el uso incorrecto e indiscriminado de fertilizantes químicos pues ha ocasionado que terrenos con suelos aptos para el cultivo pierdan esta capacidad y queden inhabilitados durante mucho tiempo sin posibilidad de ser remediados en cortos periodos de tiempo, esto hace difícil el desarrollo de plantas para su uso agronómico y el establecimiento de una continua producción de alimentos.

La irrigación mediante sistemas de riego con aguas que provienen del subterráneo también ha contribuido en gran medida a generar suelos salinos pues estas aguas contienen iones como: sodio, calcio, magnesio y potasio, los cuales se quedan presentes en el suelo una vez que el agua se ha evaporado ocasionando su acumulación en cantidades excesivas, este proceso se ha denominado salinización por irrigación (Smith y Smith 2007; Lantke *et al.*, 2007) y da lugar a la formación de diversos compuestos salinos cuyo orden de impacto son: cloruro de sodio (NaCl), sulfato de calcio (CaSO<sub>4</sub>),

bicarbonato de calcio ( $\text{CaHCO}_3$ ), cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) y bicarbonato de magnesio ( $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ )

Para lograr determinar si un suelo es apto para el desarrollo de cultivos se han propuesto diversos métodos para medir la salinidad presente en suelos de los cuales el valor de la conductividad eléctrica (CE) es la más empleada. La CE tiene por unidades los milimhos por centímetro cubico ( $\text{mmhos}/\text{cm}^3$ ) o decisiemens por metro ( $\text{dS}/\text{m}$ ) (Barsuto *et al.*, 2008). Este valor de CE es proporcional a la temperatura del medio puesto que a mayor temperatura existe mayor conductividad, de esta manera los suelos pueden ser clasificados en base a su valor de CE y su utilidad para cultivos (Tabla 1.3-1). La CE indica la velocidad con la que la corriente eléctrica atraviesa una solución salina y esta medida es proporcional a la concentración de sales en dicha solución (Fernández *et al.*, 2014). Para combatir los problemas que representan los suelos salinos se han propuesto diversos mecanismos para neutralizar o bajar las concentraciones de ciertos iones que vuelven a un suelo improductivo, Ruvalcaba *et al.*, (2006) utilizan extractos de plantas de frijol y maíz que se presume reaccionan con los iones ocasionando que la conductividad del suelo disminuya, así mismo establece pruebas en medios líquidos con cloruro de sodio y extractos de frijol donde obtiene una disminución significativa de la CE.

CEs (dS/m)	Descripción
0-2	Suelos normales
2-4	Quedan afectados los rendimientos de los cultivos muy sensibles. Suelos ligeramente salinos.
4-8	Quedan afectados los rendimientos de la mayoría de los cultivos. Suelos salinos.
8-16	Sólo se obtienen rendimientos aceptables en los cultivos tolerantes. Suelos fuertemente salinos.
> 16	Muy pocos cultivos dan rendimientos aceptables. Suelos extremadamente salinos.

Tabla 1.3-1 Clasificación de los suelos en base a su conductividad eléctrica y uso para cultivos. (Montico, 2007).

Como se mencionó anteriormente las plantas no son las únicas afectadas por las altas concentraciones de sales en el suelo. Los diferentes tipos de microorganismos también ven afectado su rendimiento y supervivencia, dentro de estos microorganismos los más importantes son los Rhizobia, los cuales son en muchas ocasiones indispensables para la supervivencia y correcto desarrollo de los cultivos, estos microorganismos ven disminuida o incluso anulada su capacidad de interacción por la concentración de sales (Penttinen *et*

*al.*, 2013), a pesar de que algunos miembros del género *Rhizobium* poseen genes que ayudan al establecimiento de una simbiosis efectiva (Nogales *et al.*, 2001) la mayoría de microorganismos no tolera el medio con alto estrés osmótico cuyo efecto principal provoca el cambio en la morfología de las bacterias, deshidratación de las mismas y finalmente su muerte (Elboutahiri, *et al.*, 2010).

#### 2.4 Plásmidos

Los plásmidos son estructuras de ADN de doble hélice cerradas o circulares, tienen la particularidad de estar fuera del cromosoma y que se pueden replicar de manera independiente del ADN genómico. Tienen una longitud que varía desde unos pocos hasta algunos cientos de kilobases (Kb), contienen genes que son necesarios para el mantenimiento y replicación del mismo plásmido, algunos contienen genes que controlan una herencia estable como lo es para establecer la transferencia de una copia del plásmido mediante una conjugación bacteriana (Novick, 1981).

Los plásmidos no contienen genes que sean necesarios para el mantenimiento y la supervivencia de la bacteria, su ausencia no implica la muerte de la bacteria, pero su presencia provee beneficios adicionales como resistencia a algunos antibióticos e incluso tolerancia a temperaturas y valores extremos de pH. Los plásmidos más pequeños contienen solo algunos cientos de pares de bases y por lo general esto involucra un solo gen, los plásmidos más grandes contienen en su secuencia de 500 a 1000 genes y presentan al igual que los cromosomas una estructura de superenrollamiento, en ocasiones dicho superenrollamiento ocasiona que la estructura circular del plásmido se torne en una lineal. Diversos plásmidos de distintos tamaños, estructuras y funciones pueden convivir dentro de una misma bacteria (Lehninger, 1981).

#### 2.5 Transferencia de material genético (ADN) en bacterias

Los mecanismos por los cuales una bacteria logra obtener una diversidad genética son diversos y se extienden desde aquellos donde solo se necesita una bacteria en estado competente en medios con presencia de ADN exógeno (principalmente plásmidos) hasta aquellos métodos donde se involucran un segundo o tercer participante (conjugación y transformación), estos mecanismos son llamados de transferencia horizontal (bacteria-bacteria) de material genético debido a que son dos organismos sin parentesco los que realizan o participan en la transferencia de material genético (Llosa *et al.*, 2005).

Las bacterias adquieren material genético principalmente mediante tres mecanismos:

#### **a. Transducción**

El fenómeno de transferencia de material genético por transducción involucra a tres organismos, dos bacterias y un virus, el proceso inicia cuando el virus (bacteriófago) inserta su material genético dentro de la bacteria (donadora) para llevar a cabo su ciclo de reproducción, la entrada de material genético de origen viral en ocasiones propicia la separación y ruptura del ADN de la bacteria, el material genético de origen viral se apodera de la maquinaria metabólica de la bacteria y produce copias de sí mismo además de cápsides proteicas para generar nuevos virus, este proceso es denominado **Ciclo Lítico**, al generar nuevos virus algunos de ellos incorporan dentro de su cápside proteica material genético de la bacteria, este material genético de origen bacteriano viaja dentro del virus y ocasionalmente el virus buscará un nuevo hospedero (bacteria) para llevar a cabo su reproducción, el virus inserta el material genético de origen bacteriano y mediante una recombinación de sitios homólogos con el ADN de la bacteria “hospedera” se puede generar una nueva cepa que obtenga algún gen que favorezca su supervivencia en distintas condiciones adversas (Lehninger, 1981).

#### **b. Transformación**

La transferencia de material genético por medio de transformación solo involucra una sola bacteria, dicha bacteria necesita estar en un estado competente, esto quiere decir que necesita estar en un ambiente favorable donde se facilite la entrada de material genético del exterior (material genético exógeno), usualmente el material genético resulta ser un plásmido que se encuentra en el medio que rodea a la bacteria, las bacterias que logran incorporar ADN o plásmidos exógenos son llamadas transformantes y en ocasiones los plásmidos adquiridos confieren resistencia a uno o más antibióticos.

#### **c. Conjugación**

El método de conjugación para la transferencia de material genético involucra la unión física de células bacteriales, esta unión puede ser observada mediante microscopía electrónica, durante la unión de las dos bacterias se lleva a cabo el intercambio de material genético, la bacteria “donadora” posee genes que codifican para la formación de la estructura denominada “pili sexual”, mediante esta estructura se lleva a cabo el traspaso

del material genético el cual usualmente es un plásmido, aunque también existe la posibilidad de que la bacteria tenga la capacidad de transmitir una copia de su cromosoma, esta bacteria donadora también es llamada  $F^+$ , la bacteria que recibe el material genético, ya sea plásmido o una copia del cromosoma, actúa como “recipiente” y es representada con el símbolo  $F^-$ , los símbolos con los que se representan este tipo de bacterias usualmente atienden a si son capaces de establecer contacto físico e iniciar la transferencia de material genético ( $F^+$ ) o si no presentan dicha capacidad ( $F^-$ ) (Griffiths *et al.*, 2005).

Las bacterias “donadoras” ( $F^+$ ) poseen el plásmido F que es un segmento de ADN circular de aproximadamente 100 kb (Firth *et al.*, 1992) que contiene en su secuencia los genes que codifican para el origen de replicación (*ori t*) (Llosa *et al.*, 2005) y la formación del pili sexual el cual establece contacto con la bacteria “recipiente” y actúa como puente para que la información genética sea transferida o “bombeada” desde la célula “donadora” (Llosa *et al.*, 2002), así es como bacterias  $F^+$  son capaces de transmitir el material genético a bacterias que funcionan como recipientes  $F^-$ , una vez que una bacteria posee dicho plásmido en ocasiones también adquiere la capacidad de transmitir material genético a otras bacterias (Watson *et al.*, 2004).

## 2.6 Transposones o elementos genéticos transponibles (EGT)

Dentro de los genomas de los diferentes seres vivos en este planeta se encuentran secuencias de ADN que tienen la particularidad de poder replicarse e insertarse en diferentes posiciones del genoma (Judson *et al.*, 2000; Hamer *et al.*, 2001) estos son los elementos genéticos transponibles también llamados transposones o genes “saltarines”, están presentes en la mayoría de los genomas de los organismos del planeta desde el genoma humano donde cerca de 50% de su material genético son transposones hasta el maíz en el cual este tipo de componentes ocupa un 90% de su material genético. Los transposones fueron descubiertos por vez primera dentro de los componentes genéticos del Maíz por la Dra. Bárbara McClintock (1950), sin embargo no es hasta después que estos elementos son propiamente reconocidos en bacterias por tener la capacidad de “saltar” o insertarse en distintas posiciones del genoma.

Los transposones dentro de las bacterias pueden transponerse dentro del cromosoma principal o pasar a los plásmidos (San Miguel, 1996). Los transposones pueden ser clasificados dentro de dos tipos, aquellos que necesitan la acción de una transcripción

inversa y otros donde no es necesario llevar a cabo una transcripción inversa, son llamados Retrotransposones y Transposones ADN respectivamente.

Para que se presenten los movimientos de inserción del transposón a lo largo del genoma es necesario que se lleve a cabo una recombinación homóloga entre las secuencias de ADN en los extremos del transposón y el ADN de la célula hospedera, las secuencias que se encuentran a ambos lados del transposón son llamadas secuencias de inserción (IS), dichas secuencias son las que facilitan la inserción del transposón dentro de regiones de ADN hacia nuevos sitios. Las IS son secuencias cortas de ADN que se encuentran flanqueando al transposón y a menudo contienen la información para codificar la enzima “transposasa”, la cual lleva a cabo la acción de transposición, las secuencias de inserción poseen como principal característica ser secuencias repetidas e inversas, estos son componentes normales de diversos cromosomas o plásmidos de bacterias.

Los transposones pueden presentar elementos autónomos y elementos no autónomos. Los elementos autónomos tienen repeticiones invertidas en sus extremos y el gen que codifica para la enzima transposasa, es por esto que no necesitan de ningún otro factor externo para su inserción en distintas partes del genoma, por otro lado, los elementos no autónomos no contienen la secuencia que codifica para la enzima transposasa lo que ocasiona que se queden fijos en su sitio.

Cuando los transposones se mueven a menudo no muestran selectividad por un sitio específico al cual anclarse, esto da como resultado que puedan insertarse en lugares donde la secuencia de un gen sea interrumpida y por tanto el gen se quede inactivo. Este tipo de transposiciones son las principales causas de las mutaciones (Tomcsanyi *et al.*, 1990).

