

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Identificación de posibles genes involucrados en la
solubilización de zinc por
proteobacterias de rizósfera de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Mariana Pira López
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2020

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Identificación de posibles genes involucrados en la
solubilización de zinc por
proteobacterias de rizósfera de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Mariana Pira López
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2020

Vo.Bo.:



(f)

 Dalia Lau Bonilla, Ph. D.

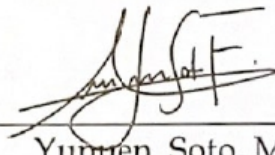
Tribunal Examinador:



(f)

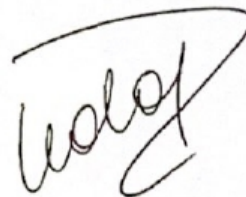
 Dalia Lau Bonilla, Ph. D.

(f)



 Yuruen Soto, MSc.

(f)



 Leda Pedelini, Ph. D.

Fecha de aprobación: Guatemala, 11 de diciembre de 2020.

Agradecimientos

Quiero utilizar este espacio para realizar los agradecimientos a todas las personas que me apoyaron no solo en la realización de este trabajo de graduación, sino que también a todos los que me apoyaron a lo largo de mis cinco años de licenciatura. Algunas de estas personas son:

A mi mamá, Ana Cristina, porque haberme inspirado a estudiar una carrera científica y apoyarme en todo momento, aun cuando las cosas no siempre fueron fáciles para ella.

A mi papá, Juan Pablo, por ser quien siempre me motivó a ser una persona curiosa y querer aprender más. También le quiero agradecer por ayudarme a crear uno de los programas utilizados en esta tesis, porque, aunque yo sé que tenías otras qué hacer, lo dejaste de lado por mí y me ayudaste.

A mis hermanos, Andrés, Cecilia y Sofía, por haber estado a mi lado y apoyarme a lo largo de mi vida.

A todos mis abuelos, Neto, Rosita, Vicky y Fabián, por darme todo su amor y apoyo durante toda mi vida.

A mi asesora de tesis la Doctora Dalia Lau y a mi directora de carrera la Doctora Pamela Pennington, porque sin ninguna de ustedes dos nada de lo que está escrito en este trabajo de graduación habría sido posible.

A la Doctora María Fernanda Terraza por ayudarme con las correcciones de este documento, aun cuando no tenía ninguna obligación hacia mí.

A la Doctora Krisztina Ríos-González por ser mi mentora a lo largo de mis años de licenciatura.

A todos los grandes amigos y compañeros que encontré en estos años de universidad: Estefani, Marcela, Ana Lucía (Nala), Javier (Tony), Paola, Mateo, Javier, José Miguel y muchos más, porque para mí son la viva prueba de que para poder avanzar en la universidad no solo es cuestión de notas, sino de rodearse de la gente correcta.

Agradecimientos	III
Lista de figuras	VI
Lista de cuadros	VII
Resumen	VIII
1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Justificación	3
4. Marco teórico	6
4.1. Zinc	6
4.1.1. En el ambiente	6
4.1.2. Zinc como micronutriente en los seres vivos	7
4.2. Crecimiento vegetal	8
4.2.1. Macronutrientes necesarios	9
4.2.2. Micronutrientes esenciales	9
4.3. Solubilización de zinc	10
4.3.1. Mecanismos	10
4.3.2. Necesidad de solubilización de zinc	10
4.4. Rizósfera	10
4.4.1. Microorganismos de la rizósfera	11
4.4.2. Microorganismos involucrados en solubilización de zinc	11
4.4.3. Función	11
4.5. Suelo	12
4.5.1. Taxonomía	13
4.5.2. Funciones	13
4.5.3. Daños	13
4.6. En Guatemala	13
4.6.1. Cambio de uso de suelos	13
4.6.2. Fertilidad de suelos	14

5. Hipótesis	15
6. Metodología	16
7. Resultados	20
8. Discusión de resultados	30
9. Conclusiones	32
10.Recomendaciones	33
11.Bibliografía	34
Referencias	34
12.Anexos	39
12.1. Metodología para detección de bacterias solubilizadoras de zinc	39
12.1.1. Metodología detallada	39
12.1.2. Medios de cultivo a utilizar	40
12.2. Características de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en esta investigación	42
12.2.1. Oligonucleótidos iniciadores degenerados no seleccionados	42
12.2.2. Estructuras secundarias	43
12.2.3. BLASTn de oligonucleótidos iniciadores degenerados seleccionados	46
12.3. Proteínas utilizadas para los alineamientos	50
12.4. Código BasesN	52

Lista de figuras

3.1. Cambio de uso de suelo en los años 2001 - 2010.	5
4.1. Efectos del exceso y deficiencia de zinc en el organismo	9
4.2. Funciones de la rizósfera	12
7.1. Diagrama de proteína transportadora de ácido idónico en bacterias Gram negativo .	21
7.2. Diagrama de proteína transportadora de ácido idónico en bacterias Gram positivo .	22
7.3. Logo de secuencia de alineamiento de proteínas realizado con bacterias Gram negativo	23
7.4. Logo de secuencia de alineamiento de proteínas realizado con bacterias Gram positivo	24
7.5. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y ILLi-R (Parte 1)	26
7.6. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y ILLi-R (Parte 2)	26
7.7. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y ILLi-R (Parte 3)	27
7.8. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y FKEY-R (Parte 1)	27
7.9. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y FKEY-R (Parte 2)	28
7.10. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados AQRIA-F y ILLi-R	28
7.11. Resultados de PCR <i>in silico</i> con los oligonucleótidos iniciadores degenerados AQRIA-F y mILLi-R	29

Lista de cuadros

4.1. Contenido promedio de metales y metaloides en la corteza terrestre y suelo.	7
6.1. Variables utilizadas en el estudio.	17
6.2. Permutaciones utilizadas para PCR <i>in silico</i>	19
7.1. Motivos encontrados en la aplicación MOTIF Search	25
7.2. Pares de oligonucleótidos iniciadores degenerados seleccionados en esta investigación	25
12.1. Oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados, pero no seleccionados en esta investigación (Parte 1)	42
12.2. Estructuras secundarias de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en esta investigación.	43
12.3. Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado PPHP-F .	46
12.4. Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado FKEY-R. .	47
12.5. Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado AQRIA-F .	47
12.6. Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado mILLI-R . .	48
12.7. Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado ILLI-R . .	49
12.9. Proteínas utilizadas en los alineamientos de bacterias Gram negativo realizados en esta investigación.	50
12.11 Proteínas utilizadas en los alineamientos de bacterias Gram positivo realizados en esta investigación.	51

Para combatir la deficiencia de zinc en alimentos en Guatemala una posible solución es el uso de bacterias solubilizadoras de zinc para aumentar el contenido nutricional de los alimentos. La aplicación a los cultivos de bacterias del suelo solubilizadoras de zinc promueven el incremento de los niveles de zinc en los cultivos, permitiendo un mejor desarrollo de estos. Se busca identificar protobacterias en suelo de cultivo de caña de azúcar. Para ello, se realizaron análisis bioinformáticos usando las bases de datos de proteínas del National Centers for Bioinformatics (NCBI) en genomas de eubacterias, se buscaron secuencias del transportador de ácido idónico, ya que por este transportador permite la secreción de los ácidos orgánicos que ayudan a la solubilización de zinc. Con las secuencias de diferentes bacterias de suelo, se realizaron alineamientos utilizando algoritmos MUSCLE y ClustalW, con el fin de encontrar dominios conservados en las proteínas. Se obtuvo como resultado que existen veinte diferentes motivos conservados en la secuencia de este transportador. Utilizando los alineamientos realizados, se diseñaron oligonucleótidos iniciadores degenerados (OID) para detectar la presencia del transportador tanto en bacterias Gram positivo como Gram negativo. Los OID diseñados mostraron amplificación en proteobacterias. Estos oligonucleótidos se podrían utilizar para identificar la presencia de microorganismos con potencial de solubilización de zinc en distintos suelos de Guatemala. Una vez detectadas, estas bacterias podrán ser aisladas, identificadas y cultivadas para utilizarse como biofertilizantes.

To combat zinc deficiency in food in Guatemala, a possible solution is the use of zinc solubilizing bacteria to increase the nutritional content of food. The application of zinc-solubilizing soil bacteria to crops promotes the increase of zinc levels in crops, allowing a better development of these. The aim of this work is to identify protobacteria in sugarcane cultivation soil. To do this, we made bioinformatic analysis using the protein databases of the National Centers for Bioinformatics (NCBI) in eubacterial genomes, sequences of the idonic acid transporter were searched, since this transporter it allows the secretion of organic acids that help to the solubilization of zinc. With the sequences of different soil bacteria, we made alignments using MUSCLE and ClustalW algorithms, in order to find conserved domains in the proteins. We obtained as a result that there are twenty different conserved motifs in the sequence of this transporter. Using the alignments we made, we designed degenerate primer oligonucleotides to detect the presence of the transporter in both Gram positive and Gram negative bacteria. The designed degenerated primers showed amplification in proteobacteria. These oligonucleotides may be used to identify the presence of microorganisms with potential for zinc solubilization in different soils of Guatemala. Once detected, these bacteria can be isolated, identified and cultured to be used as biofertilizers.

CAPÍTULO 1

Introducción

La finalidad principal de esta investigación fue diseñar oligonucleótidos iniciadores degenerados capaces de identificar el transportador de ácido idónico. Se eligió este transportador porque uno de los ácidos secretados, el ácido 5-cetoglucónico, es uno de los ácidos orgánicos que ayudan a que el zinc en el suelo sea soluble y utilizable por las plantas. La metodología realizada en esta investigación fue principalmente a través de métodos bioinformáticos, utilizando las bases de datos que se encuentran disponibles en línea, en el caso de esta investigación la que se utilizaron fueron NCBI y EcoCyc. No se utilizó información de ninguna base de datos adicionales, por lo que la información utilizada para todos los procedimientos queda limitada a lo que poseen esas bases de datos. Al final de la investigación, con todos los datos obtenidos de las bases de datos y los alineamiento realizados, se obtuvieron oligonucleótidos iniciadores degenerados que son capaces de identificar proteobacterias que presentan el transportador de ácido idónico.

2.1. Objetivo general

Diseñar oligonucleótidos iniciadores para detectar transportadores de ácidos orgánicos en proteobacterias de rizósfera con capacidad de solubilizar zinc en forma de óxido de zinc y carbonato de zinc.

2.2. Objetivos específicos

- 2.1 Identificar transportadores de ácidos orgánicos, incluyendo 5-cetoglucónico, en proteínas anotadas en bases de datos de proteobacteria.
- 2.2 Identificar motivos conservados de transportadores en secuencias obtenidas de las bases de datos de proteínas de proteobacteria y posibles grupos externos de microorganismos de suelo.
- 2.3 Diseñar y validar *in silico* oligonucleótidos iniciadores degenerados para la detección de transportadores de ácidos orgánicos en bacterias de rizósfera.