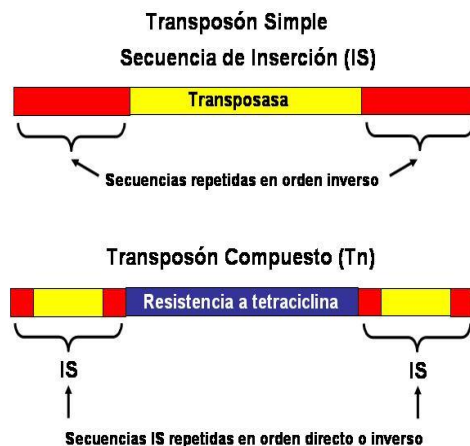


Figura 1.6-1 Esquema que muestra las diferencias entre un transposón simple y un transposón compuesto (Tn) (Rojas, 2012)

### 2.6.1 Transposones ADN

Este tipo de transposones contienen en su secuencia regiones que sirven como sitios de recombinación y genes que codifican proteínas que participan en el proceso de recombinación, los sitios de recombinación están presentes en los extremos del transposón, estas secuencias repetidas invertidas cumplen la función de anclaje al ADN para la recombinación, usualmente contienen de 16 a 40 pares de bases, la enzima responsable de la transposición es llamada **transposasa**, esta es la encargada de realizar el salto hacia otros lugares del código genético a través de cortes de escisión e inserción, además de genes para inserción los transposones ADN pueden contener otras secuencias que codifican para proteínas que pueden regular la transposición o que proveen alguna ventaja selectiva para su hospedero, por ejemplo diversos transposones ADN de bacterias contienen genes que codifican para proteínas que promueven resistencia a uno o varios antibióticos, (Watson *et al.*, 2004) las bacterias que poseen esta resistencia por medio de los transposones son clasificadas dentro de la familia **Tn** (Figura 1.6-1), la habilidad de los elementos genéticos transponibles para insertarse deliberadamente en el ADN ha ocasionado su estudio y modificación para su uso como agentes mutagénicos en la biología experimental principalmente en combinación con los plásmidos (Pray, 2008; Muñoz-Lopez y García Pérez, 2010).

### 2.6.2 pUT-MiniTn5

La mutagénesis insercional mediada por transposones utilizados como vectores de entrega en cuyas secuencias se encuentran genes de resistencia a antibióticos (utilizados como genes reporteros) se han vuelto una gran herramienta en el repertorio de las técnicas para la genética molecular logrando de esta manera la pérdida o ganancia de funciones en genomas bacterianos (Reznikoff *et al.*, 1999, Reznikoff, 2003; Cebolla *et al.*, 2010), existiendo así gran variedad de elementos transponibles que han sido bien estudiados (White *et al.*, 2004). Debido a la alta efectividad que poseen estos transposones para insertarse a lo largo del ADN, a su fácil visualización y comprobación de resultados estos transposones han tenido en los últimos 15 años a la bacteria *Escherichia coli* como “hospedero” o portador de dicho material. Dentro de la amplia gama de transposones el Tn5 ha sido ampliamente utilizado para la producción de mutaciones al azar en diversos modelos de estudio (Tomcsanyi *et al.*, 1990;<sup>71</sup>Goryshin *et al.*, 2000; Reznikoff *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2013) y así obtener información acerca de la función de determinados genes. El Tn5 es un transposón que tiene la capacidad de insertarse en el

genoma y causar la interrupción de un gen, inactivando su función, a pesar de su gran eficacia para el trabajo molecular el Tn5 contiene dentro de su secuencia el gen que codifica para la enzima transposasa (Reznikoff, 1993), la cual le permite al transposón insertarse en diversos sitios del genoma en repetidas ocasiones lo cual resulta contraproducente cuando se busca trabajar sólo con un evento de mutación, otras dificultades en el uso del Tn5 han sido que una vez dentro del genoma bacteriano funciona como inmunizante y no permite la inserción de un segundo transposón, así mismo su estabilidad no está garantizada pues su remoción presenta la reversión de la cepa a su estado silvestre, en consecuencia se derivó una segunda herramienta genética del Tn5 que fuera capaz de resolver los problemas que presentaban la utilización del Tn5, es así como De Lorenzo et al., en 1992 desarrollan el transposón: mini-Tn5 (Herrero *et al.*, 1990).

El pUT-mini Tn5 es un plásmido de entrega de aproximadamente 5.2Kb que contiene un transposón (mini-Tn5) que puede contener los genes (casetes) que confieren resistencia a diferentes antibióticos (ej. estreptomicina, gentamicina), la región del transposón (EGT) mini-Tn5 tiene la particularidad de ser capaz de insertarse al cromosoma bacteriano mediante el plásmido de entrega pUT, esto es posible mediante la actividad de una transposasa que esta codificada en el gen *tnp*, esta transposasa se encuentra codificada en CIS en el plásmido pero no forma parte del elemento mini-Tn5, lo cual impide que el transposón se inserte en otra parte del genoma una vez que se ha establecido. Otros componentes del plásmido son un origen de replicación *oriR6k*, el cual es dependiente de la proteína Lambda pir, en este segmento se encuentra codificado un gen de resistencia a ampicilina, este gen no se transcribirá en bacterias que no tengan capacidad de sintetizar dicha proteína, por lo tanto la resistencia a el antibiótico no se manifestará, así mismo posee un sitio de movilización *mobrp4* que le brinda la capacidad al plásmido de ser transferido sin ayuda de una tercera cepa (helper)(Cebolla *et al.*, 2010).

Al ser derivado del Tn5 el mini-Tn5 es utilizado principalmente por tres aspectos que lo hacen efectivo: el mini-Tn5 presenta 1) alta frecuencia de trasposición en diferentes bacterias gram-negativas con 2) pequeñas secuencias blanco de transposición además de que 3) al llevarse a cabo la inserción del mini-Tn5 dentro del genoma este presenta gran estabilidad una vez que se inserta. Los transposones mini-Tn5 han simplificado la generación de mutantes por inserción y la introducción de fragmentos de ADN al

cromosoma de una gran diversidad de bacterias gram-negativas incluyendo bacterias entéricas y bacterias típicas del suelo (Llamas *et al.*, 2000).

Existen diversos transposones mini-Tn5, cada uno posee uno o varios diferentes genes de resistencia a antibióticos que funcionan a manera de genes reporteros, los transposones mini-Tn5 actúan en conjunto con los plásmidos (plásmidos de entrega), uno de los plásmidos más empleados es el pUT, es así que en conjunto el pUT-mini-Tn5 es utilizado como herramienta genética gracias a su gran estabilidad y alta cadencia de resultados (de Lorenzo y Timmis, 1994; de Lorenzo *et al.*, 1998).

Los vectores pUT mini-Tn5 son usados para insertar cualquier fragmento de ADN dentro del cromosoma de bacterias gram negativas mediante la clonación de la región mini-Tn5, debido a que la región *tnp* se encuentra fuera del transposón esta se pierde en cuanto se lleva a cabo la inserción y solo se genera un evento de transposición por cada cepa presentando así gran estabilidad al integrarse al cromosoma bacteriano además de que la inserción es transmisible a las células hijas (De Lorenzo *et al.*, 1990).

El uso de los vectores pUTmini-Tn5 ha cobrado gran importancia para la manipulación genética y el avance en la ingeniería genética en bacterias, principalmente en su aplicación para generar mutagénesis insercional. Existen estudios donde el empleo del transposón mini-Tn5 ha presentado alta eficacia para generar una gran cantidad de cepas mutantes de diversas bacterias, Overhage *et al.* (2007) reporta la gran estabilidad del transposón al trabajar con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, por otro lado Cortés (2008) destaca la eficacia del transposón mini-Tn5 para generar mutaciones aleatorias en el genoma de *Pseudomonas putida*, inclusive los alcances y aplicaciones de esta herramienta para mutagénesis insercional van más allá de simplemente generar una banca de mutantes Leprince *et al.* (2012) emplea el mini-Tn5 como aerodinamizador (recortar la longitud de un genoma) del genoma de *Pseudomonas putida*. En el campo de la medicina el mini-Tn5 ha sido utilizado para obtener cepas patógenas mutantes que presenten deficiencias en su crecimiento para ser utilizadas como vacunas (Leung *et al.*, 1997).

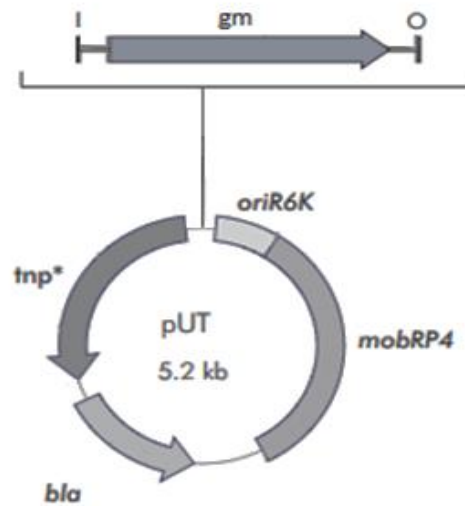


Figura 4.2.1 Esquema del plásmido pUT/mini-Tn5Gm. (Junker *et al.*, 1990).

## 2.7 Justificación

Debido al amplio deterioro de los suelos de cultivos ocasionado por altas concentraciones de sal y a los bajos rendimientos de cultivos de leguminosas que se obtienen de estos suelos es demandante que los microorganismos que forman simbiosis con estas plantas sean capaces de sobrevivir en estas condiciones, es por ello que es de suma importancia obtener conocimientos de los posibles genes que codifiquen proteínas que asistan a la supervivencia del microorganismo a estas condiciones.

Encontrar mecanismos que hacen de *Ensifer sp (Phaseolus filiformis)* LEM451 una cepa tolerante a sal.

### III. HIPÓTESIS-OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

- Se podrá caracterizar a las cepas mutantes que resulten ser sensibles a salinidad mediante la información obtenida de los genes que hayan sido interrumpidos.

#### 3.2 Objetivo General

- α Formar parcialmente una banca de mutantes de la cepa *Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM451 y caracterizar las mutantes que resulten ser sensibles a la NaCl.

#### 3.3 Objetivos Particulares

- Crear una banca parcial de mutantes de la cepa *Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM 451 empleando el método de conjugación biparental utilizando el plásmido pUT-miniTn5-Gm
- Realizar pruebas de tolerancia a NaCl en medio TY con distintas concentraciones a la banca de mutantes resultantes de la conjugación.
- Caracterizar las mutantes sensibles a NaCl mediante la secuenciación de la región de ADN interrumpida por el transposón y búsqueda de secuencias similares en NCBI.

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico: La cepa silvestre utilizada pertenece a la colección del cepario del Laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP, esta cepa fue aislada de nódulos de plantas de *Phaseolus filiformis* en Baja California Sur, en la Bahía Santa María, playa Guadalupe, Los Cabos con ubicación 22°55'51.5" al norte, 109°48'55.3" al oeste y 9.5 msnm (Cuéllar-Sánchez, 2011).

La cepa *Escherichia coli* S17.1 (pUT-miniTn5-Gm) es una cepa que posee el plásmido pUT-miniTn5-Gm mismo que le confiere resistencia a gentamicina, además de poseer una segunda resistencia a ampicilina en un vector suicida, debido a su origen de replicación es dependiente de una proteína específica, esta cepa fue amablemente proporcionada por el Dr. Jesús Muñoz Rojas.

Objetivo 1: Conjugación biparental - *Escherichia coli* S17.1 y *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451

##### 4.1 Condiciones y medios de crecimiento

Para llevar a cabo la conjugación biparental la cepa donadora (*Escherichia coli* S17.1) se incubó en 5ml de medio Luria Bertani (LB) (Anexo 1) adicionado con gentamicina a 10 µg/ml, por otro lado, la cepa aceptora (*Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451) se incubó en 10 ml de medio triptona-levadura (TY), ambas cepas se incubaron en agitación (180rpm) a 30°C por un periodo de 24 h.

##### 4.2 Condiciones de conjugación

Transcurridas 24h aplicó centrifugación ambas cepas: *E. coli* S17.1 a 640 X g durante 3 minutos y *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451 a 1200 X g durante 5 minutos, al obtener el pellet de cada cepa este se resuspendió en 5ml y 3ml, respectivamente de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>). En un tubo eppendorf se agregó en proporción 1:5 las cepas *Escherichia coli* S17.1 (pUT-miniTn5-Gm) y *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM

451, respectivamente, se centrifugó el contenido a 640 X g durante 3 minutos, se resuspendió el pellet que se obtuvo de esta centrifugación con 50 µl de MgSO<sub>4</sub>, mismos que se colocaron sobre una placa de medio TY sólido, una vez seco esta dilución se incubó a 30°C durante 24 horas en condiciones de humedad, junto con estas placas de incubación se colocaron otras dos placas con ambas cepas sin conjuguar que sirvieron como controles.

#### 4.3 Recuperación de conjugación y diluciones empleadas

Después de las 24 horas de conjugación se recuperó el tapete celular y las cepas control con el empleo de una espátula estéril, se solubilizaron en medio TY; a partir de este pie de cultivo se elaboraron diluciones seriadas en base 10 (10<sup>0</sup>-10<sup>3</sup>) teniendo un total de 4 diluciones por ensayo de conjugación más las dos cepas control sin diluciones. Se inocularon 200 µl de las diluciones obtenidas por sembrado masivo con ayuda de una varilla de vidrio estéril sobre placas con medio de selección TYRF (Tripton-Levadura-Rojo de Fenol) adicionado con gm 10 µg/ml y Km 20 µg/ml, es sobre este medio donde únicamente fueron capaces de crecer aquellas mutantes a las cuales se les insertó el transposón con resistencia a gm. Se sembraron un total de 10 placas por ensayo de conjugación: 1 placa con disolución 10<sup>0</sup>, 4 placas con disolución 10<sup>1</sup>, 4 placas con disolución 10<sup>2</sup> y 1 placa con disolución 10<sup>3</sup>. Estas placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas para permitir el crecimiento de las UFC's mutantes. Las dos placas de cepas control fueron incubadas por 24h para observar crecimiento y descartar posibles contaminantes.

#### 4.4 Selección y contra selección de transconjugantes

La frecuencia de conjugación de estas dos cepas es de 3 x 10<sup>4</sup> (Rocha-Bonilla, tesis de doctorado, 2014), las UFC's resultantes fueron sometidas a prueba de contra selección en placas de medio TY adicionado con ampicilina 100 µg/ml. Las cepas mutantes que no presentaron crecimiento en placa con TY-Ap fueron almacenadas en placas multipozos en glicerol al 25% a -80°C para su preservación y posterior evaluación a estrés salino.

#### Objetivo 2: Evaluación de crecimiento a estrés salino

#### 4.5 Pruebas de crecimiento en sal de cepas mutantes.

Se realizó una prueba cualitativa de tolerancia a la salinidad empleando un replicador de colonias, cada cepa mutante fue puesta a crecimiento en medio TY con NaCl a

concentraciones de 200 mM y 300 mM; las mutantes fueron incubadas durante 6 días (Wei *et al.*, 2004) y su crecimiento fue registrado y evaluado por periodos de 24 horas se realizó la comparación de crecimiento empleando medio TY sin sal.

#### 4.6 Evaluación cuantitativa de crecimiento de transconjugantes sensibles a sal

Las cepas mutantes que presentaron un déficit de crecimiento en medios salinos con respecto a la cepa silvestre (*Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451) en las dos concentraciones de sal empleadas (200 mM y 300 mM) fueron cuantificadas por medio del ensayo *drop plate*. Se cuantificaron las posibles mutantes con sensibilidad a sal en medio TY con concentraciones de NaCl (200 mM, 300 mM, 400 mM y 450 mM), se llevó a cabo el conteo de UFC's por triplicado en diluciones desde  $10^0$  hasta  $10^7$  obteniendo un total de 8 concentraciones a evaluar por cada cepa candidata.

##### 4.6.1 Ensayo Drop Plate:

###### i. Incubación

Las cepas mutantes de interés, con déficit de crecimiento en medio con NaCl, fueron incubadas en medio TY a 30°C -180rpm durante 24h.

###### ii. Ajuste de densidad óptica (D.O.)

Las cepas mutantes se ajustaron a una D.O.<sub>600</sub> inicial de 0.05, se incubaron a 30°C a 180 rpm hasta obtener una lectura en el espectrofotómetro (Jenway 6305 Spectrophotometer) de D.O.<sub>600</sub> de 0.5 pues en esta densidad la cepa *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451 se encuentra en la etapa de crecimiento exponencial temprano, esta fase es alcanzada aproximadamente en 7h.

###### iii. Diluciones y cantidades

Al obtener a las cepas transconjugantes de interés en una D.O.<sub>600</sub> de 0.5 se hicieron diluciones en base 10 ( $10^0$ - $10^7$ ) de estas diluciones se tomó un volumen de 10 µl para colocar sobre placas Petri con medio de cultivo TY con distintas concentraciones de NaCl (200 mM, 300 mM, 400 mM y 450 mM), el ensayo se llevó a cabo por triplicado, una vez que el volumen fue puesto sobre el medio este se dejó secar y finalmente las placas fueron incubadas a 30 C° durante 24 h para realizar el conteo de las UFC mutantes.

#### 4.7 Extracción de ADN plasmídico y genómico:

Los siguientes kits fueron utilizados para la extracción de material genético de las cepas mutantes sensibles a sal y para la extracción de plásmido de la cepa *Escherichia coli* S17.1 (pUT-miniTn5-Gm), el procedimiento seguido fue el mismo de las instrucciones del fabricante.

ADN genómico: Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega)

ADN plasmídico: Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen Corp.)

#### 4.8 Amplificación de cassette de resistencia a gentamicina

A manera de comprobación se llevó a cabo una PCR para amplificar el casete de resistencia a gentamicina de las cepas mutantes que presentaban sensibilidad a NaCl, los perfiles de temperaturas de la reacción se muestran en la figura 4.2.3. Se utilizaron los iniciadores aacC1F (5'-TCC ATG GCT GCT CTTG-3') y aacC1R (5'-ACC TGG CGG CGT TGT GAC-3') (Rocha-Bonilla, tesis de doctorado, 2014) en concentración de 20 pmol/ml. El volumen total de reacción fue de 25 µl por cada muestra consistiendo en lo siguiente: 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de nucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 µl amortiguador de enzima, 18.12 µl de H<sub>2</sub>O, 0.12 µl enzima Taq Polimerasa (Biorad) y 1 µl de cada iniciador.

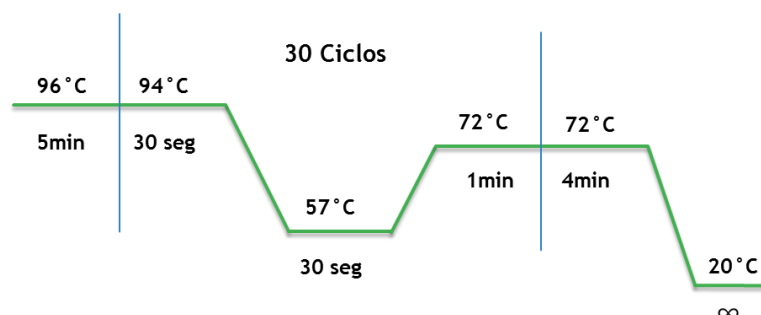


Figura 4.2.4 Perfil de temperaturas utilizado para la amplificación del casete de resistencia a Gm del transposón mini Tn5, Iniciadores utilizados: aacC1R y aacC1F.

### Objetivo 3: Caracterización de cepas mutantes sensibles a NaCl

#### 4.9 Pruebas moleculares a cepas mutantes sensibles a NaCl

Las cepas mutantes que presentaron una disminución en su crecimiento en medios con distintas concentraciones de NaCl y que fueron evaluadas cuantitativamente fueron objeto de la prueba molecular de análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para determinar si efectivamente eran mutantes de la cepa *Ensifer* sp.

(*Phaseolus filiformis*) LEM 451 además fueron caracterizadas mediante PCR arbitrarias, secuenciación de ADN y búsquedas de secuencias en NCBI mediante BLASTn.

Se aplicó la prueba RFLP a los genes *rpoB* y *16SrRNA* de tres cepas mutantes y a las dos cepas conjugantes utilizando las enzimas *AluI* e *HinfI* (Tabla 4.10.1). La prueba RFLP para el producto de amplificación del casete de resistencia a gentamicina fue aplicada para dos cepas mutantes y la cepa donadora de material genético *Escherichia coli* S17.1 (pUT-miniTn5-Gm). El volumen total de reacción ocupado para la PCR de los genes *rpoB* y *16SrRNA* fue de 25 µl por cada muestra consistiendo en lo siguiente: 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de nucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 µl amortiguador de enzima, 18.12 µl de H<sub>2</sub>O, 0.12 µl enzima Taq Polimerasa (Biorad) y 1 µl de cada iniciador.

Enzima	Sitio de Corte	Tiempo de Incubacion-T°
<i>Hinf I</i>	5' -G*ANTC-3'	3h a 30°C
<i>Alu I</i>	5' -AG*TC-3'	3h a 30°C

Tabla 4.10.1 Especificaciones de las enzimas utilizadas para la prueba RFLP

#### 4.9.1 Amplificación del gen *rpoB*

El gen *rpoB* se amplificó con el perfil de temperaturas descrito en la figura 4.10-1, este gen codifica para la sub-unidad beta de la RNA polimerasa y es utilizado en este tipo de pruebas debido a que presenta grandes aportaciones como marcador molecular en estudios de ecología microbiana e incluso se ha propuesto como marcador complementario o alternativo al gen *16SrRNA* (Case *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2009; Martens *et al.*, 2008). La amplificación se llevó a cabo con los iniciadores *rpoB83F* (5'-CCT SAT CGA GGT TCA CAG AAG GC-3') y *rpoB1061R* (5'-AGC GTG TTG CGG ATA TAG GCG3') (Martens *et al.*, 2008)

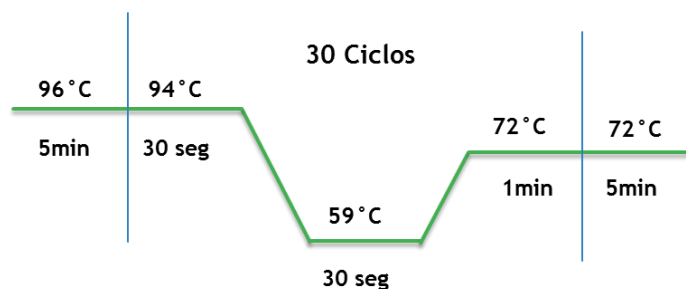


Figura 4.10-1 Perfil de temperaturas utilizado para la amplificación del gen *rpoB*. Iniciadores utilizados: *rpoB83F* y *rpoB1061R*.

#### 4.9.2 Amplificación del gen 16SrRNA

El gen 16SrRNA se amplificó con el perfil de temperaturas descrito en la figura 4.3.2-2. Este gen se es ampliamente utilizado como marcador molecular para estudios de filogenia (Woese *et al.*, 1977), sus principales características como buen marcador molecular radican en su presencia en todos los organismos procarióticos conocidos, en los cuales la función que cumple este gen se ha visto prácticamente inalterada durante el proceso de evolución y junto con su longitud de pares de bases lo hacen el gen housekeeping más utilizado para este tipo de prueba (Janda y Abbott, 2007). Se utilizaron los iniciadores universales UN27F (5'-TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y UN1392R (5'-CAG GGG CGG TGT GTA CA-3') (Biodiversa Inc., Mexico).

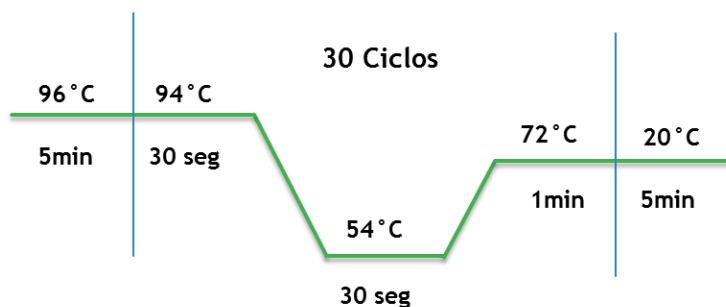


Figura 4.3.2-2 Perfil de temperaturas utilizado para la amplificación del gen 16sr RNA. Iniciadores utilizados: UN27F y UN1392R.

#### 4.9.3 Análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

- i. **Digestión con enzimas:** Una vez obtenido el producto de PCR para los genes *rpoB* y *16srRNA* este se digirió a 30°C durante 3h con las enzimas de restricción *AluI* e *Hinfi*; utilizando 2 µl de enzima de restricción, 2 µl de amortiguador de enzima y 10 µl de producto de PCR de cada gen.
- ii. **Revelado:** Una vez obtenidos los productos de digestión fueron evaluados por medio de electroforesis en gel de agarosa (1.5%), teñidos por medio de Gel Red™ y revelados en un transiluminador UV para visualizar las diferentes bandas de peso molecular.

#### 4.9.5 PCR arbitraria

De los diversos métodos por los cuales se puede conocer el segmento de nucleótidos donde se insertó el transposón (Kwon y Ricke *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 1997) en este ensayo se empleó la técnica de PCR arbitraria para poder localizar dicho sitio de inserción del transposón dentro el genoma de la cepa mutante (Das *et al.*, 2005). Los iniciadores utilizados (Tabla 4.10.4-1) son los descritos por Duque *et al.*, (2007) mismos que fueron empleados en concentración de 20pmol/μl en reacciones de 25 μl por cada muestra, las cuales contenían: 0.75 μl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μl de deoxynucleótidos trifosfato (dNTPs) 2.5 μl amortiguador de enzima, 17.12 μl de H<sub>2</sub>O, 0.12 μl enzima Taq Polimerasa (Biorad), 1 μl de iniciador TnExt2, 0.5 μl de iniciador CEKG2B y 0.5 μl de iniciador ARB1A, estos iniciadores para una primera ronda de amplificación y para una segunda ronda 1 μl de iniciador ARB2A y 1 μl de iniciador Tnint, los perfiles de temperatura empleados para las dos rondas se muestran en las figuras 4.10.4-1 y -2.