La degradación del suelo es un problema cada vez más marcado en Guatemala. La degradación del suelo se define como la pérdida de sus funciones, específicamente, de su capacidad de producir la vegetación en la cantidad y calidad necesaria. La degradación del suelo tiene diferentes mecanismos tales como la erosión, compactación, arado y el uso excesivo de agroquímicos. Sus efectos principales son en la pérdida de nutrientes en el suelo, pérdida de procesos naturales en el suelo y la pérdida de la calidad del suelo (Osman y Osman, 2014; Pimentel, 1993).

En países como Guatemala, donde se depende de la producción agrícola, la degradación del suelo tiene consecuencias muy problemáticas. La agricultura en Guatemala es una parte importante del producto interno bruto (PIB), aportando aproximadamente el 14% al país (BANGUAT, s.f.). El sector agrícola también es una fuente importante de empleos del país, representando al 38% de la población económicamente activa del país (AKIANTO, 2012). Además, la agricultura es la subsistencia para personas en extrema pobreza (Romero, 2012).

Las consecuencias que causa la degradación del suelo en un país como Guatemala son bastantes graves. Una de estas es la escasez de alimento para la población, que como se mencionó anteriormente, es su única fuente de subsistencia. Las pérdidas económicas no solo afectan al agricultor, sino que al resto del país. Las pérdidas económicas pueden causar que el gobierno no se encuentre financiado, lo cual puede evitar que existan programas en diferentes partes del país para apoyar a la población vulnerable (Ibarra y Encina Rojas, 2003).

Uno de los principales motivos de la degradación del suelo en Guatemala es debido al cambio de la vocación del suelo. En el caso del suelo forestal al ser convertido en suelo para agricultura este se ve degradado. Esto se debe a que este tipo de suelo requiere de una capa orgánica producida por las plantas. Al volverse agrícola, se elimina esta capa y no se vuelve a producir. Esto también se debe a que no existe ninguna protección del suelo hacia agente que causan la erosión como el agua y el viento. El cambio de uso de suelo en Guatemala se muestra en la Figura 3.1a (GIMBOT, 2014).

La mayor parte de suelos tienen deficiencias de diferentes nutrientes, principalmente nitratos y sulfatos. Debido a esto, además de que aumenta el rendimiento del cultivo, se aplican fertilizantes que permiten que el suelo tenga los nutrientes necesarios para el crecimiento de diferentes cultivos. La mayor parte de fertilizantes tienen principalmente nitrógeno, potasio y fósforo. Los micronutrientes, como zinc, magnesio y manganeso, aunque si existen fertilizantes que los contienen, rara vez se

aplican (Kumawat, Kumar, Kumar, y Meena, 2017; Thomas y Hanway, 1968). El zinc es uno de los 8 elementos traza necesarios para que una planta se desarrolle de forma correcta. Está involucrado en la producción de hormonas, además de estar presente en diferentes enzimas, como los dedos de zinc, en una planta. Para que las plantas puedan utilizar el zinc presente en el suelo este tiene que estar en la forma Zn^{+2} . La absorción de esta forma normalmente la hace la materia orgánica que se encuentra en el suelo. La disminución de la forma Zn^{+2} se debe al cambio de pH, donde otros iones, como el calcio, secuestran el ion de zinc, cambiando a formas que la planta no puede absorber. Estas formas que la planta no puede utilizar son silicatos, hidróxidos y carbonatos (Sadeghzadeh y Rengel, 2011; Sadeghzadeh, 2013)

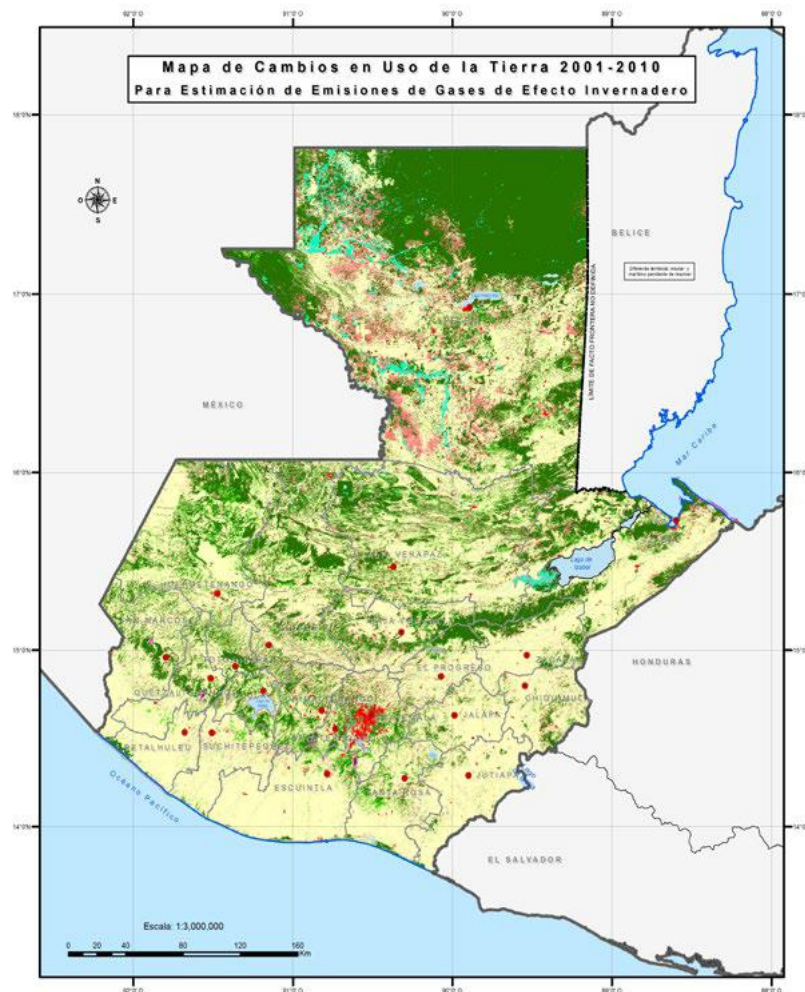
Una de las soluciones para mejorar la solubilidad de zinc en el suelo es aislar microorganismos, principalmente de bacterias de la rizosfera de la planta de interés, con la capacidad de solubilizar los nutrientes. Este acercamiento tiene como ventaja que se utiliza las mismas bacterias que conviven en el sistema suelo-planta y que ya están adaptadas a las condiciones locales de producción. Estas bacterias deberán ser capaces de solubilizar zinc, fósforo, potasio y silicio, entre otros (Kumawat y cols., 2017).

Se ha mostrado que la rizosfera en los cultivos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) tiene microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal, a través de la producción de auxinas (hormonas vegetales), solubilización de minerales y la fijación de nitrógeno. Estas bacterias no solo se encuentran en la tierra, sino que también están presentes en hojas, tallo y otras partes de la planta (Ghevariya y Desai, 2014).

La solubilización de zinc puede suceder a través de diferentes vías. Algunas de estas vías pueden ser la producción de ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos o enzimas. Aun así, no se conocen todas las vías y los mecanismos involucrados. En todas estas vías el objetivo principal es el mismo: acidificar el suelo para incrementar la solubilidad del zinc, este elemento pueda permanecer en solución a través de formación de complejos con agentes quelantes y pueda ser utilizado al ser absorbido por la planta. Una de las vías que se conoce que tiene mayor efectividad es la producción de ácidos orgánicos, principalmente el ácido 5-cetoglucónico, por bacterias Gram negativo (Alori, Glick, y Babalola, 2017).

Por estos motivos, se busca aislar bacterias de la rizósfera de caña de azúcar cultivada en suelos de la planicie costera de Guatemala con el fin de encontrar bacterias capaces de solubilizar zinc presente en el suelo, que en su forma actual se encuentra en formas no disponibles para la absorción de la planta. Para ello, se propone tamizar muestras o aislados microbianos de rizósfera que contengan genes relacionados a la solubilización de dichos micronutrientes mediante la secreción de ácidos orgánicos.

Figura 3.1: Cambio de uso de suelo en los años 2001 - 2010.



Categorías uso de la tierra y cambios 2001-2010 (IPCC,2005)		Hectáreas	Porcentaje
	1. Tierras Forestales que se mantienen	3,122,830	28.679%
	1.1 Tierras Forestales a Tierras Agrícolas y Praderas	1,033,638	9.493%
	1.2 Tierras Forestales a Otras Tierras	984	0.009%
	2. Tierras Agrícolas y Praderas	5,791,335	53.186%
	2.1 Tierras Agrícolas y Praderas a Tierras Forestales	549,699	5.048%
	2.2 Tierras Agrícolas y Praderas a Asentamientos	302	0.003%
	2.3 Tierras Agrícolas y Praderas a Otras Tierras	598	0.005%
	3. Humedales	9,006	0.083%
	3.1 Humedales a Tierras Agrícolas y Praderas	718	0.007%
	4. Asentamientos	54,154	0.497%
	5. Otras Tierras	2,632	0.024%
	6. Agua	209,496	1.924%
	7. Sin Información	113,507	1.042%
Total general		10,888,900	100.000%

(a) Imagen tomada de: (GIMBOT, 2014)

4.1. Zinc

El zinc es un elemento presente en la tabla periódica. Este tiene como número atómico 30 y se le clasifica como metal. Su estado de oxidación más común es en el que tiene carga +2. Este metal se puede encontrar naturalmente en tierra y en agua. El zinc en el ambiente se puede hallar como minerales en forma de sulfuros, sulfatos, óxidos, carbonatos y silicatos (Barak y Helmke, 1993). El método más recomendado para el análisis de zinc en diferentes muestras es la espectrometría de absorción atómica de llama (AA). Se utiliza esta técnica principalmente debido a que es rápida, tiene alta sensibilidad y específica y requiere una cantidad muy pequeña de muestra. Aunque en la actualidad el método se ha sustituido por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), debido a que tiene una mayor especificidad y sensibilidad que AA. Otras técnicas utilizadas son la espectrometría de fluorescencia molecular, fluorimetría de absorción molecular, espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, entre otras (Herrero y Vigil, 2003; Liu y cols., 2020).

4.1.1. En el ambiente

Normalmente el zinc se encuentra en concentraciones traza en la corteza terrestre (Tabla 4.1a). Además, el zinc presenta una movilidad geoquímica limitada, por lo que es difícil su movimiento de un ambiente a otro. Por esto motivos, los diferentes tipos de suelos, por sus componentes, contienen diferentes concentraciones de zinc (Boardman y McGuire, 1990).

Tabla 4.1: Contenido promedio de metales y metaloides en la corteza terrestre y suelo.

Elemento	Corteza (mg/kg)	Suelo (mg/kg)
Li	18	20
Be	2.4	0.6
Na	23600	5900
Mg	22000	4400
Al	79600	47000
Si	288000	310000
K	21400	15000
Ca	38500	9200
Ti	4010	2400
V	98	58
Cr	126	37
Mn	716	330
Fe	43200	18000
Co	24	7
Ni	56	13
Cu	25	17
Zn	65	48
As	1.7	5.2
Sr	333	120
Zr	203	180
Mo	1.1	0.6
Ag	0.07	0.05
Cd	0.1	0.2
Sn	23	0.9
Sb	0.3	0.5
Cs	3.4	4
Ba	584	440
Hg	0.04	0.06
Pb	14.8	16
U	1.7	2.3

(a) Adaptada de: (Sposito, 2008)

La concentración de zinc en el suelo es importante para los diferentes cultivos de alimentos. Usualmente, el zinc se encuentra en concentraciones traza en el suelo. Las concentraciones bajas de zinc en el suelo afectan a las plantas que crecen en él debido a que no pueden obtener la concentración necesaria de zinc. Las estrategias que normalmente se proponen para combatir este problema es agregar fertilizantes de micronutrientes. Una de las estrategias que se propone en la actualidad es buscar una forma que el zinc que está presente en el suelo se encuentre biodisponible para que las plantas puedan utilizarlo (Haider, Hussain, Farooq, y Nawaz, 2018).

4.1.2. Zinc como micronutriente en los seres vivos

Como se mencionó anteriormente, el zinc es un micronutriente necesario para el correcto funcionamiento del metabolismo de los seres vivos. Esto se debe a que el zinc es necesario para la función de muchas enzimas, debido a que forma parte de estas. El zinc también es una parte importante de las proteínas llamadas "dedos de zinc", utilizadas para ingeniería genética. En la actualidad, gracias a la bioinformática, es posible determinar áreas donde una proteína se une al zinc (Maret, 2013).

Los roles que tiene el zinc en un ser vivo son varios. Uno de estos es su función como antioxidante. Este no lo hace afectando directamente a los radicales libres, sino que, a través de otros mecanismos, normalmente evita que algunos grupos funcionales interactúen con el hierro para evitar la formación de radicales libres. El zinc también estabiliza el ADN y la membrana celular (Stefanidou, Maravelias, Dona, y Spiliopoulou, 2006).

El zinc también se ve relacionado con apoptosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada. En los casos donde la concentración de zinc es muy poca a nivel intracelular o es excesiva a nivel extracelular se produce la apoptosis. En el caso de la disminución de zinc, se ha observado que la baja concentración activa las caspasas, iniciando el proceso (Stefanidou y cols., 2006).

El zinc también se ve implicado en el sistema inmunológico. Esto se debe a que el zinc se une a la alfa-2 macroglobulina y altera su estructura. Al alterarla, hace que tenga una mayor interacción con citoquina y proteasa, estimulando directamente la función inmune. La disminución de la concentración de zinc hace que la respuesta inmune mediada por células sea deficiente. Se ha observado también que el zinc ayuda a la proliferación de linfocitos. Por su rol en las células del sistema inmune, se recomienda la ingesta de zinc para fortalecerlo (de la Guardia Peña, Ustáriz García, García García, y Morera Barrios, 2011; Stefanidou y cols., 2006).

La deficiencia de zinc causa serios efectos en la salud. Algunos de los síntomas causados son lesiones en la piel, alopecia, diarrea, problemas neuropsicológicos, disminución de peso, menor actividad inmunológica, entre otras. Los efectos del consumo excesivo de zinc son bastante similares, estos se resumen en la Figura 4.2 (Plum, Rink, y Haase, 2010).

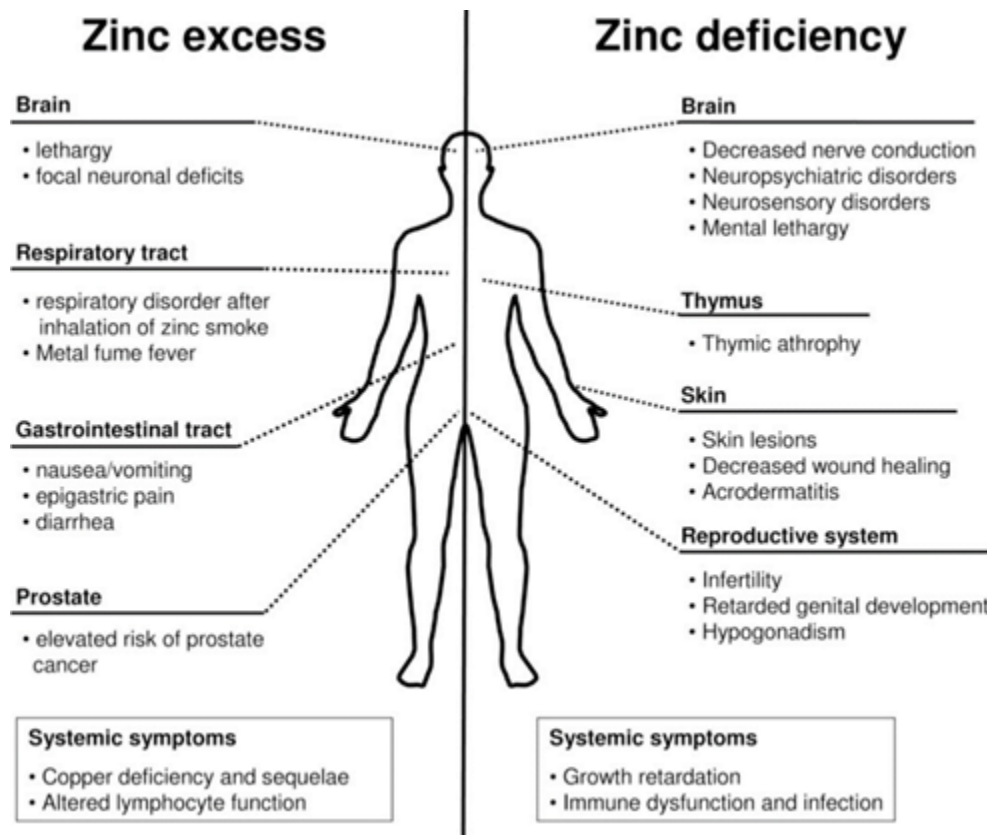
4.2. Crecimiento vegetal

El crecimiento vegetal normalmente se define como los cambios cuantitativos e irreversibles en el tamaño, área o peso de órganos individuales. Normalmente esta medida se toma a partir de los pesos secos de hojas, tallos y raíces. Otras medidas como la cantidad de hojas, tallos y raíces se toman como el desarrollo de la planta. El crecimiento vegetal se ve afectado por el desarrollo individual de cada célula, por procesos como la mitosis y la diferenciación celular. El área de la planta encargada de la producción de nuevas células normalmente son los meristemos, debido a que aquí se producen células no diferenciadas (Gregory y Nortcliff, 2013).

Uno de los procesos más importantes en el crecimiento vegetal, principalmente para la producción de biomasa, es la fotosíntesis. La fotosíntesis, a través de la energía obtenida de la luz solar, es capaz de producir alimento para la planta en forma de glucosa. La glucosa se utiliza después como energía. Debido a que las plantas funcionan como alimento, la energía producida se utiliza en más seres vivos (Taiz y Zeiger, 2010).

El crecimiento vegetal también se ve afectado por hormonas vegetales, las citoquininas y auxinas. Estas hormonas se ven relacionadas con el desarrollo de la planta, cuando se producen raíces y patrones en las hojas de la planta. Esto se debe a que afectan directamente a los meristemos, por lo que sirven para la señalización de cuando se producen los diferentes tipos de células. Por estos motivos, estas moléculas son ampliamente utilizadas para el desarrollo de plantas en cultivo de tejidos (Schaller, Bishopp, y Kieber, 2015).

Figura 4.1: Efectos del exceso y deficiencia de zinc en el organismo.



(a) Imagen tomada de: (Plum y cols., 2010).

4.2.1. Macronutrientes necesarios

Los macronutrientes esenciales en la nutrición vegetal son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Estos se considera macro ya que son necesarios en altas cantidades. Se requieren en alta concentración debido a que son los elementos necesarios para formar las biomoléculas que componen la planta. En el caso de magnesio este forma parte de la clorofila, encargada de la fotosíntesis. Se ha observado que todos estos macronutrientes tienen roles importantes en aliviar el estrés que sufre la planta en momentos de sequía, por lo que su nutrición adecuada asegura la sobrevivencia de la planta (Abass Ahanger, Morad-Talab, Abd-Allah, Ahmad, y Hajiboland, 2016; Krishnan, Kumar, y Praveen, 2019).

4.2.2. Micronutrientes esenciales

Los micronutrientes esenciales para el crecimiento vegetal son hierro, manganeso, boro, molibdeno, cobre, zinc, cloro, níquel, cobalto, sodio y silicio. Estos nutrientes requieren la mayor parte de las veces ayuda de la rizosfera para que puedan ser utilizados por la planta. Esto se debe a que las formas que se encuentran disponibles en el suelo no siempre corresponden con la forma química que la planta utiliza. Todos estos elementos son cofactores, partes de enzimas o pueden funcionar para formar diferentes componentes estructurales, pero en concentraciones altas son tóxicos para la planta. Su diferencia principal de los macronutrientes es que estos son necesarios en cantidades bajas (Krishnan y cols., 2019).

4.3. Solubilización de zinc

El zinc está presente en el suelo en cantidades promedio de 48 mg/kg (Sposito, 2008). Normalmente se encuentra en forma de minerales como ZnS , $ZnCO_3$, $ZnSiO_4$ y $ZnFeO_2$. La meteorización de estos minerales, el cambio de su composición al romperse, libera el ion de zinc (Zn^{+2}), forma que las plantas pueden utilizarlos. Estas formas normalmente son Zn^{++} y $Zn(OH)^+$. La forma soluble del zinc se puede observar en la fase orgánica, debido a que esta fase tiene una carga neutra. El zinc también se puede observar formando compuestos orgánicos complejos (Rudani, Patel, y Prajapati, 2018).

La concentración de zinc utilizable por las plantas en el suelo puede verse afectado por el pH, niveles de fósforo, materia orgánica, niveles de nitrógeno, niveles de cobre, humedad del suelo, niveles de magnesio y niveles de arsénico. Todos estos factores pueden bloquear o aumentar la posibilidad de que exista una mayor cantidad de zinc que pueda ser utilizable (Rudani y cols., 2018).