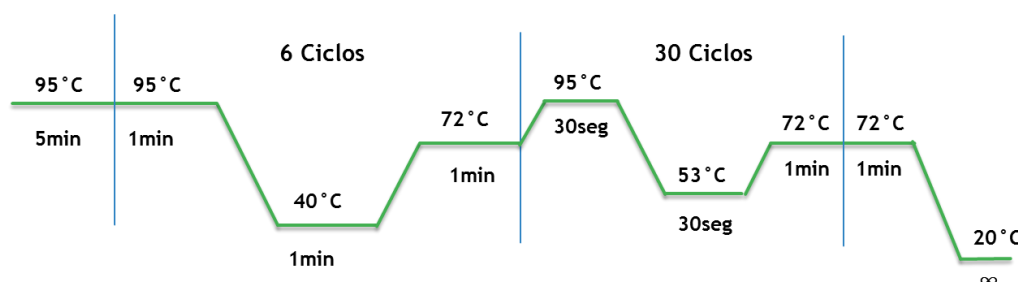


Figura 4.3.2-1. Perfil de temperaturas utilizado para la primera ronda de PCR Arbitraria, Iniciadores utilizados: ARB1A, TNEXT2 y CEKG2B

Primers	Secuencia (5' - 3')	Ronda
ARB1A	CCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT	1
ARB2A	CCACGCGTCGACTAGTAC.	2
TNEXT2	CITTATTGATTCCATTTTACT	1
TNINT	GACCTGCAGCATGCAAGCTTCGGC	2
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC	1

Tabla 4.10.4-1 Iniciadores, secuencias de iniciadores y ronda de utilización para PCR Arbitraria.

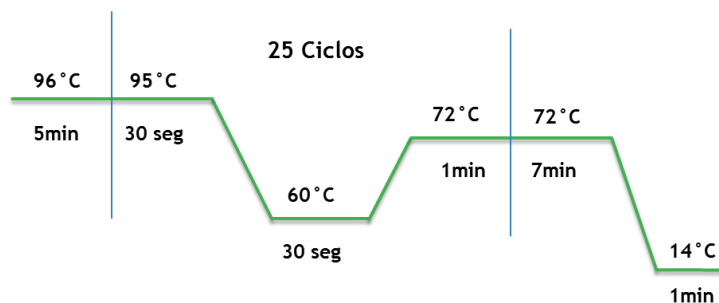


Figura 4.3.2-2. Perfil de temperaturas utilizado para la segunda ronda de PCR-Arbitraria, Iniciadores utilizados: ARB2A y TNINT

La PCR Arbitraria consta de dos rondas de amplificación una primera utilizando tres iniciadores de los cuales uno (TNEXT) se une específicamente a la región terminal del transposón mini Tn5 y los otros dos (CEKG2B y ARB1A) se anclan a regiones inespecíficas del genoma, una vez completa la primera ronda de amplificación la región resultante se utiliza como templado para la segunda ronda de amplificación donde un iniciador reconoce la región interna del transposón (TNINT) y otro iniciador inespecífico (ARB2) se ancla a una secuencia al azar de la cadena templada, el resultante de este producto de PCR es una secuencia de nucleótidos que contiene información del sitio de anclaje del transposón en el genoma de la cepa de interés (Figura 4.10.4-3).

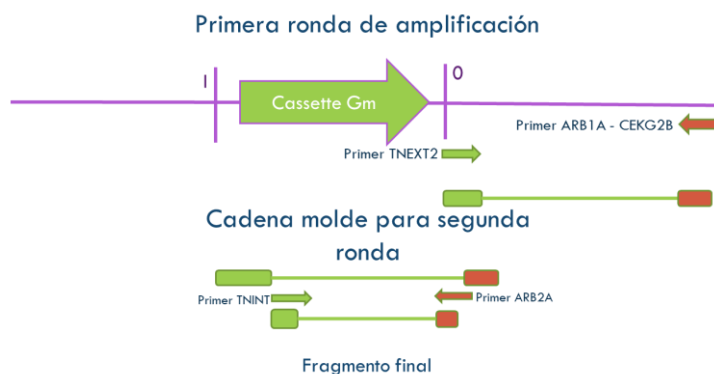


Figura 4.10.4-3 PCR arbitraria. En la primera ronda de amplificación se obtiene una cadena que será utilizada como cadena templada para la segunda ronda de la cual se obtendrá el fragmento para analizar la secuencia.

La PCR arbitraria ha sido uno de los métodos más utilizados para el reconocimiento de secuencias específicas de ADN (Qimron *et al.*, 2003), se ha empleado la PCR arbitraria en diversos modelos de estudio donde se han obtenido resultados que son compatibles y reproducibles (Knobloch *et al.*, 2003) no solo en cuestión de reconocer el sitio de inserción

de un transposón (Rich *et al.*, 1990) si no también para distinguir serovares de diversas cepas (Brousseau *et al.*, 1993).

#### 4.9.6 Secuenciación de productos de PCR arbitraria y búsqueda de secuencias similares en NCBI.

Se midió la concentración de ADN total del producto de PCR Arbitraria mediante un *Nano Drop* (Thermo scientific™) mismo que fue enviado a servicios biogenómicos del CINVESTAV Irapuato para su secuenciación.

Se utilizó el programa Bioedit versión 7.0.8 para editar las secuencias obtenidas de las cepas con sensibilidad a NaCl, las secuencias fueron sometidas a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el sitio NCBI (National Center for Bioinformation) para encontrar secuencias similares. Los resultados de la búsqueda fueron traducidos a aminoácidos para realizar una segunda búsqueda en proteínas, y saber con qué tipo de proteínas tienen homología estas secuencias similares y, de esta manera, tener una idea del papel que desarrollan dentro del microorganismo, así como obtener información de otros organismos, con o sin relación, que poseen estas proteínas.

#### 4.9.7 Prueba de resistencia a antibióticos

Para iniciar la caracterización se realizó la prueba de resistencia a 7 antibióticos utilizando los sensidiscos de marca Biorad™. Para el ensayo se utilizó 200 µl de cepa en medio TY a una densidad óptica de 0.5 a 600nm al espectrofotómetro mismos que fueron sembrados empleando una varilla de vidrio estéril en una placa con medio TY sólido, los sensidiscos fueron colocados sobre el medio a una equidistancia mediante una pinza estéril, los antibióticos y sus concentraciones se presentan en la tabla 4.10.7-1. Se incubó la placa a 30C° y se tomó lectura a las 48h.

Antibiótico	Concentración
Penicilina	10U
Neomicina	30µg
Cloranfenicol	30µg
Tetraciclina	30µg
Vancomicina	30µg
Estreptomicina	30µg
Ácido Nalidixico	30µg

Tabla 4.10.7-1 Antibióticos y concentraciones utilizadas para la prueba de resistencia.

## V. RESULTADOS

5.1 Construcción de la banca de transconjugantes mediante transposición insercional. Se generaron un total de 6300 cepas mutantes mediante la conjugación biparental, las cuales fueron sometidas a prueba de crecimiento en medios con TY-Ap 100 µg/ml y TY RF-Gm 10 µg/ml y Km 20 µg/ml (Figura 5.1-1) para comprobar que estas cepas mutantes pertenecían a la cepa silvestre *Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM451.

La cepa silvestre *Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM45 es incapaz de sintetizar la proteína Lambda pir, es por esto que la resistencia al antibiótico ampicilina que posee el pUT-miniTn5-Gm se pierde en cuanto este material genético es transferido a esta cepa pues no se puede transcribir este gen, perdiendo así la resistencia a este antibiótico, lo anterior indica que el único elemento insertado en el genoma ha sido el transposón, llevándose a cabo solo un evento de transposición por cepa. Si la resistencia a ampicilina siguiera presente dentro de la cepa mutante significaría que la enzima transposasa codificada por el gen *tnp* continuaría promoviendo el movimiento del transposón a lo largo del genoma de la cepa silvestre, dando lugar a transposiciones múltiples las cuales no fueron consideradas para el presente trabajo, pues solo fueron objeto de estudio aquellas mutantes con un solo evento de transposición al azar. Dichas cepas mutantes que son capaces de crecer en medios con antibióticos kanamicina y gentamicina y al mismo tiempo son incapaces de crecer en medios con ampicilina formaron parte de la banca de mutantes.

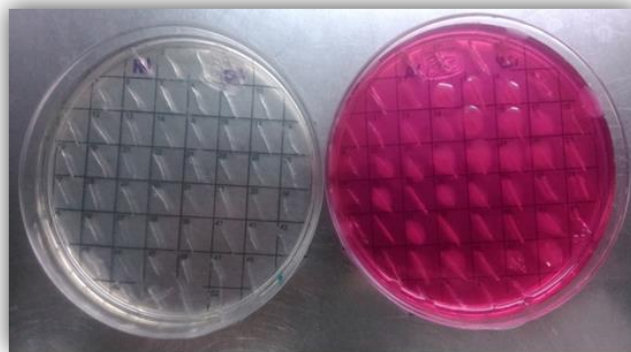


Figura 5.1-1 Placa izquierda medio TY-Ampicilina (sin crecimiento), placa derecha medio TY-RF Gentamicina/Kanamicina (con crecimiento)

## 5.2 Pruebas en NaCl de banca de mutantes

Se obtuvieron un total de 5 cepas mutantes sensibles a NaCl: **003-H1**, **003-A6**, **003-D1**, **036-B12** y **041-G1**. El crecimiento de estas 5 cepas mutantes fue deficiente en medio TY con concentración de 300mM de NaCl. (Figura 5.2-1).



Figura 5.2-1 Se observa el crecimiento (deficiente) en medio TY-300 mM NaCl de dos cepas mutantes sensibles a sal: 038-E6 y 036-B12.

## 5.3 Amplificación y digestión del casete de resistencia a Gm

Las cepas mutantes con sensibilidad de crecimiento en NaCl y la cepa donadora del material genético *Escherichia coli* S17.1 (pUT mini Tn5-Gm) presentaron los perfiles esperados de peso y número de fragmentos de ADN al ser digerido el casete de resistencia a Gentamicina, esto mediante una previa simulación de corte *in silico* con la enzima que se utilizaría. El número de fragmentos resultantes y sus pesos en pares de bases (400 y 100 pb) obtenidos en la digestión con la enzima *Hinfl* fueron los esperados al analizar previamente los sitios de restricción de esta enzima, indicando así que efectivamente el casete de resistencia a Gentamicina se encontraba presente en las cepas transconjugantes sensibles a NaCl y en nuestra cepa donadora de material genético *Escherichia coli* s17.1 (pUT-miniTn5-Gm) (Figura 5.3-1).

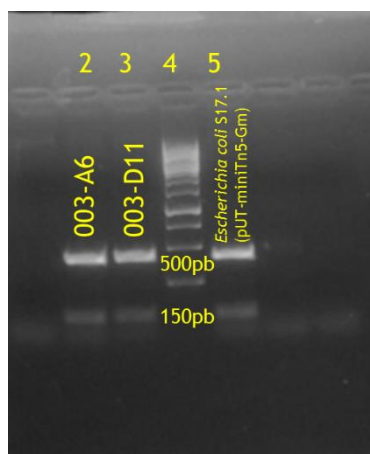


Figura 5.3-1 Fragmentos de digestión de casete de resistencia a Gm de dos cepas transconjugantes sensibles a sal (2 y 3) y de amplificación de casete de resistencia a gentamicina (5). Marcador de Peso Molecular 1kb (4).

Se obtuvieron dos fragmentos uno de 400pb y otro de 150pb.

#### 5.4 Evaluación cuantitativa de crecimiento de transconjugantes sensibles a sal

Las cepas sensibles a sal (**003-H1, 003-A6, 003-D11, 036-B12 y 041-G1**) mostraron un crecimiento normal sin diferencias notables en comparación con la cepa silvestre en la prueba control (TY- sin NaCl) y en concentraciones de NaCl de 100 mM y 200 mM obteniendo valores similares para el conteo de UFC/ml durante los 5 días de crecimiento (Figuras 5.4.1, 2 y 3). Por otra parte, las cepas mutantes presentaron una marcada disminución en comparación con la cepa silvestre en el número de UFC/ml en crecimiento en medio TY con concentraciones de NaCl a 300 mM, 400 mM y 450 mM (Figuras 5.4.4, 5 y 6).