4.3.1. Mecanismos

La solubilización de zinc en el suelo normalmente sucede por los procesos metabólicos de bacterias y hongos presentes en este. Estos procesos consisten principalmente en la síntesis de ácidos orgánicos, los cuales se encargan de disminuir el pH del suelo. La disminución del pH, el mecanismo principal de este proceso, hace que el zinc se encuentre en una forma soluble, por lo que es posible absorberlo y usarlo por la planta. En el caso de bacterias se ha observado que se debe a la producción de ácido 5-cetoglucónico. En hongos el ácido involucrado es el ácido oxálico (Saravanan, Rohini Kumar, y Sa, 2011).

4.3.2. Necesidad de solubilización de zinc

La solubilización de zinc es necesaria para que las plantas sean capaces de utilizarlo. Su deficiencia, debido a que este es necesario para la función de una gran variedad de enzimas, y otros procesos celulares, causa serios problemas. Algunos de estos problemas se presentan en las hojas como descolorización, formación áreas necróticas, oscurecimiento, malformación y poco crecimiento de la planta y hojas. En plantas de interés económico para la industria alimentaria, estos problemas limitan su producción, además de hacer que sea menor su calidad nutricional (Hacisalihoglu y Kochian, 2003; Rudani y cols., 2018).

4.4. Rizósfera

La rizósfera se define como una zona de interacción entre el sistema radicular de una planta y los microorganismos del suelo. En la rizósfera ocurren diversos procesos relacionados con disponibilidad de nutrientes y protección de las plantas contra agentes patógenos (Reinhold-Hurek, Büniger, Burbano, Sabale, y Hurek, 2015).

Es difícil cultivar a nivel laboratorio todos los microorganismos en la rizósfera de las plantas, ya que estos se desarrollan a partir de una diversidad de exudados de raíces que son difíciles de replicar en condiciones controladas. Por estos motivos, se utiliza la metagenómica, ya que sin cultivarlos es posible identificar a los microorganismos presentes (Bakker, Berendsen, Doornbos, Wintermans, y Pieterse, 2013).

4.4.1. Microorganismos de la rizósfera

Los microorganismos presentes en la rizósfera dependen de la planta y el ambiente donde esta habita. La rizósfera se compone de bacterias, arqueas, hongos, algas, nemátodos, protozoos y virus (Lagos y cols., 2015).

Los organismos más estudiados son las bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos que forma micorrizas, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, microorganismos encargados de biocontrol, hongos y microparásitos. En el caso de las bacterias las que se observan más comúnmente son *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Proteobacteria*. Por la complejidad del análisis de microbiomas, se analiza hasta llegar a filos (Mendes, Garbeva, y Raaijmakers, 2013).

4.4.2. Microorganismos involucrados en solubilización de zinc

Las rizobacterias que se ha observado que se encargan de la solubilización de zinc son *Thiobacillus thiooxidans*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Microbacterium saperdae*, *Pseudomonas monteilli* y *Enterobacter cancerogens*. Algunas de estas bacterias también ayudan a la solubilización de otros minerales, además de zinc (Kumawat y cols., 2017; Saravanan y cols., 2011).

4.4.3. Función

Se ha observado que la rizósfera tiene una gran variedad de roles en la salud de la planta. Aunque la mayor parte de las veces se asocian con efectos positivos como la toma de nutrientes, protección contra patógenos, tolerancia contra estrés, producción de metabolitos secundarios, etc., en algunos casos causan enfermedades a la planta y en el caso de cultivos para consumo humano pueden tener patógenos perjudiciales para la salud. En la Figura 4.2a se resumen estas funciones de la rizósfera (Mendes y cols., 2013).

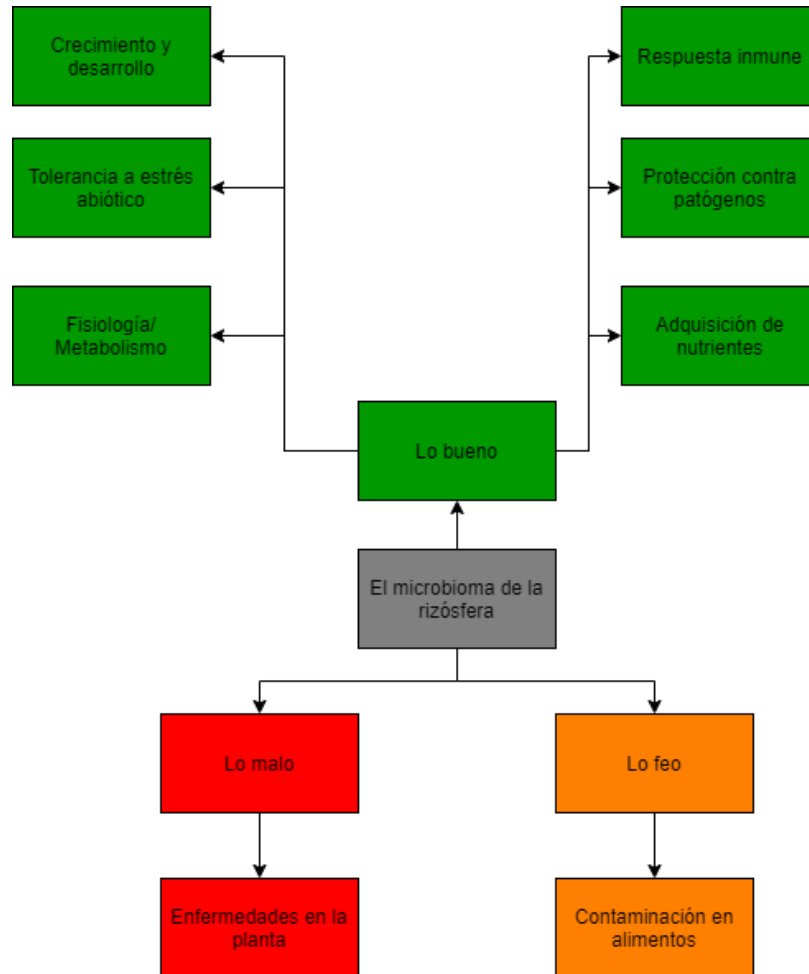
Una de las funciones más importantes de la rizósfera es la protección de la planta contra patógenos. Uno de los mecanismos utilizados por las bacterias y hongos presentes es a través de la producción de antibióticos. Otro mecanismo importante es que algunos de estos microorganismos son antagonistas del patógeno, por lo que evitan su desarrollo al producir metabolitos secundarios, como enzimas, que no permiten el crecimiento (El-Debaiky, 2019).

Se ha observado que los microorganismos presentes en la rizósfera son beneficiosos para la germinación de las semillas. Estos microorganismos producen enzimas, como la celulasa, capaces de favorecer los nutrientes alrededor de la semilla. Otra ventaja es que evitan el crecimiento de hongos al ser antagonistas de estos. Utilizar estas bacterias ha mostrado ser favorecedor para el cultivo de grano, debido a su bajo costo, poca toxicidad y rápido crecimiento (Smirnova y Sadanov, 2019).

Una función importante de las bacterias presentes en la rizósfera es la tolerancia a factores, tanto biológicos como abióticos, que le causan estrés a la planta. Sus mecanismos normalmente son a través de la acumulación de nutrientes, como azúcares, lípidos y aminoácidos, debido a que estos funcionan como una reserva para la planta. Los polímeros, como ligninas y taninos, también se acumulan, pero estos se usan como antioxidantes, limitando la producción de especies reactivas de oxígeno. En el caso de un exceso de salinidad, la rizósfera ayuda a obtener el agua (Egamberdieva, Wirth, y Abd-Allah, 2017).

En el caso de las plantas que crecen en ambientes contaminados por metales pesados, se ha observado que los microorganismos de la rizósfera secuestran estos metales evitando que afecten a la

Figura 4.2: Funciones de la rizósfera.



(a) Imagen adaptada de: (Mendes y cols., 2013)

planta. Esto lo realizan a través de metabolitos secundarios, que se unen a los iones de los metales pesados, dándole un ambiente a la planta con una toxicidad reducida (Lata y Gond, 2019).

Las redes tróficas presentes en el suelo son un componente importante en los ciclos de los diferentes nutrientes. Estas comunidades también afectan los diferentes procesos de descomposición. Aunque no se conocen a profundidad estas redes, se sabe que los cambios en estas pueden afectar diferentes procesos naturales. Un depredador importante en estas redes son los nemátodos, debido a que controlan las poblaciones de diferentes microorganismos. Los procesos en estas redes son los que posteriormente liberan los diferentes nutrientes en formas que las plantas pueden utilizar (Sánchez-Moreno y Ferris, 2007).

4.5. Suelo

El suelo normalmente se define como la capa fértil de la corteza terrestre, donde interactúan diferentes factores bióticos y abióticos. Este se le considera un sistema natural que se encuentra en constante cambio y que está organizado en diferentes niveles. La organización del suelo normalmente

se observa a través de horizontes, que se caracterizan por la presencia de minerales y de biomasa en cada uno. El suelo es considerado un recurso natural no renovable, debido a que su recuperación tarda miles de años (Porta, López-Acevedo, y Poch, 2019).

4.5.1. Taxonomía

La taxonomía de suelos se basa en diferentes factores por el estado de temperatura y humedad, color, textura, estructura, propiedades químicas y su profundidad. La taxonomía de suelos diferencia entre suelos minerales y orgánicos. Esto se debe a que estas características afectan al tipo de suelo debido a que le dan diferentes propiedades. La clasificación se basa en seis categorías que son: orden, suborden, gran grupo, subgrupo, familia y serie. Para poder distinguir los diferentes tipos de suelo se utiliza como base en esta clasificación a los horizontes, que son una capa de suelo paralela a la superficie. Los horizontes son la base de la taxonomía de suelos (USDA, 1999).

4.5.2. Funciones

Las funciones del suelo se clasifican en dos: ecológicas y no ecológicas. En el caso de las ecológicas está la producción de biomasa, asegurando diferentes formas de energía. También está la protección de los seres vivos y reserva de diferentes genes, debido a los seres vivos que habitan el suelo. En el caso de las funciones no ecológicas estas se asocian usos industriales, técnicos y socioeconómicos. En el caso de los industriales su función es ser la fuente de materiales utilizados en diferentes industrias. El suelo también, en el caso de civilizaciones antiguas, protege su legado (Blum, 2005).

4.5.3. Daños

En la actualidad, la degradación del suelo es un proceso que causa una gran pérdida económica. Debido a que el suelo pierde nutrientes, la producción agrícola disminuye, haciendo que sea mucho más difícil alimentar a la población. Este problema hace que sea necesario la búsqueda de suelo fértil, ya que este es un recurso no renovable, para satisfacer las necesidades de la población. Esto causa que se repita el ciclo nuevamente, disminuyendo la cantidad de suelos fértiles (Pacheco, Sanches Fernandes, Valle Junior, Valera, y Pissarra, 2018).