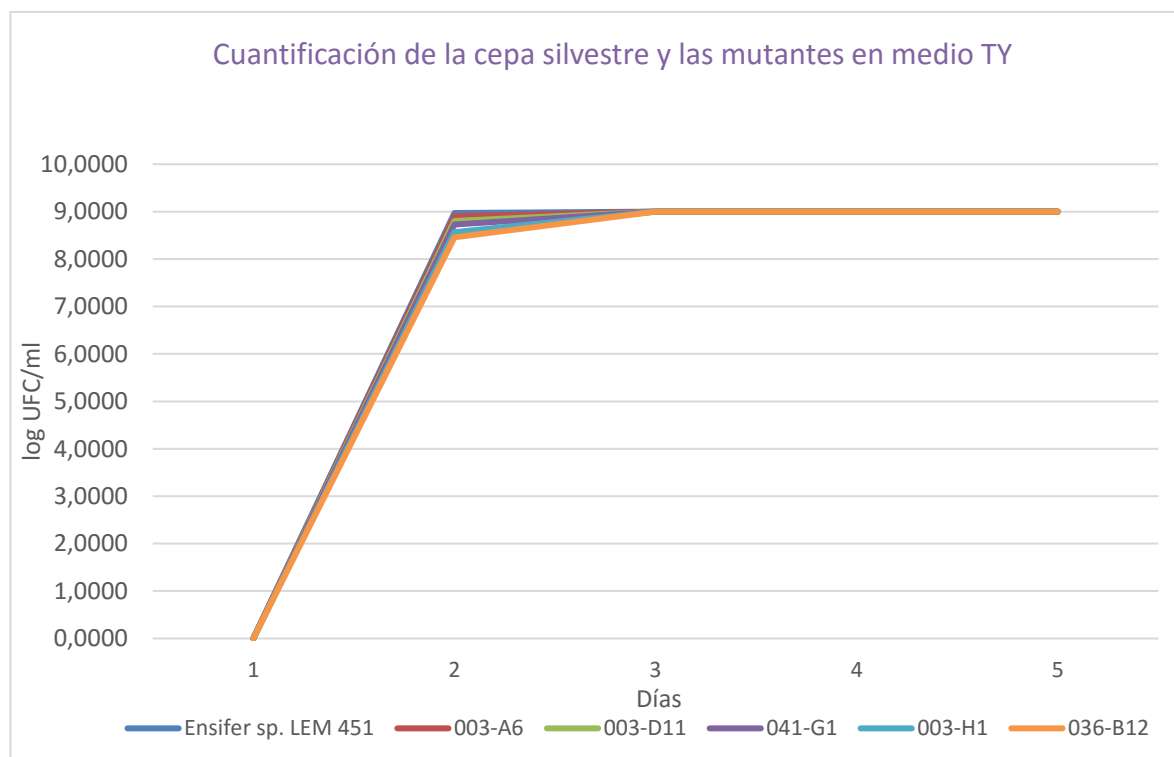


Figura 5.4.1 Gráfica de crecimiento de mutantes sensibles a sal y cepa silvestre (azul) en medio TY-sin NaCl. Se observa un crecimiento con valores muy parecidos.

Septiembre de 2016

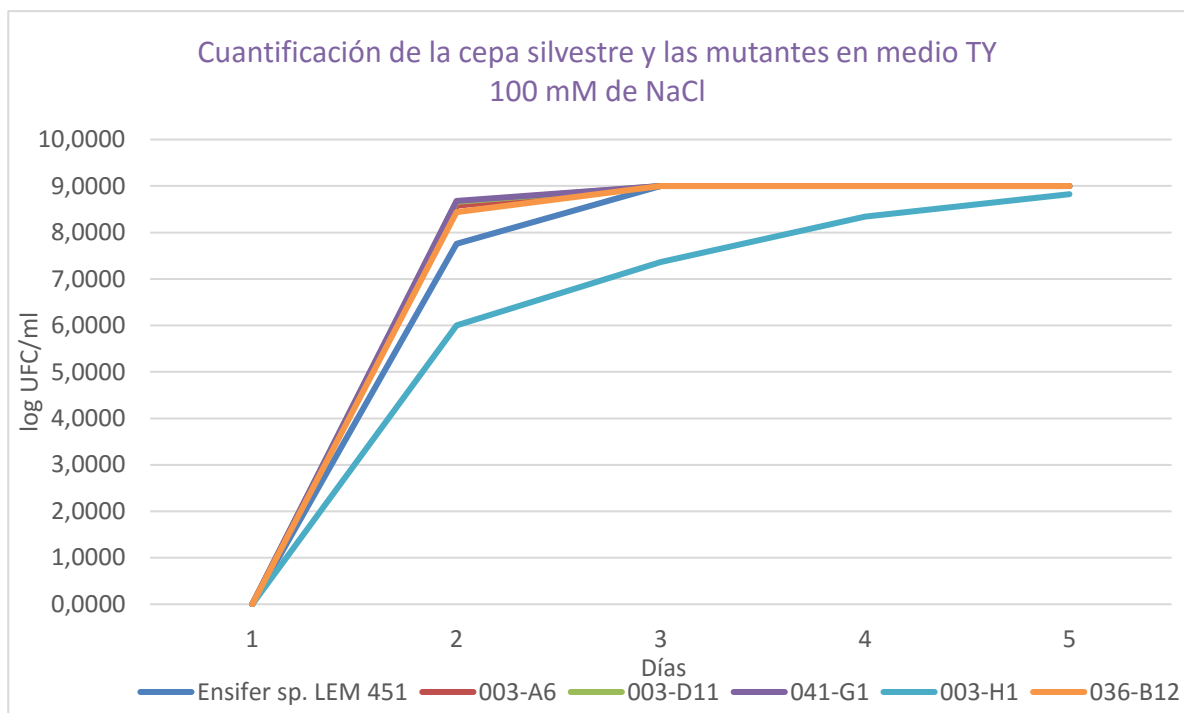


Figura 5.4.2 Gráfica de crecimiento de mutantes sensibles a sal y cepa silvestre (azul) en medio TY- 100 mM NaCl. Se observa un crecimiento con valores muy parecidos, con un inicio de crecimiento al día 1 para todas las cepas mutantes sensibles a NaCl y al alcanzar el día 5 la densidad es similar en todas las cepas pues los valores de crecimiento UFC/ml llegan a ser los mismos.

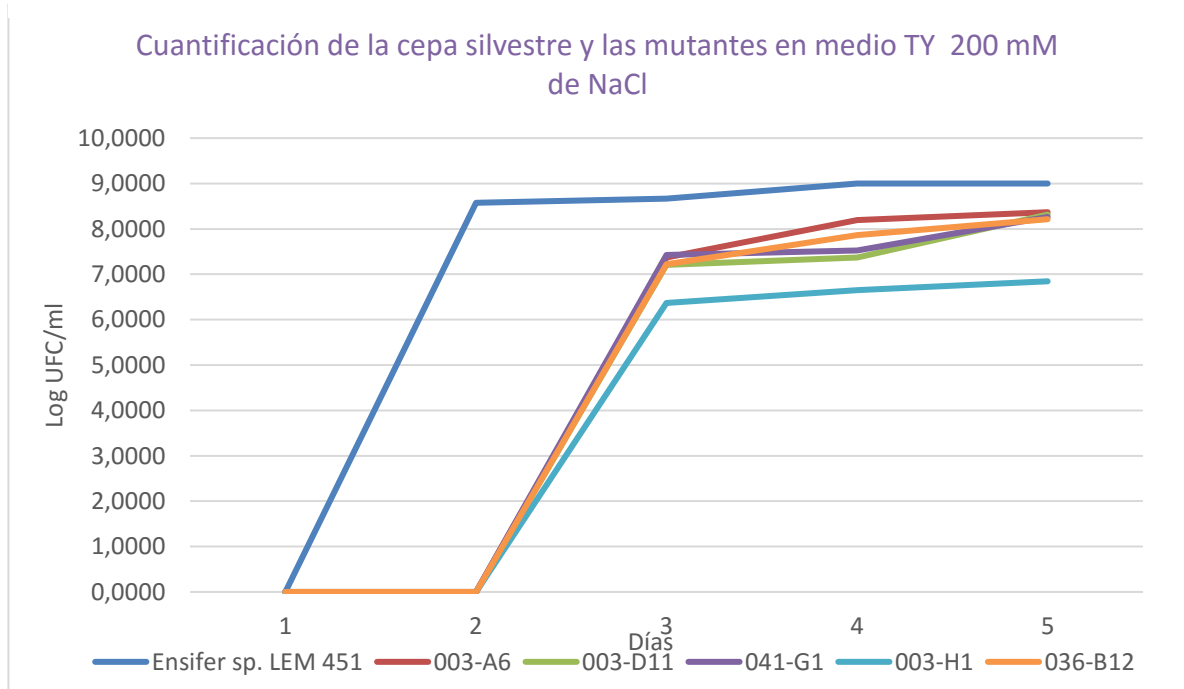


Figura 5.4.3 Gráfica de crecimiento de mutantes sensibles a sal y cepa silvestre (azul) en medio TY-200 mM. Se observa un crecimiento con ligero retraso de las mutantes, pero a cabo del tercer día logran alcanzar valores de UFC/ml similares.

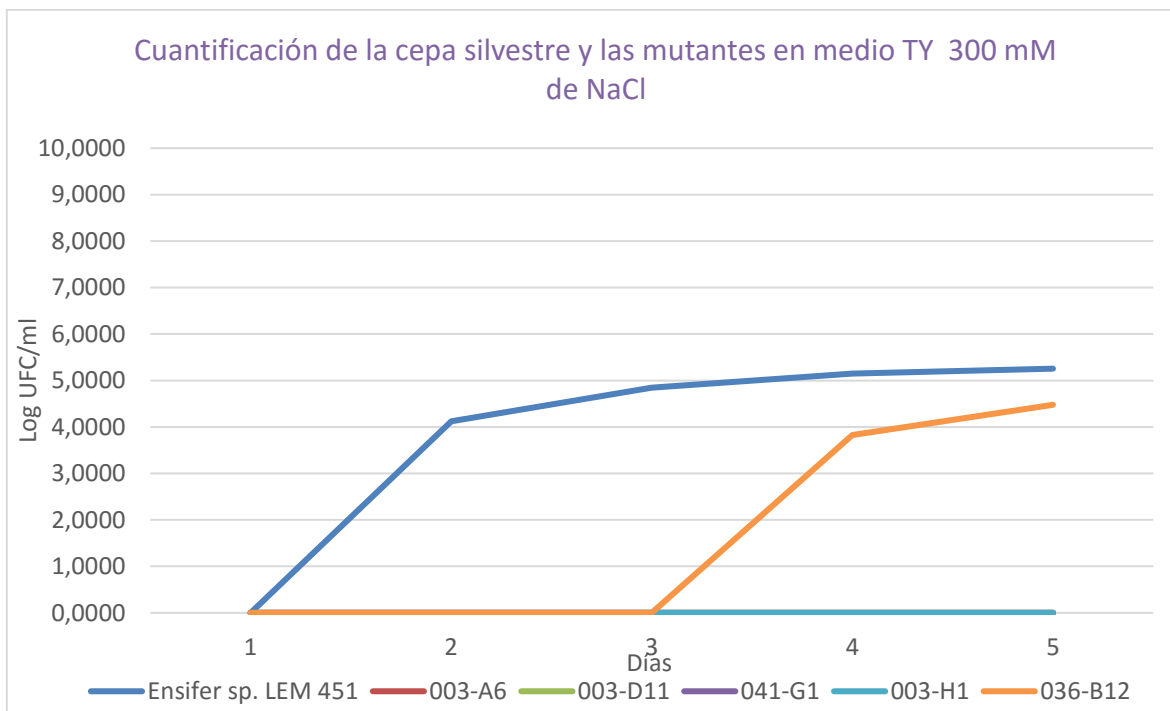


Figura 5.4.4 Gráfica de crecimiento de mutantes sensibles a sal y cepa silvestre (azul) en medio TY-300mM. Se observan diferencias en crecimiento mientras que la cepa silvestre presenta crecimiento desde el primer día las cepas mutantes comienzan su crecimiento a partir del 3er (036-B12) día e incluso algunas no presentan crecimiento.