4.6. En Guatemala

4.6.1. Cambio de uso de suelos

El uso de suelos normalmente se da según la vocación que tiene este. Utilizar la vocación de los suelos como guía para su uso es lo que se recomienda debido a que esta nos da la información de sus características, que son las que finalmente determina su idoneidad para el uso que se busca dar. Normalmente el cambio de uso de la vocación que tiene el suelo es lo que causa su degradación (Alvarado-Quiroa y Araya-Rodríguez, 2014).

En Guatemala, no existe una gestión territorial eficiente. Debido al crecimiento urbano cada vez mayor, se ha visto la necesidad de que áreas con suelos con otras vocaciones se vuelvan una ampliación del área urbana o para actividades agrícolas. Esta situación hace que el uso que se le está dando al suelo cambie. El cambio de su uso realizado es el que produce la degradación del suelo (Alvarado-Quiroa y Araya-Rodríguez, 2014).

4.6.2. Fertilidad de suelos

La fertilidad de los suelos depende de su estructura, capacidad de retención e infiltración de agua, diversidad de microorganismos, nivel de acidez, disponibilidad de elementos minerales para absorción vegetal como N, P, K, Ca, Mg, S, entre otros. No existe ningún estudio para Guatemala que analice estos factores a profundidad. Existen algunos estudios que abarcan agroindustrias específicas, por ejemplo el estudio de suelos cafetaleros y cañeros, pero no abordan el tema de la degradación de forma holística (Leal, 2002).

Hipótesis

5.1 **Investigación**

Existe al menos un gen lo suficientemente conservado para tamizar cepas de proteobacterias transportadoras de ácidos orgánicos.

5.2 **Nula**

No existe un gen conservado de transporte de ácidos orgánicos para realizar el tamizaje de proteobacterias.

6.1 Sitio de estudio

La investigación se realizó con el Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

6.2 Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio son proteobacterias que cuentan con su genoma completo y anotado en las bases de datos de NCBI y BioCyc.

6.3 Diseño, enfoque y tipo de investigación

La investigación tiene un enfoque mixto, debido a que se utilizaron los datos recolectados previamente en bases de datos. El tipo de investigación es descriptivo, donde se describieron los motivos conservados de las secuencias de proteínas analizadas. El diseño es experimental donde se analizó en base a las bases de datos las secuencias de proteínas involucradas con el ácido 5-cetoglucónico.

6.4 Tipo y tamaño de muestra

El tipo de muestra es no probabilístico debido a que se seleccionaron los organismos en base a una serie de parámetros ya establecidos. El tamaño de muestra son las veinte secuencias seleccionadas para el estudio.

Tabla 6.1: Variables utilizadas en el estudio.

Variable	Conceptualización
Base de datos	NCBI Protein
Bacteria	Proteobacterias que presentan la proteína transmembranal relacionada con el ácido 5-cetoglucónico
Algoritmo para alineamiento	ClustalW y MUSCLE
Base de datos para búsqueda de motivos	Uso de PFAM y NCBI CDD
Motivos	Secuencias repetitivas de aminoácidos que se conservan en las proteínas alineadas
% de estrictez de oligonucleótidos iniciadores degenerados	Es un porcentaje que especifica un nivel de ocurrencia requerido para la inclusión de nucleótidos
Máxima degeneración de oligonucleótidos iniciadores degenerados	Cantidad de secuencias diferentes que son específicas para los oligonucleótidos iniciadores
Especificidad de oligonucleótidos iniciadores degenerados	Si amplifica principalmente a los organismos de interés, en este caso proteobacterias

6.5 Metodología

6.5.1 Selección de proteína a analizar

Se buscaron proteínas transmembranales en BioCyc (Keseler y cols., 2017) que fueran utilizadas para el transporte de ácido 5-cetoglucónico en la membrana celular. Se anotó su nombre, proteína transportadora de ácido idónico, y sus características.

6.5.2 Selección de secuencias de proteobacterias

Se utilizó la base de datos de proteínas del NCBI para buscar la proteína transportadora de ácido idónico. La proteína seleccionadas para los alineamientos realizados tenían que cumplir con las siguientes afirmaciones: ser un bacteria que se encontrara en suelo y ser Gram negativo o Gram positivo, dependiendo del alineamiento. Solo se seleccionaron las primeras veinte secuencias encontradas que cumplieran con ambas afirmaciones. La secuencia de cada proteína se guardó en un archivo FASTA.

6.5.3 Alineamiento de secuencias de proteínas

Todas los archivos FASTA con las secuencias fueron exportados al programa MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, y Tamura, 2018). En este programa se realizaron dos alineamientos diferentes, utilizando los algoritmos CLUSTALW y MUSCLE. Los alineamientos obtenidos se guardaron en formato FASTA.

6.5.4 Análisis de motivos en proteínas alineadas

Los alineamientos realizados anteriormente se utilizaron para buscar motivos conservados contra bases de datos de dominios proteicos ya existentes. Se utilizó el buscador de

motivos del centro de bioinformática de la Universidad de Kioto a través de la aplicación MOTIF Search en la página <https://www.genome.jp/tools/motif/>. Se seleccionaron las bases de datos de PFAM (Finn y cols., 2014) y NCBI CDD (Marchler-Bauer y cols., 2017). Se anotaron todos los motivos conservados encontrados.

6.5.5 Análisis de motivos en alineamientos

Los motivos en los alineamientos también fueron analizados utilizando logos de secuencias. En esta investigación se utilizó WebLogo (Crooks, Hon, Chandonia, y Brenner, 2004) para realizar los logos utilizando los alineamientos realizados previamente. Se marcaron todos los patrones donde se observaban los símbolos de los aminoácidos de mayor tamaño.

6.5.6 Diseño de oligonucleótidos iniciadores degenerados

Para diseñar los oligonucleótidos iniciadores degenerados se utilizó la aplicación de j-CODEHOP (Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers) (Boyce, Chilana, y Rose, 2009; Rose y cols., 1998; Rose, Henikoff, y Henikoff, 2003). En la aplicación se abrieron los alineamientos realizados, se definió un porcentaje de estrictez de 80% y máxima degeneración de 1000. Se seleccionaron los oligonucleótidos iniciadores degenerados obtenidos y se guardaron en un archivo .csv generado por el programa.

6.5.7 Evaluación de parámetros de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados

Los oligonucleótidos iniciadores degenerados generados se colocaron en un archivo FASTA y se analizaron utilizando Multiple Primer Analyzer de Thermo Fisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/gt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>)

Todos los datos generados se guardaron en un archivo de Excel para facilitar su lectura. Se seleccionaron los oligonucleótidos iniciadores degenerados con la menor cantidad de estructuras secundarias.

6.5.8 Generación de permutaciones de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados y evaluación de especificidad

Para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados se generaron todas las permutaciones de la secuencia de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados. Esto se realizó utilizando el programa BasesN hecho por Juan Pablo Pira, el código en Pascal de este programa se encuentra en la sección de anexos. El análisis de especificidad fue realizado a través de Basic local alignment search tool para nucleótidos (Altschul, Gish, Miller, Myers, y Lipman, 1990) en la página del NCBI utilizando los parámetros estándares de la aplicación. Se utilizó Megablast, para secuencias altamente similares. Únicamente se tomaron en cuenta los resultados obtenidos con un Valor E menor de 2.5.

6.5.9 PCR *in silico*

Para realizar el PCR *in silico*, se utilizó la herramienta de NCBI, Primer Blast. Se colocaron las permutaciones de cada par de oligonucleótidos iniciadores degenerados que se encuentran en la Tabla 6.2. Se probaron en los siguientes organismos: bacterias que pertenecen a los grupos de Enterobacteriaceae (taxid:91347), *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* (taxid:91061), *Bacillus/Staphylococcus* (taxid:1385).

Tabla 6.2: Permutaciones utilizadas para PCR *in silico*.

Oligo	Permutaciones seleccionadas
PPHP-F	CCACGGCTTCCTGCCACCACACCC
	CCACGGCTTCCTGCCACCTCACCC
	CCACGGCTTCCTGCCCCCTCACCC
	CCACGGCTTCCTGCCGCCCATCC
	CCACGGCTTCCTGCCTCCTCATCC
IIILi-R	CGCCTGCGCCAATAATAAAAAAAT
	CGCCTGCGCCAATTATAAGGAAGAT
	CGCCTGCGCCGATGATAAGGAGGAT
	CGCCTGCGCCTATAATTAGAAGTAT
	CGCCTGCGCCTATTATTAGTAGTAT
FKEY-R	TTCATGGACAGGTTGAAATACTCCTTAAA
	TTCATGGACAGGTTGAAATACTCTTTGAA
	TTCATGGACAGGTTGAAATATTCTTTGAA
	TTCATGGACAGGTTGAAGTATTCCTTAAA
	TTCATGGACAGGTTGAAGTATTCTTTGAA
AQRIA-F	CAGATTCTGGCGCAGCACAAAGAATAGC
	CAGATTCTGGCGCAGCCCAAAGCATCGC
	CAGATTCTGGCGCAGCCAGCGGATTGC
	CAGATTCTGGCGCAGCGCAGCGGATAGC
	CAGATTCTGGCGCAGCTCAGCGTATTGC
mIIILi-R	GCCTGCGCCAATAATAAAAAAATCAT
	GCCTGCGCCAATAATTAAAAAAATCAT
	GCCTGCGCCAATGATCAGAAGTATCAT
	GCCTGCGCCAATTATAAGTAAAATCAT
	GCCTGCGCCAATTATTAGTAGTATCAT

7.1 Elección de proteína

La proteína seleccionada es el transportador de ácido idónico. Esta proteína, como se observa en la Figura 7.1 y la Figura 7.2, es una proteína transmembranal, por lo que se encuentra en la membrana celular de bacterias. Aunque se le llama transportador de ácido idónico, también transporta otros ácidos orgánicos como el caso de nuestro metabolito de interés, el ácido 5-cetoglucónico. Se seleccionó una proteína transmembranal, debido a que estas forman poros, por lo que existe una mayor probabilidad que sus secuencias se encuentren conservadas. La proteína seleccionada es el transportador de ácido idónico. Esta proteína, como se observa en la Figura 7.1 y Figura 7.2, es una proteína transmembranal, por lo que se encuentra en la membrana celular de bacterias.

Figura 7.1: Diagrama de proteína transportadora de ácido idónico en bacterias Gram negativo (Keseler y cols., 2017). En el diagrama se muestra una representación de la localización de la proteína en la membrana celular y los ácidos, 5-cetoglucónico, idónico y glucónico, transportados por esta proteína. La proteína utilizada para los análisis en esta investigación es la azul, marcada con un rectángulo azul, la naranja representa las porinas, *ompF*, *ompN*, *ompC* y *phoE*, que se encuentran en la segunda membrana que transportan los ácidos del espacio periplásmico al exterior. El diagrama fue realizado utilizando BioRender.com.

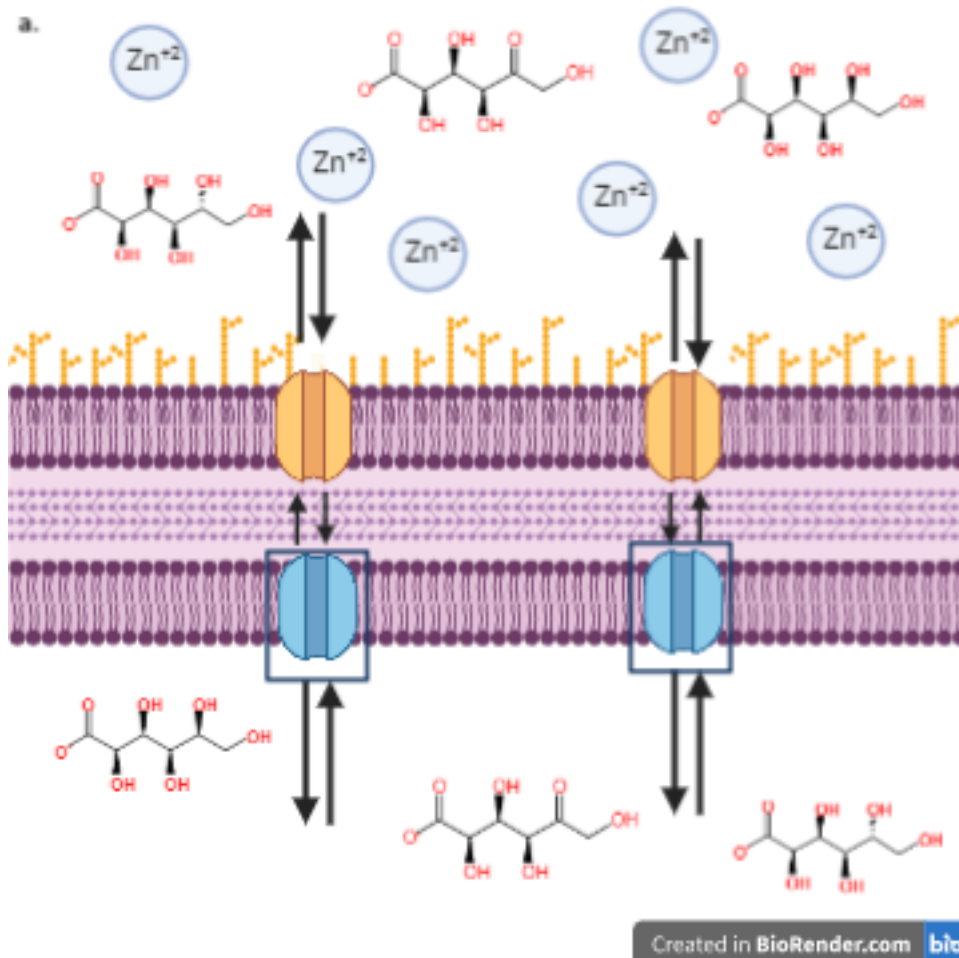
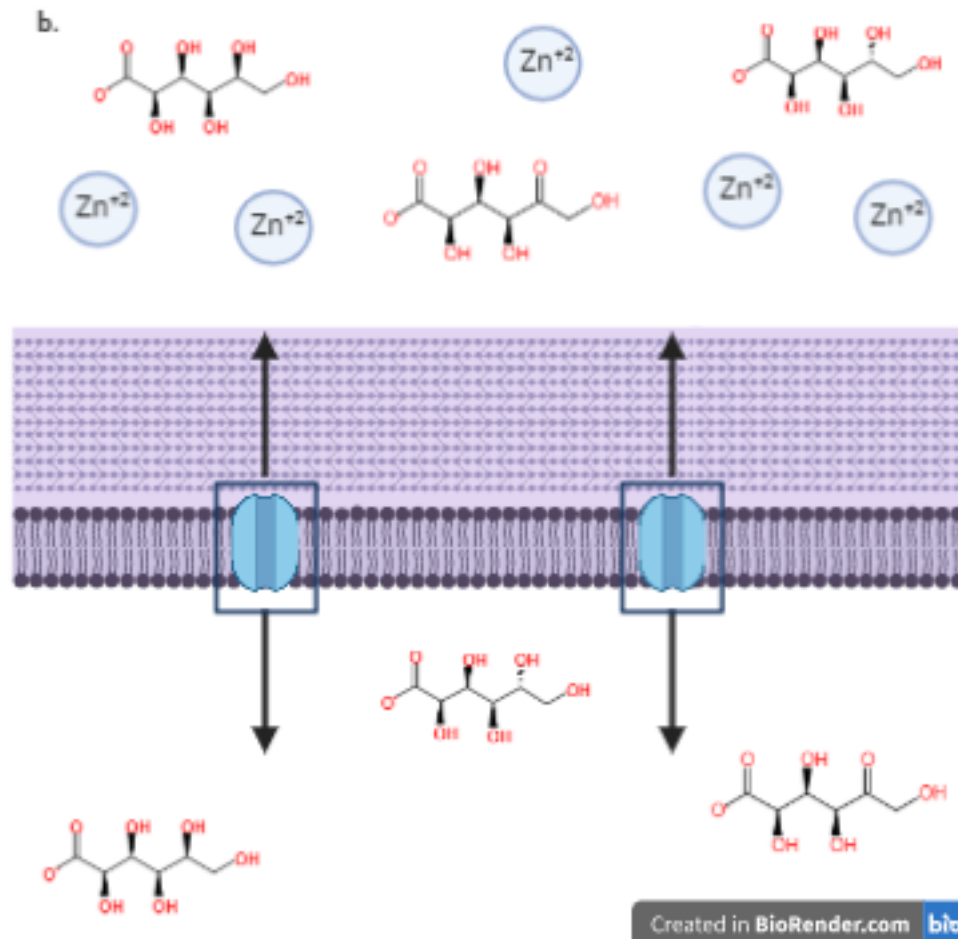


Figura 7.2: Diagrama de proteína transportadora de ácido idónico en bacterias Gram positivo (Keseler y cols., 2017). En el diagrama se muestra una representación de la localización de la proteína en la membrana celular y los ácidos, 5-cetoglucónico, idónico y glucónico, transportados por esta proteína. La proteína se encuentra marcada con un rectángulo azul. El diagrama fue realizado utilizando BioRender.com.



7.2 Alineamientos de proteínas

Se realizaron alineamientos de las secuencias de diferentes bacterias del transportador de ácido idónico. Estos se hicieron usando tanto ClustalW como MUSCLE y separándolas por Gram negativo y Gram positivo. En ambos alineamientos se observaron diferentes motivos en común en todas las secuencias alineadas. En las bacterias Gram negativo se identificaron los siguientes motivos: SGAA, FVLLLVP, PPHPSP, LMVLA, SHVND, FWMFKEYF y VLLL (Figura 7.3). Los motivos se encontraron tanto en el inicio como en final de las secuencias. En el caso de las bacterias Gram positivo se encontraron los siguientes motivos: LLFL, GFGA, SDGAAQRTA, PPHPGPTA, TAAG, MVLA y FKEYF (Figura 7.4). Al igual que en el caso de las bacterias Gram negativo, estos se encontraron tanto en el inicio como en el final de las secuencias.

Figura 7.3: Logo de secuencia de alineamiento de proteínas realizado con bacterias Gram negativo. Los aminoácidos con letra de mayor tamaño son los que más se repiten en cada posición. En el logo presentado el verde indica si el aminoácido representado por la letra es este es polar, morado si este es neutral, azul si este es básico, rojo si este es ácido y negro si este es hidrofóbico. Las flechas marcan la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados a partir de este alineamiento y si estos van hacia delante o hacia atrás.