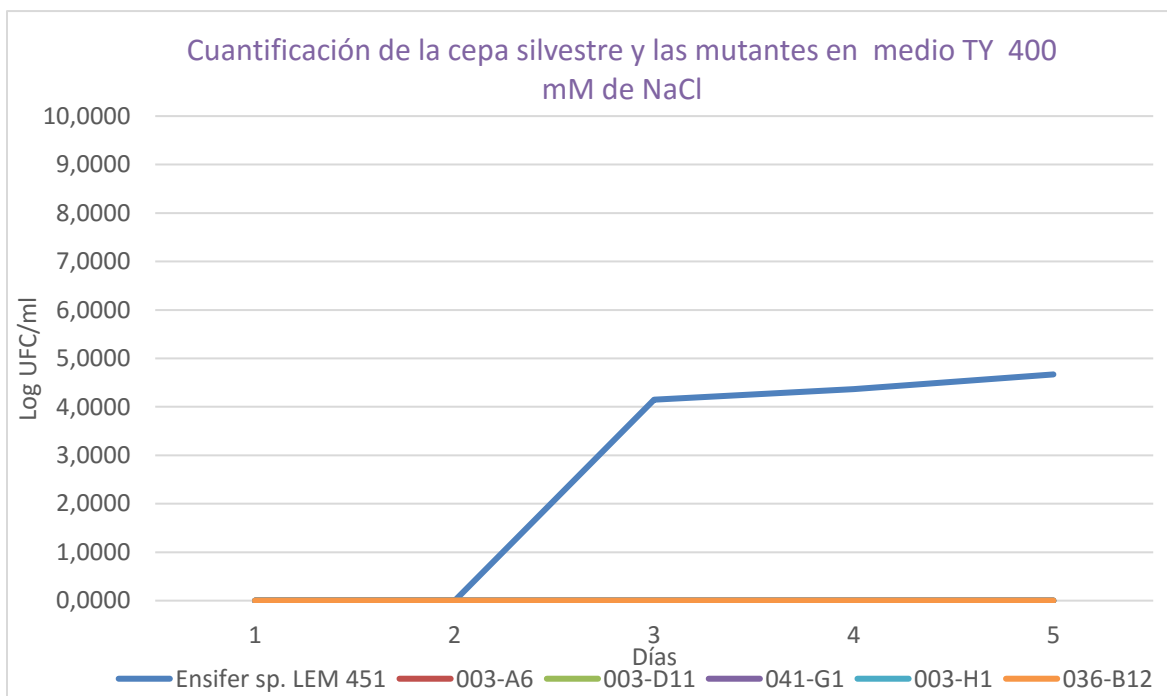


Figura 5.4.5 Gráfica de crecimiento de mutantes sensibles a sal y cepa silvestre (azul) en medio TY-400mM. La cepa silvestre inicia su crecimiento al segundo día y su crecimiento no es tan vigoroso como en concentraciones más bajas, pero se mantiene a lo largo de los 5 días, mientras que las mutantes son incapaces de desarrollarse en este medio con esta concentración de NaCl.

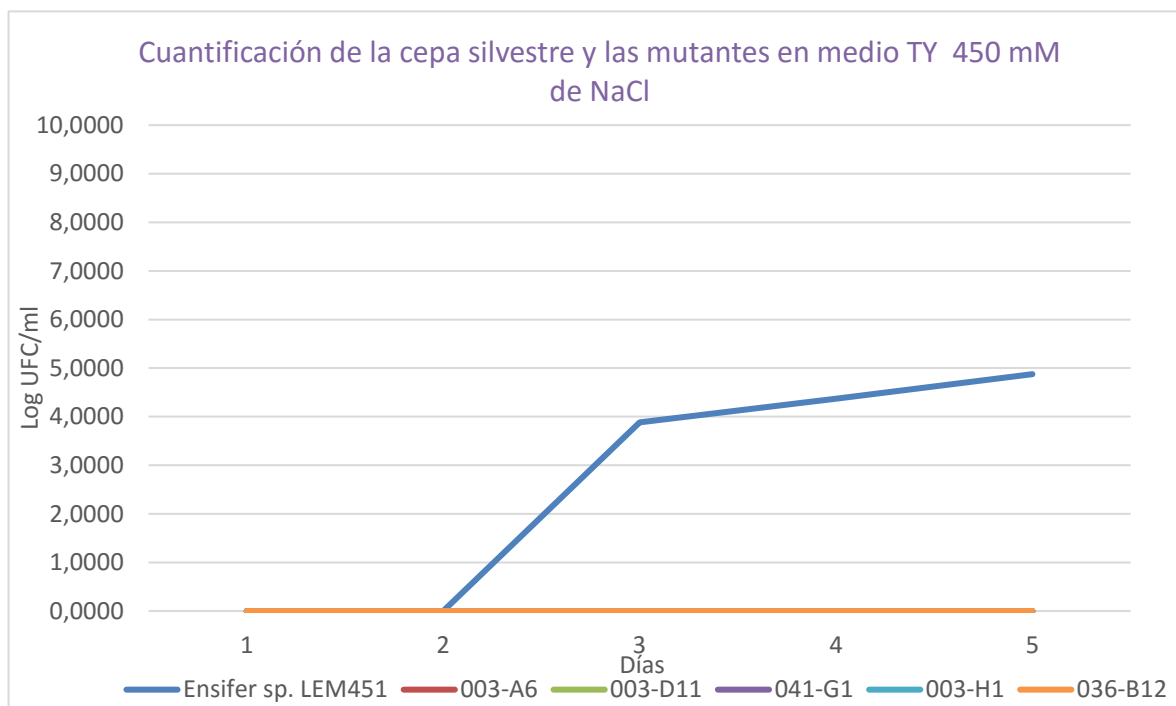


Figura 5.4.6 Gráfica de crecimiento de mutantes sensibles a sal y cepa silvestre (azul) en medio TY-450mM. La cepa silvestre inicia su crecimiento al segundo día y continúa aumentando el número de UFC/ml, las cepas mutantes sensibles no presentan un desarrollo visible en esta concentración de NaCl.

### 5.5 Análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Los fragmentos obtenidos de la prueba RFLP de las cepas mutantes sensibles a NaCl y las cepas control (*E. coli* S17.1 pUT-mini-Tn5 y *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM451) fueron los esperados, existiendo una coincidencia en número y peso molecular de los fragmentos revelados para la cepa *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM451 y las cepas mutantes sensibles a NaCl como se muestra en la figura 5.5-1.

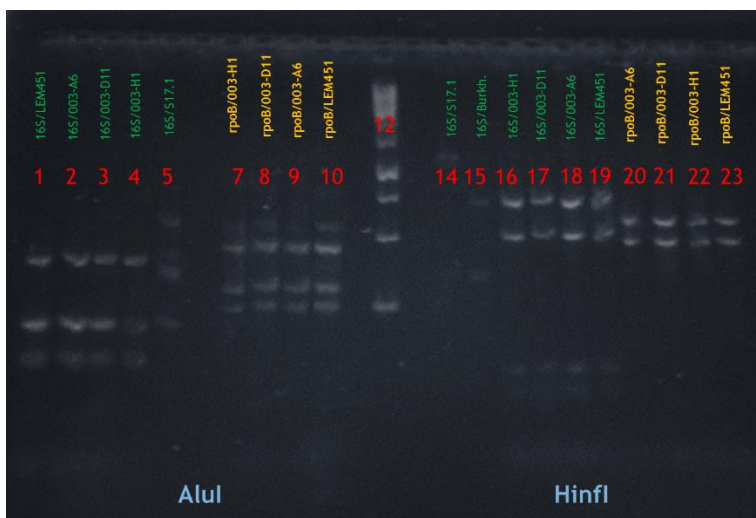


Figura 5.5-1 RFLP-*ropB* (Amarillo) y RFLP-*16sRNA* (Verde) con enzimas de digestión *AluI* e *HinfI* (izquierda y derecha de marcador de peso molecular (12) respectivamente) de cepas transconjugantes sensibles a sal (*ropB*: 7,8 ,9 y 20,21,22; *16sRNA*: 2,3, 4 y 16,17, 18) cepa silvestre *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM451 (*ropB*: 10 y 23; *16sRNA*: 1 y 19) y *Escherichia coli* S17.1 (pUT-miniTn5-Gm) (*16sRNA*: 5 y 14).

### 5.6 PCR arbitraria

Se obtuvo un fragmento de un peso aproximado de 500pb de la cepa mutante 003-A6 mediante el empleo de la PCR arbitraria (figura 5.6-1), esta fue el único utilizado para secuenciar, puesto que al realizar la amplificación la cepa silvestre mostró un resultado positivo con un fragmento de aproximadamente 250pb. Esto posiblemente se debe a que el genoma de la cepa silvestre contiene una región con una secuencia de nucleótidos muy parecida a la secuencia de terminación del transposón miniTn5-Gm, ocasionando que esta región sea la que el iniciador reconoce y por tanto sea esta la región amplificada, dicha región no forma parte del transposón insertado y por lo tanto este resultado se descartó junto con los demás resultados de las cepas mutantes (003-H1, 003-A6, 003-D11, 036-B12 y 041-G1) debido a la similitud de los pesos de los fragmentos amplificados puesto que esta región no nos brinda información acerca del sitio exacto donde se insertó el transposón.

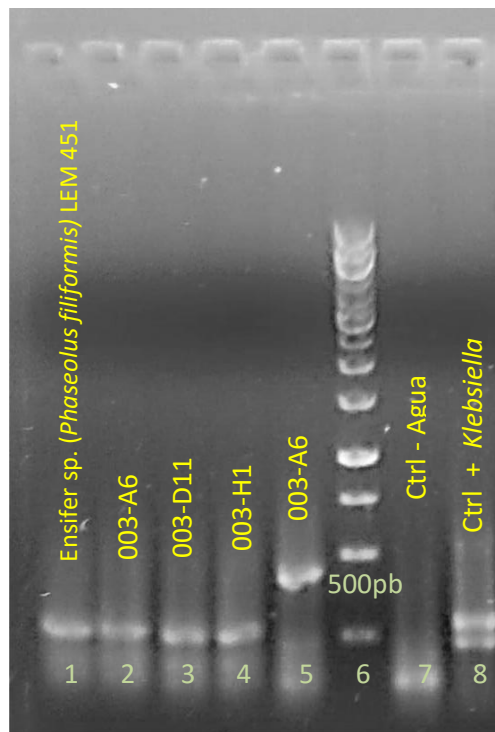


Figura 5.6-1 PCR arbitraria. Amplificación en la cepa silvestre (1) cepas mutantes sensibles a sal (2, 3 y 4). El fragmento de la cepa 003-A6 (5) fue elegido para purificar y enviar a secuenciar.

## 5.7 Secuenciación de productos de PCR arbitraria y búsqueda de secuencias similares en NCBI.

Se obtuvo un producto de purificación de ADN de PCR arbitraria de la cepa mutante 003-A6 de 11 ng/μl que fue analizada y editada para obtener un producto final de 376pb, que fue sometida a BLASTn en el sitio NCBI y del cual se obtuvo como resultado secuencias de ADN que codifican para transportadores tipo ABC, estas secuencias han sido reportadas en diferentes especies del género *Ensifer* (Figura 5.7-1). Esta proteína forma parte de la membrana de diversos microorganismos y principalmente cumple la función de osmoregulación al exportar azúcares hacia la membrana externa de la bacteria; esto puede ser una posible explicación para determinar porqué la cepa 003-A6 resulta afectada en su crecimiento en medio con NaCl. Este gen se encuentra en un clúster y se aprecia un dominio conservado en distintas especies del género *Ensifer* (Figura 5.7-2).

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">sugar ABC transporter [Ensifer sp. TW10]</a>	238	238	92%	7e-76	95%	<a href="#">WP_026613647.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">polysialic acid transporter KpsM [Sinorhizobium fredii]</a>	234	234	92%	2e-74	92%	<a href="#">WP_014763613.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">sugar ABC transporter [Sinorhizobium fredii]</a>	233	233	92%	3e-74	91%	<a href="#">WP_037452272.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">RkpT1, cell surface polysaccharide export ABC-2 transporter [Ensifer sp. Br816]</a>	233	233	92%	4e-74	92%	<a href="#">WP_018237831.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">sugar ABC transporter [Sinorhizobium sp. PC2]</a>	232	232	92%	1e-73	93%	<a href="#">WP_046119822.1</a>

Figura 5.7-1 Secuencias con alto grado de similitud con la secuencia 003-A6 encontradas a través del BLAST. Nótese las diferentes especies del género *Ensifer*.