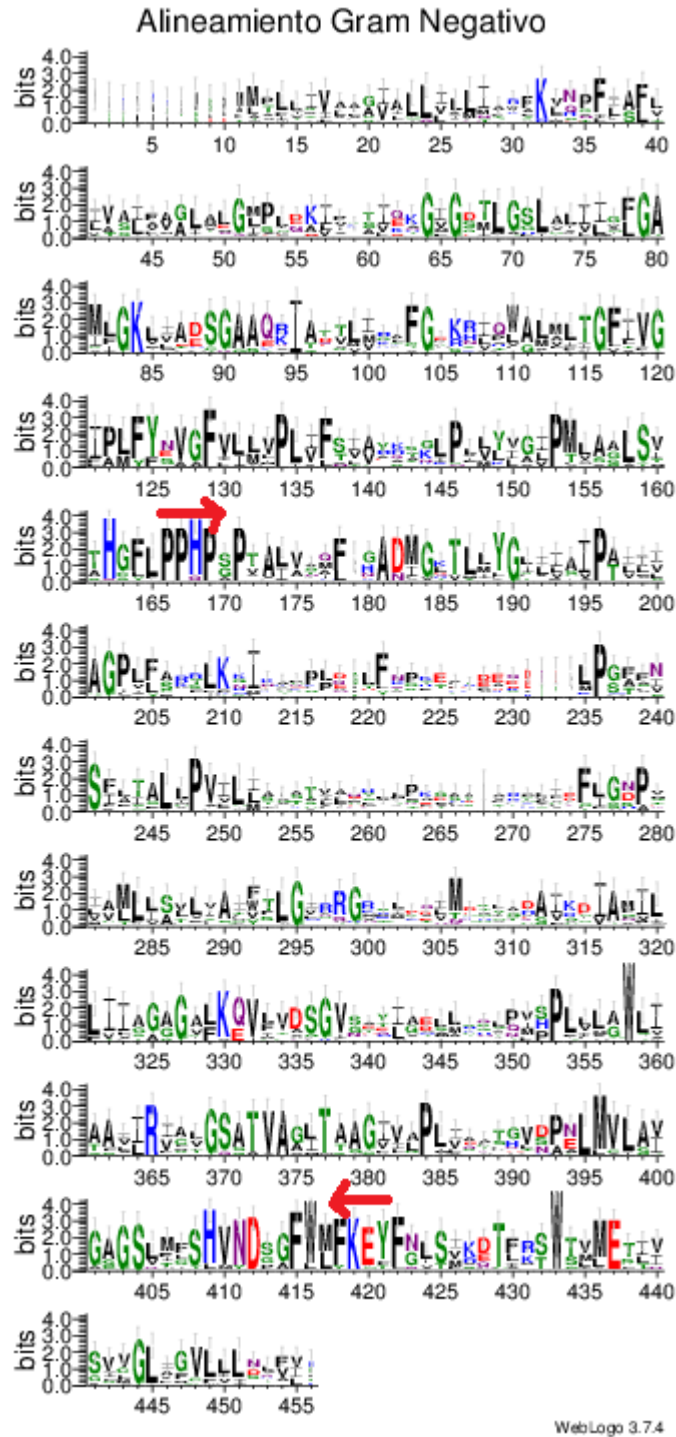
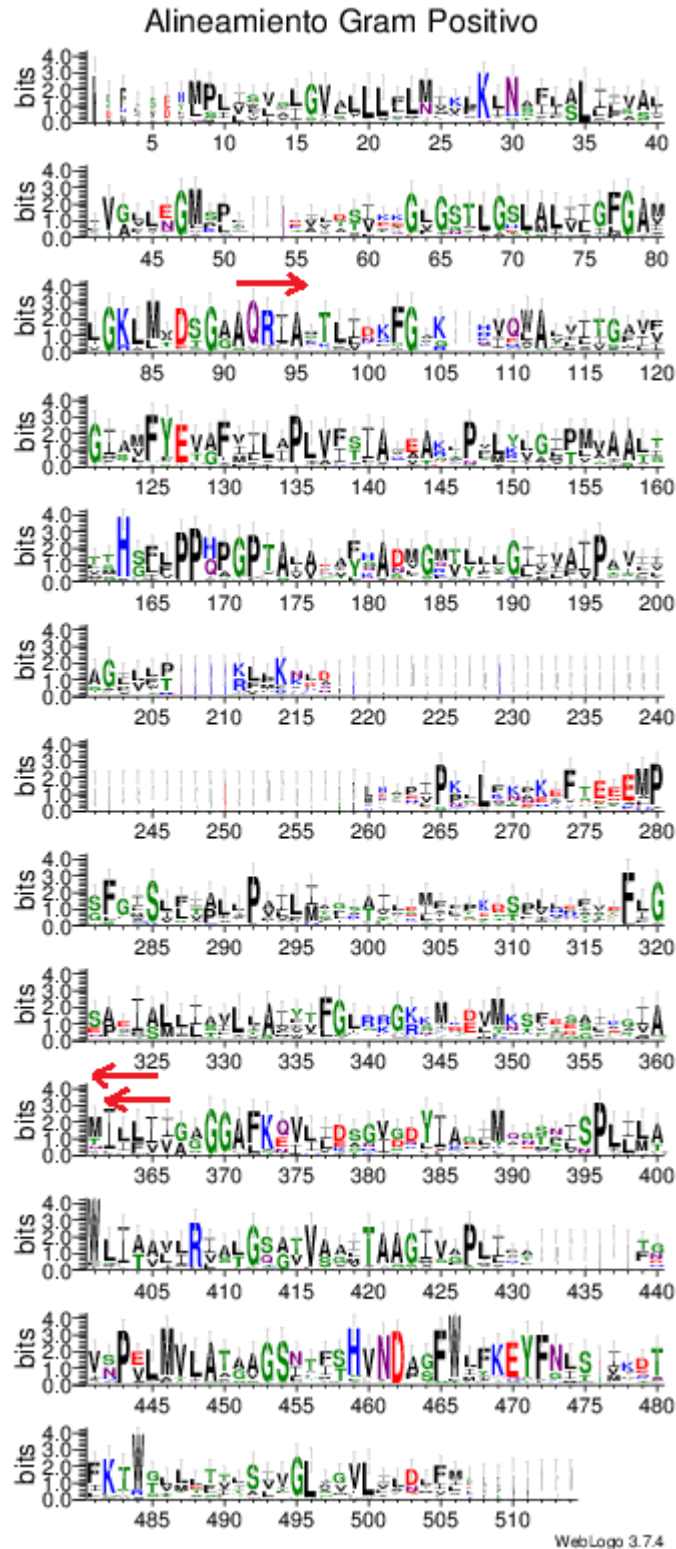


Figura 7.4: Logo de secuencia de alineamiento de proteínas realizado con bacterias Gram positivo. Los aminoácidos con letra de mayor tamaño son los que más se repiten en cada posición. En el logo presentado el verde indica si el aminoácido representado por la letra es este es polar, morado si este es neutral, azul si este es básico, rojo si este es ácido y negro si este es hidrofóbico. Las flechas marcan la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados a partir de este alineamiento y si estos van hacia delante o hacia atrás.



7.3 Motivos encontrados

En la Tabla 7.1 se muestran los motivos encontrados en las proteínas analizadas. La mayor parte de motivos indican que estas proteínas se encuentran en la membrana celular. Además, estas proteínas se encargan del transporte de diferentes biomoléculas como gluconato, carbohidratos, aminoácidos y citrato.

Tabla 7.1: Motivos encontrados en la aplicación MOTIF Search. Se colocaron los motivos que se encontraban en la mayor parte de las proteínas utilizadas en los alineamientos, tanto de Gram positivo y Gram negativo. El código marcado con * indica que solamente se encontró en las proteínas de las bacterias Gram positivo.

Código CDD - NCBI	Descripción de motivo
129873	Transportador de gluconato y permeasa
182094	Transportador putativo
182147	Permeasa DsdX
182203	Transportador de gluconato GntP
182485	Transportador de gluconato de baja afinidad
225330	GntT, simporte de gluconato/ H^+ y permeasas relacionadas (transporte de carbohidratos y aminoácidos)
237880	Transportador de gluconato
308194	Permeasa de la familia GntP
377075	Transportador de citrato
224509*	Sistema de transporte tipo TRAP de C4-dicarboxilato

7.4 Oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados

Los oligonucleótidos iniciadores degenerados se diseñaron a partir de los alineamientos obtenidos. Se realizaron dos grupos de oligonucleótidos iniciadores degenerados diferentes, con el alineamiento de las bacterias Gram negativo y de las Gram positivo. Después de realizar pruebas en estos oligonucleótidos iniciadores degenerados se eligieron los que se presentan con su respectiva pareja en la Tabla 7.2. Los que no se seleccionaron se encuentran en la sección de ANEXOS.

Tabla 7.2: Pares de oligonucleótidos iniciadores degenerados seleccionados en esta investigación

Par	Oligos	Secuencia (5' - 3')
1	PPHP-F	CCACGGCTTCCTGCCNCCNCAYCC
	ILLi-R	CGCCTGCGCCDATDATNARNARDAT
2	PPHP-F	CCACGGCTTCCTGCCNCCNCAYCC
	FKEY-R	TTCATGGACAGGTTGAARTAYTCYTTRAA
3	AQRIA-F	CAGATTCTGGCGCAGCNCARMGNATHGC
	ILLi-R	CGCCTGCGCCDATDATNARNARDAT
4	AQRIA-F	CAGATTCTGGCGCAGCNCARMGNATHGC
	mILLI-R	GCCTGCGCCAATDATNARNARDATCAT

7.5 Especificidad de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados

Todos los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados, incluso los que no se seleccionaron en esta investigación, fueron analizados utilizando BLASTn de NCBI. Los principales criterios de selección de los oligonucleótidos iniciadores degenerados fueron su Valor E, ya que identifica que tan significativo es el resultado obtenido, y el porcentaje de identidad. Los principales resultados del uso de BLAST de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados seleccionado se muestran en tablas colocadas en la sección de ANEXOS. En las Figuras 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 7.10 y 7.11 se muestra un diagrama de un gel con los resultados de la amplificación con los pares de oligonucleótidos iniciadores degenerados elegidos.

Figura 7.5: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y ILLi-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 100 pares de bases.

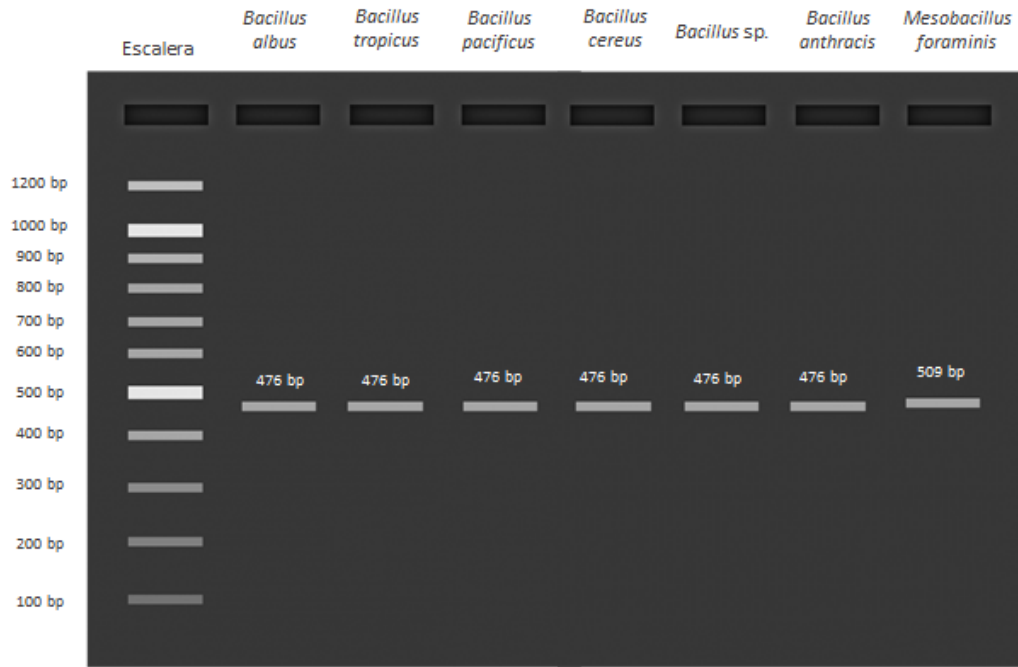


Figura 7.6: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y ILLi-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 100 pares de bases.

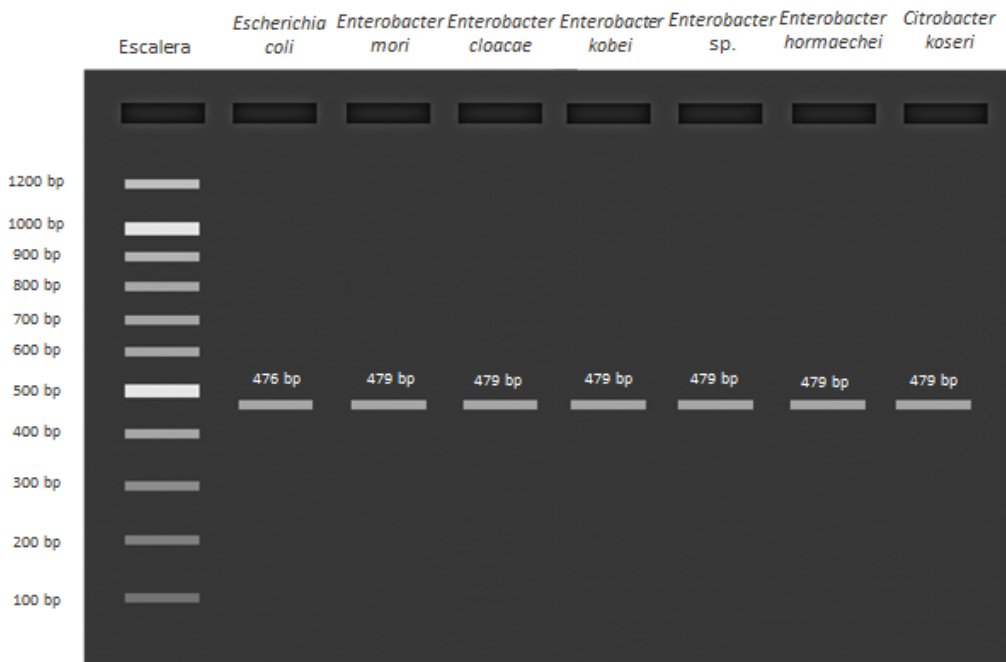


Figura 7.7: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y ILLi-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 100 pares de bases.