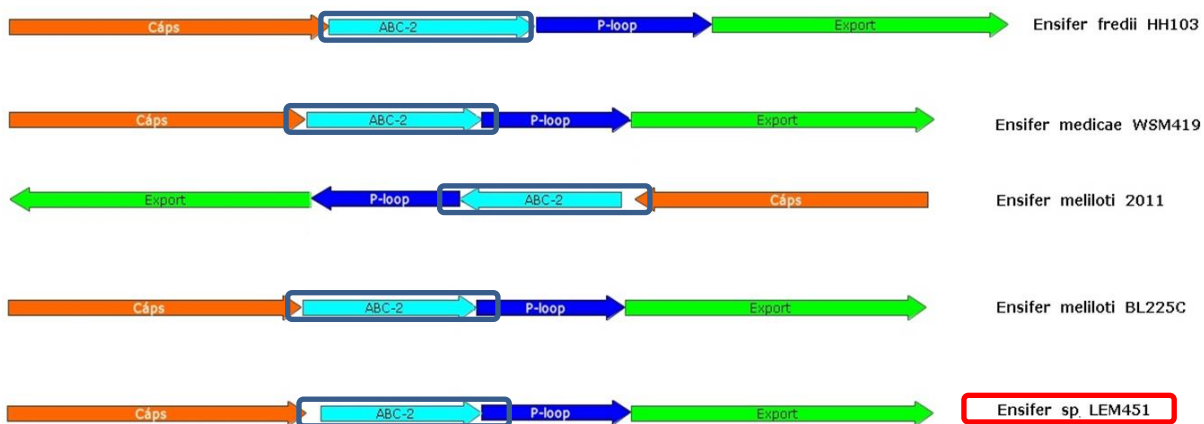


Figura 5.7-2. Clústeres de genes encontrados para diferentes especies del género *Ensifer* que contienen el transportador ABC rectángulo azul. Cepa silvestre rectángulo rojo.

La secuencia analizada como producto de la PCR arbitraria, coincide exactamente en una región en particular del genoma completo de la cepa silvestre, comprobando así que este segmento forma parte del genoma de la cepa silvestre y que también codifica para la misma proteína transportadora.

### 5.8 Resistencia a antibióticos

La cepa 003-A6 al presentar un resultado positivo a la PCR arbitraria y a la búsqueda de secuencias similares en NCBI, fue la única considerada para ser objeto de prueba de resistencia a antibióticos y así complementar su caracterización, dicha cepa presentó un crecimiento normal y resistencia a los antibióticos penicilina (10 u), estreptomina (10 µg) y ácido nalidixico (30 µg). Por otra parte resultó ser sensible a los antibióticos cloranfenicol (30 µg), vancomicina (30 µg) neomicina (30 µg) y tetraciclina (30 µg) (Figura 5.8-1 y -2).

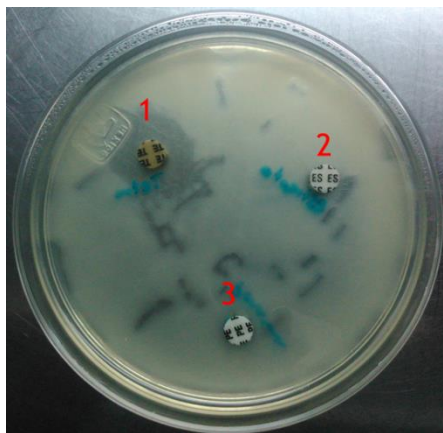


Figura 5.8-1. Pruebas de resistencia a antibióticos cepa 003-A6: **1 tetraciclina (30 µg)** sensible, se observa un halo de inhibición. **2 estreptomina (10 µg)** y **3 penicilina (10 U)** resistente, sin presencia de halos de inhibición.

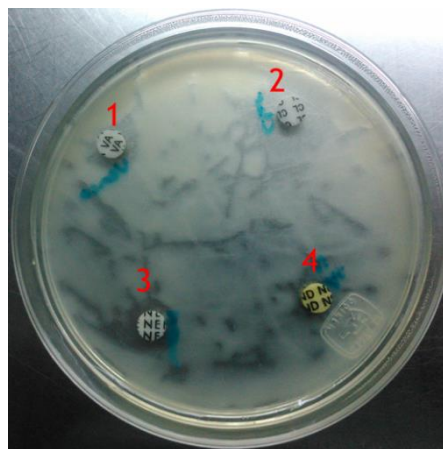


Figura 5.8-2. Pruebas de resistencia a antibióticos cepa 003-A6: **2 cloranfenicol (30 µg)** sensible, se observa un halo de inhibición de aproximadamente 1cm de radio. **1 vancomicina (30 µg)** y **3 neomicina (30 µg)** sensible, se observa un pequeño halo de inhibición menor a 1cm. **4 ácido nalidixico (30 µg)** resistente, sin presencia de halos de inhibición.

## VI. DISCUSIÓN

La eficacia del transposón pUT-miniTn5-Gm resultó ser estable y de fácil utilización en este ensayo, esto ha sido reportado por varios autores que han llevado a cabo estudios donde el empleo de este transposón abarca diferentes aplicaciones resultando ser una herramienta efectiva (Leung *et al.*, 1997; Leprince *et al.*, 2012; Cortés, 2008). El transposón presentó gran estabilidad al comprobar que aún tras varias pruebas con el mismo cultivo, se observó que las cepas conservaban la mutación, además de estar presente durante varias generaciones de células hijas.

La cepa silvestre *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451 presentó un crecimiento normal y supervivencia en medio con concentraciones de sal de 100, 200, 300, 400 y 450 mM comprobando así lo reportado por Rocha (Tesis de Maestría, 2012) donde sus resultados indican que esta cepa es capaz de tolerar estrés salino a NaCl, esta resistencia a altas concentraciones de sal del género *Ensifer* ha sido remarcada por diversos autores (Elboutahiri *et al.*, 2010).

Las mutantes obtenidas mediante la transposición al azar presentan una disminución de la producción de exopolisacárido a las distintas concentraciones de NaCl a las cuales fueron sometidas, este efecto de la concentración de NaCl sobre el género *Ensifer* también ha sido expuesto en los resultados reportados por Ahmed (1990) y Lloret *et al.*, (1997).

El procedimiento que fue llevado a cabo en este experimento se ha aplicado a diversos géneros de rizobia, los cuales han sido objeto de pruebas de mutagénesis al azar empleando transposones como el Tn5 para posteriormente analizar las secuencias interrumpidas mediante la técnica de la PCR arbitraria, un ejemplo de este procedimiento es el llevado a cabo por Williams *et al.*, (2006) donde aísla y describe mutantes sensibles a sal de la especie *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* Rm1021, en dicho estudio obtiene mutantes sensibles a NaCl a concentraciones de 300 a 350 mM, esto coincide con los resultados aquí expuestos puesto que a una concentración de 300 mM es en la que se observa una marcada falta de crecimiento en las cepas mutantes.

La mutagénesis insercional en la cepa silvestre *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451 originó a diversas cepas mutantes con sensibilidad a crecimiento en distintas concentraciones de sal de las cuales se pudo determinar una proteína que está involucrada en la exportación de azúcares al exterior celular; resultados similares son

analizados por Jiang *et al.*, (2004) donde a través del empleo del transposón Tn5 encuentra secuencias de genes que codifican para proteínas de eflujo y transporte de iones.

El tipo de proteína transportadora ABC 2 encontrada a través de la mutagénesis al azar en la cepa 003-A6, demuestra ser una proteína que es necesaria para la osmoregulación de la cepa *Ensifer sp. (Phaseolus filiformis)* LEM451, el mismo tipo de proteína ha sido encontrado por Vanderlinde *et al.*, (2009) en la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 3841 donde cumple funciones de osmoprotección contra la desecación, ayuda a la expresión de exopolisacárido y a la formación de biofilm bacteriano para la supervivencia de la bacteria. Esta proteína también ha sido encontrada en bacterias que no están relacionadas con procesos de nodulación, simbiosis o fijación de nitrógeno; Gowrishankar (1989) la describe en *Escherichia coli* y Cairney *et al.*, (1985) en *Salmonella typhimurium* ambas con función osmoregulatoria.

Los genes que codifican para transportadores tipo ABC suelen estar entre los de mayor longitud en bacterias gram negativas, para el caso del género *Ensifer* Ren *et al.*, (2004) se encuentran cerca de 200 secuencias que codifican para este tipo de transportadores, de manera que se estipula que estas proteínas juegan un papel importante en la toma de nutrientes del medio y como osmoregulantes.

La reducción de exopolisacárido como se presentó en este ensayo a partir de la concentración de 300 mM de NaCl puede provocar diversos problemas en el microorganismo, al respecto Schmeisser *et al.*, (2009) exponen que la cepa *Rhizobium sp.* NGR234, con gran capacidad de nodular diversas leguminosas, pierde la habilidad de nodulación al ser incapacitados los genes que funcionan para la producción de exopolisacáridos. Así mismo Kiss *et al.*, (2001) analizan la función de uno de estos genes (*rkp-3*) de la especie *Ensifer meliloti* Rm41 que codifica para la estructura de un antígeno K, que se presumen es esencial en el proceso de nodulación.

## VII. CONCLUSIÓN

La mutagénesis insercional al azar empleando el transposón pUT-miniTn5-Gm es una herramienta eficaz para la generación de mutantes con un solo evento de transposición al azar, la inserción del material es estable y transmisible a generaciones posteriores de la cepa.

Las cepas transconjugantes sensibles a NaCl generadas presentan una morfología y características moleculares propias de la cepa *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM 451 con lo cual se descarta posibles contaminaciones.

La banca parcial de mutantes generada presenta resistencia a los antibióticos gentamicina y kanamicina.

Se cuenta hasta el momento con una banca de 6300 mutantes lo cual nos da 42% del total de la banca esperada para abarcar el 100% del genoma de la cepa silvestre *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM451.

La sensibilidad a sal de las cepas encontradas puede ser debido a genes que codifican proteínas que están involucradas en la osmoregulación, actuando a manera de transportadores o proteínas de eflujo, el resultado del transportador tipo ABC indica que es un dominio conservado en diferentes especies y géneros de rhizobia y otros microorganismos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E. A. E., y Wood, M. (1990). Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soy bean rhizobia, *Soil Biol. Biochem.* Vol.22, No. 3, pp.343-347.
- Alvarado H. R. A., (2010). Manual de Producción de lenteja pardina (*Lens culinaris*) y Garbanzo Pedrosillano (*Cicer arietinum*). Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Universidad de Valladolid.
- Barkla J. B., Rosario V. E., Balderas E. y Pantoja O., Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas., *Biotecnología* 263-274p.
- Brill, W. J., *Microbiología agrícola*.(1981). Investigación y Ciencia núm. 62 (Prensa científica, Barcelona)
- Bronwyn J.B., Vera-Estrella R., Balderas E, y Pantoja O. (2007). Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biotecnología* 14:263-272.
- Brousseau, R., Saint-Onge, A., Prefontaine, G., Masson, L. y Cabana, J. (1993). Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 114-119.
- Cairney, J., Booth, I. R. y Higgins, C. F. (1985). Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhirium*: proU encodes an osmotically induced betaine transport system, *Journal of Bacteriology*, Vol. 164, No.3, p. 1224-1232.
- Case J. R., Boucher Y., Dahllorf I., Holmstrom C., Doolittle F. W. y Kjelleberg S. (2007). Use of rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 278-288.
- Casida Jr L E., (1982). *Ensifer adhaerens* gen. Nov., sp. Nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 32. No.3. p. 339-345.
- Cebolla A., Arevalo R. M. y Biomedal S. L. (2010). Handbook of Hydrocarbon and Lipid microbiology: genetic analysis of gram-negative bacteria using mini Tn5 transposons. Sevilla-España. K.N. Timmis.
- Chun, K., Edenberg, H., Kelley, M. y Goebel, M. (1997). Rapid Amplification of uncharacterized transposon-tagged ADN sequences from genomic ADN. *Yeast functional analysis reports*,13:233-240.
- Cortés, O. L. J. (2008). Construcción de una biblioteca de mutantes pha-negativo de *Pseudomonas putida* por transposón mini Tn5 y evaluación de los genes afectados.
- Cuéllar-Sánchez, A. (2011). Estudio poblacional de rhizobia simbioses de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas.
- Das, S., Noe, J., Paik, S. y Kitten, T. (2005). An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. *Journal of Microbiological Methods*, 63: 89-94.
- De la Peña, C. y Pueyo, J. (2002). Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 2012, 32 (1), pp.65-91.
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. y Gillis, M. (1994) 'Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the

genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com.nov. *Sinorhizobium sahari* sp. nov.; and *Sinorhizobium teranga* sp.nov.´, International Journal of Systematic Bacteriology. vol. 44, pp715–733.

De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U. y Timmis K. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned ADN in Gram-Negative Eubacteria. Journal of Bacteriology. 172: 6568-6572.

Diouf A., De Lajudie P., Neyra M., Kersters K., Gillis M., Martinez R. E. y Gueye M. (2000). Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50. 159-170.

Duque E., Molina-Henares A. J., de la Torre J., Molina-Torres M. A., del Castillo T., Lam J. y Ramos J. L. (2007). Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. p. 227-251. In *Pseudomonas*, Vol. V: A Model System in Biology. Ramos, J.L., and Filloux, A. (eds). Springer, Dorchester, The Netherlands.

Elbouthiri N., Thami A I y Udupa M S. (2010). Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. BMC Microbiology. 10:15.

FAO (2008), Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Fernández M., Rodríguez G M L., López B J., Vela C G. (2014). Dinamica de la salinidad de los suelos. Revista digital del Departamento: El Hombre y su Ambiente. Vol.1 (5):26-35.

Feschotte C, Jiang N y Wesler S. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nature. 3. 329-341.

Firth N., Ippen-Hiler K. y Skurray R. A., Structure and Fuction of the F factor and Mechanism of Conjugation. Gene Transfer: Conjugation Section C.

Food and Agricultural Organization, (2008). The State of Food Insecurity in The World,.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1999). Soil Salinity Assessment. FAO Irrigation and Drainage Paper.

Forero E. y Romero C., (2005)Estudios en leguminosas colombianas..

Fox G. E, Magrum L. J, Balch WE, Wolfe R. S y Woese C. R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. Proc Nat Acad Sci. USA; 74: 4537–4541.

Garg, N. y Renseigné, N. (2007). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: proces and signaling, Agron. Sustain. Dev, 27: 59-68.

Goryshin, I. Y., Jendrisak, J., Hoffman, M. L., Meis, R. y Reznikoff, W. (2000). Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. Nat. Biotchnology, (1): 97-100.

Gowrishankar, J. (1989). Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, p. 1923-1931.

Griffiths A. J. F., Wessler S. R., Lewontin C. R y Carroll S. B., Introduction to Genetic Analysis., Ninth Edition., Freeman and Company., New York. 5:183-209p.

Hamer, L., DeZwaan, T., Montenegro-Chamorro, M., Frank, S. y Hamer, J. (2001). Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 5:67-73.

Herrero, M., De Lorenzo, V. y Timmis, K. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, p.6557-6567.

Hirsch, A. M., Lum, R. M. y Downie, J. A. (2001). What makes the Rhizobia-Legume symbiosis so special?. *Plant Physiology*, Vol. 127, pp.1484-1492.

James D. Watson, Tania A. Barker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, y Richard Losick. (2004) . *Molecular Biology fo the Gene*, Fifth Edition. San Francisco: Benjamin Cummings.

Janda J. M y Abbott L. S. (2007) 16sr RNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 2761-2764.

Jarvis, B. D. W., van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernyez, M. P., Cleyet-Marel, J. C. y Gillis, M. (1997) 'Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 47, 895–898.

Jiang, J., Wei, W., Bing, H., Li, X., Wang, L. y Yang, S. (2004). Salt-tolerance genes involved in cation efflux and osmoregulation of *Sinorhizobium fredii* RT19 detected by isolation and characterization of Tn5 mutants. *FEMS Microbiology Letters*. 239: 139-146.

Jordan, D. C. (1984). 'Rhizobiaceae Conn 1938', in N. R. Krieg and J. D. Holt (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. London.

Judd, W., Campbell, E., y Stevens, P. (1999). *Plant systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Judd, W., Campell, C., Kellogg, F., Stevens, P. y Donoghue, J. (2002). *Plant systematics: A phylogenetic approach*. Second Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Judson, N. y Mekalanos, J. (2000). Transposon based approaches to identify essential bacterial genes. *Trends in Microbiology*, Vol. 8 No. 11.

Kiss, E., Kereszt, A., Barta, F., Stephens, S., Reuhs, L. B., Kondorosi, A. y Putnoky P. (2001) The *rkp-3* Gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure, *MPMI*, Vol. 14, No. 12, pp. 1395-1403.

Knobloch, J., Nedelman, M., Kiel, K., Bartscht, K., Horstkotte, M., Dobinsky, S., Rohde, H. y Mack, D. (2003). Establishment of an arbitrary PCR for a rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: Characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, p.5812-5818.

Kwon, Y. y Ricke, S. (2000) Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. *Journal of Microbiological Methods*, 41:195-199.

Lantzke, N., Calder, T., Burt, J., y Prince, R. (2007). Water salinity and plant irrigation, department of agriculture and food, government of western Australia, South Perth WA,.

Lehninger, A. L. 1981. *Biochemistry*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana.

- Leprince A., Janus D., De Lorenzo V. y Dos Santos M. V. (2012). Synthetic Gene Networks: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Vol. 813. Capítulo 15.
- Leung K. Y., Wong L. S., Low K. W. y Sin, Y. M. (1997). Mini-Tn5 induced growth –and protease- deficient mutants of *Aeromonas hydrophila* as live vaccines for blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas). *Aquaculture*. 158. 11-12.
- Lewis, G., Schrire B., Mackinder, B. Y Lock M. (2005). *Legumes of the world*. The Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido. 577 páginas.
- Llamas I., Argandoña M., Quesada E y Del Moral A. (2000). Transposon mutagenesis in *Halomonas eurihalina*. *Res. Microbiol.* 151 13-18.
- Lloret, J., Wulff, B., Rubio, J., Downie, A., Bonilla, I. y Rivilla, R. (1998). Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1024-1028p.
- Llosa M. y De la Cruz F., (2005) Bacterial conjugation a potential tool for genomic engineering. *Research in Microbiology*. 156. 1-6.
- Llosa M., Gomis-Ruth F. J., Coll M. y De la Cruz F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for ADN transport. *Molecular Microbiology* 45 (1), 1-8.
- Maróti G. y Kondorosi É., (2014). Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis?. *Frontiers in Microbiology*. Volume 5. Art. 326.
- Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P. y Willems Anne. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (Including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.58.200-214.
- Martínez, V. N., López, V. C. A., Barsuto, S. M. y Pérez, L. R. (2011) Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Medio ambiente y desarrollo sustentable*, Vol. 5, No. 3.
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *PNAS*, 36(6):344-355.
- Miller, W. M., Loewen, P. C., y Oresnik, J. I. (2006). Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021, *Microbiology*, 152: 2049:2059.
- Moreira M. S. F., Huising J. E. y Bignell E. D., (2012). *Manual de Biología de suelos tropicales*.,177-216p.
- Munns, R. (2004). *The Impacts of Salinity Stress*, CSIRO Division of Plant Industry, Canberra ACT.
- Muñoz-Lopez, M. y García-Perez, J. (2010). ADN Transposons: Nature and Applications in genomics. *Current Genomics*, 11, 115-128.
- Nogales J., Campos R., BenAbdelkhalek H., Olivares J., Lluch C. y Sanjuan J. (2001) *Rhizobium tropici* Genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *MPMI* Vol. 15, No. 3.
- Novick, R. P. (1981). Plásmidos. *Investigación y Ciencia*, núm. 53 (Prensa científica, Barcelona, 1981), pp. 46-59.

Overhage J., Lewenza S., Marr A. y Hancock R. (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Mini-Tn5-lux mutant library. *Journal Of Bacteriology*. p. 2164-2169.

Penttinen P., Rasanen L A., Lortet G. y Lindstrom K. (2013). Stable isotope labelling reveals that NaCl stress decreases the production of *Ensifer (Sinorhizobium) arboris* lipochitooligosaccharide signaling molecules. *Federation of European Microbiology Societies*. 349: 117-129.

Pray, L. (2008) Transposons: The jumping genes. *Nature Education* 1(1):204

Qimron, U., Madar, N., Ascarelli-Goel, R., Elgrably-Weiss, M., Altuvia, S. y Porgador, A. Reliable determination of transposon insertion site in prokariotes by direct sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 137-140.

Ren, Q., Kang, K. H. y Paulsen, I. T. (2004). TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems, *Nucleic Acids Res.* 1;32.

Reznikoff, S., Goryshin, Y. y Jendrisak, J. (2004). Tn5 as a molecular genetics tool: In vitro transposition and the coupling of in vitro technologies with in vivo transposition. *Methods Mol Biol* 260:83–96.

Reznikoff, W. (1993). The Tn5 Transposon. *Annual Reviews Microbiology*, 47:945-63.

Reznikoff, W., (2003). Tn5 as a model for understanding ADN transposition. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1199-1206.

Reznikoff, W., Bashin, A., Davies, D., Goryshing, Y., Mahnke, L., Naumann, T., Rayment, I., White, M. y Twining, S. (1999). Tn5: A molecular window on transposition. *Biochemical and bioquimical communications* 266, 729-734.

Rich, J. y Willis, D. (1990) A single oligonucleotide can be used to rapidly isolate ADN sequences flanking a transposon Tn5 insertion by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Research*, vol. 8, No.22, 6673.

Rocha-Bonilla, G. Tesis-Maestría. (2012). Identificación y caracterización de cepas de *Sinorhizobium* del estado de Baja California sur y de cepas de *Rhizobium* del estado de Tlaxcala con potencial biotecnológico, y aisladas de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas.

Ruiz, L., Motherway, O., Lanigan, N., van Sinderen, D. (2013) Transposon Mutagenesis in *Bifidobacterium breve*: Construction and characterization of a Tn5 transposon mutant library for *Bifidobacterium breve* UCC2003. *PLoS ONE* 8(5).

Ruvalcaba P. L., Alcaraz V. T. de J., Villegas A. B. y Angulo G. C. E., (2006). Extractos vegetales y su efecto en la conductividad eléctrica de dos suelos salinos y de soluciones. *Terra Latinoamericana*, Núm. 1, pp. 83-89.

Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysciak, D., Bakkou, N., Le Quéré, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Roser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottshalck, G., Schmitz, R. A., Broughton, J. W., Perret, X., Strittmatter, A. W. y Streit, R. W. (2009). *Rhizobium* sp Strain. NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 12, p. 4035-4045.

Shrivastava, P. y Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 123-131.

Tomcsanyi, T., Berg, C., Phandis, S. y Berg, D. (1990). Intramolecular transposition by a Synthetic IS50 (Tn5) Derivative, *Journal of Bacteriology*, p. 6348-6354.

Valdés V. M. M., Zhang J. Y., Orduña R. N. F., Cheng P. H., Sui H. X. y Wang, E. T. (2014). Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 37 605-612.

Vanderlinde, E. M., Harrison, J. J., Muszynski, A., Carlson, R. W., Turner, R. J. y Yost, K. C. (2009). Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 3841. *FEMS Microbiol Ecol* 71: 327-340.

Wan, T. E., Martínez, R. J. y López, L. I. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. *Microbios*. Cap. 8.

Wei, W., Jiang J., Li X., Wang L. y Yang S S. (2004). Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Letters in Applied Microbiology*, 39, p. 278-283.

Weng F. Y., Chiou C. S., Lin P.H. P. y Yang S. S. (2009). Application of *recA* and *rpoB* y sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*.107.452-464.

White, M., Rayment, I. y Reznikoff, W. (2004) Structure/function insights into Tn5 transposition. *Current Opinion in Structural Biology*, 14:50-57.

Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburg, W. y Faaij, A. (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy and Environmental Science*: 4.

Young, J. M., (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53.

Zahran, H. H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology Reviews*, p. 968-989.

## IX. Anexos

### Medios Utilizados:

Medio Triptona-Levadura (TY) 1000ml

-5 g de triptona

-3 g de extracto de levadura

-1 ml de cloruro de calcio 1.17 M por cada 100 ml de medio.

-Para medios sólidos agregar agar al 10%.

Medio LB (Luria Bertani) 1000ml

-10 gramos de triptona

-5 gramos de extracto de levadura

-10 gramos de NaCl

### Antibióticos y concentraciones utilizados:

Antibiótico	Concentración
Gentamicina	10µg/ml
Kanamicina	20µg/ml
Ampicilina	100µg/ml

### Gen completo proteína transportadora tipo ABC 2 secuencia:

La región en verde es la obtenida en el producto de PCR arbitraria de la cepa mutante 003-A6.

```
Atgtccacacgcttcggctcaaagccgggcgctatatctgggcgctgctcgaccggcagcgcatactctgctgatgacgttcattcag
gcgatcgccgcacgcccggcgctcggtaccagcttcgctcttcttcgccaccggctatacgctccagttctatcaggcgatgaccggct
atgtgaatagcgggtccgccaacaaggcgctgctcagctaccggaatgtcgcgcccacgacaccgctcgcgcgcttcctcca
ggtgctgaccaccactctggtcgcttcctcgtgctcggcaccatcgtcgcgaccatgctgggtgaaaccaacctccattggccgtccatcct
ggaagccgtggcgatggcctcttcggcctggcgtagcgtgatcaatgccgtgctgtcctcaaatacggctttatgagcaggtctttg
gaatcgtaatcggccgctcttcttatctccgggtgtctctcctcgggattctatccgaatccctaccgggatctcgtgctcgtaatccgctc
gtccacatcatatggcctccgacaggggtctatccggaatcgggcaatcggcctcgacatggattaccttacggaatcgcgtttctga
cattgtttccggaatgctgtgttcaccctctcccgaagacgctgagaaacgaa.
```