Figura 7.8: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y FKEY-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 100 pares de bases.

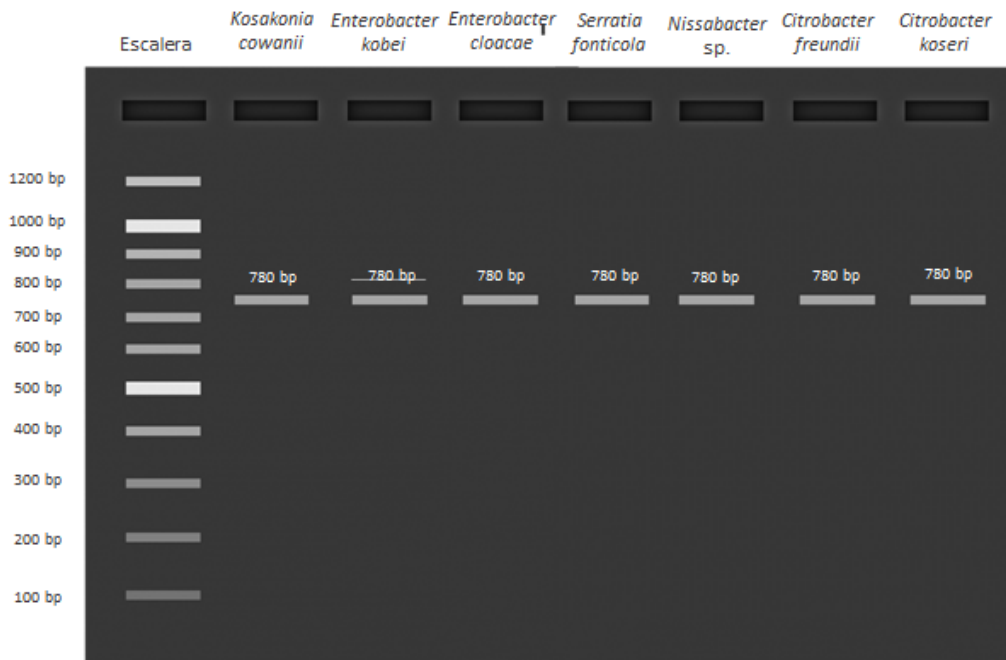


Figura 7.9: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados PPHP-F y FKEY-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 100 pares de bases.

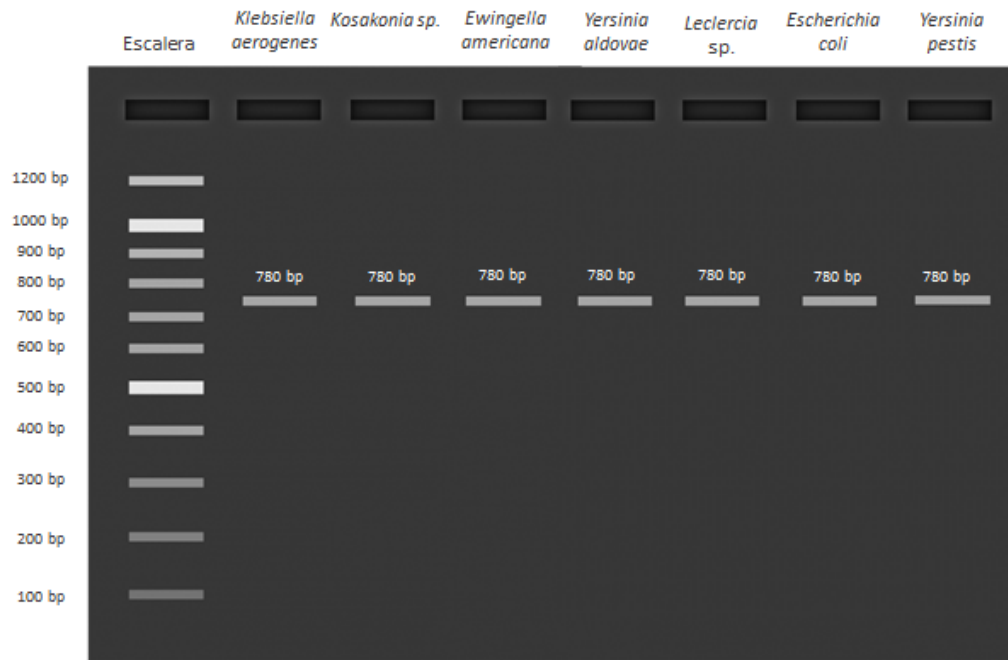
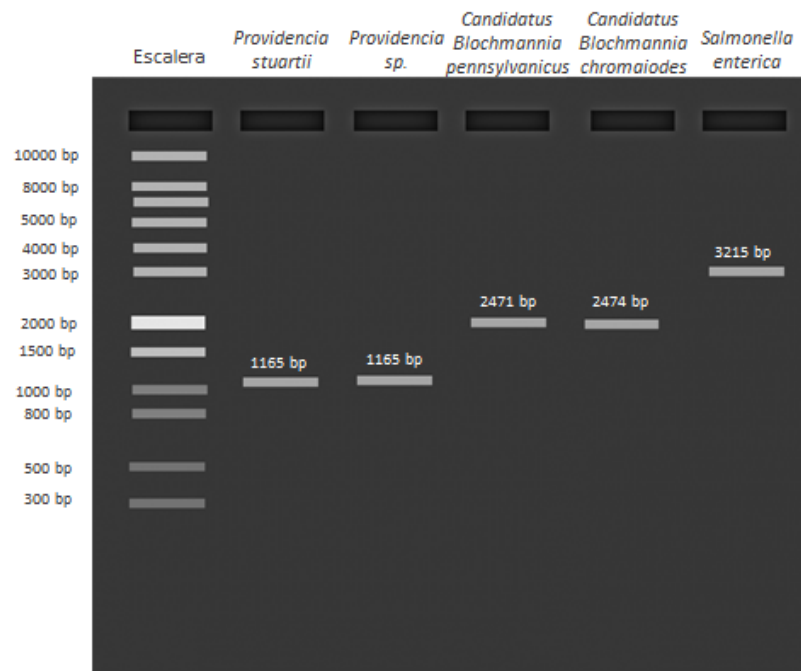


Figura 7.10: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados AQRIA-F y ILLI-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 1 kb.



Figura 7.11: Resultados de PCR *in silico* con los oligonucleótidos iniciadores degenerados AQRIA-F y mILLI-R. Arriba de cada producto se muestra su tamaño estimado. El diagrama tiene una escalera de 1 kb.



Discusión de resultados

En los alineamientos realizados, representados por las Figuras 7.4 y 7.3, se encontraron diferentes segmentos de aminoácidos conservados en las secuencias de proteínas de las diferentes bacterias, tanto en el caso de las Gram negativo como de las Gram positivo, estos se encontraban en su mayoría al principio y al final de las secuencias de proteínas. Los segmentos de aminoácidos se identificaron como motivos en estas secuencias. Estos motivos conservados a lo largo de las secuencias se debían principalmente a que estas partes son esenciales para el correcto funcionamiento del transportador. No se observaron los mismos en las proteínas de bacterias Gram negativo y Gram positivo debido a la diferencia en la estructura de su pared celular (Fisher y Mobashery, 2020). Aun así, existen similitudes en algunos de los motivos identificados en las secuencias que muy probablemente son los que le dan a la proteína su función. Uno o de los motivos identificados en ambos alineamientos fue el formado por prolina, prolina, histidina y prolina (PPHP). La prolina permite a las proteínas formar interacciones sin necesidad de que estas sean de alta afinidad, por lo que las interacciones pueden ser revertidas rápidamente (Srinivasan y Dunker, 2012). Esto puede relacionarse con que la proteína analizada forme parte de un operón.

La Tabla 7.1, muestra los motivos de secuencias encontrados y sus funciones. La mayor parte de estos motivos muestran que tienen función de transportador. En algunos casos se observa que no solo transportan gluconato y ácidos similares, como el ácido 5-cetoglucónico, sino que otros metabolitos de interés como carbohidraatos y aminoácidos. Estos motivos estructurales son hélices alfa (Peekhaus y Conway, 1998). Esta clase de proteínas se relacionan con el exterior, lo que tiene sentido para las proteínas investigadas debido a que transportan metabolitos dentro y fuera de la célula (Taylor, Toseland, Attwood, y Flower, 2006).

Como se puede observar en las Figuras 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 7.10 y 7.11, los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en la mayor parte de los casos no fueron específicos para Gram positivo o para Gram negativo. Esto puede deberse a que no se probaron todas las posibles permutaciones debido a la gran cantidad generada por cada oligonucleótidos iniciadores degenerados. También se observaron algunas cianobacterias, esto puede deberse a que el transportador está involucrado en vías metabólicas necesarias para la supervivencia de estos seres vivos (Guzmán y cols., 2012). Aunque las permutaciones utilizadas para realizar un BLAST se eligieron tratando que estas permutaciones tuvieran los cambios generados por las bases degeneradas, puede que estas no hayan

sido las más idóneas. Por estos motivos, se recomienda seleccionar una mayor cantidad de permutaciones generadas para conocer en mayor profundidad la especificidad de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados.

La especificidad observada de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados también puede deberse a que los segmentos elegidos por el programa utilizado para diseñarlos, j-CODEHOP, eran los que se encontraban conservados en los alineamientos. Estos segmentos conservados, como ya se mencionó anteriormente, en algunos casos eran similares para ambos tipos de bacterias. Tomando esto en cuenta, los oligonucleótidos iniciadores degenerados generados en esta investigación no pueden utilizarse para distinguir entre bacterias Gram positivo y Gram negativo. De cualquier manera, estos oligonucleótidos iniciadores degenerados se pueden utilizar al tamizar muestras de suelo, debido a que indican la presencia del transportador y, por lo tanto, la producción de ácido 5-cetoglucónico. Sin embargo, debido a que la producción de esta clase de ácidos se ve afectada por factores externos como las azúcares en el medio en que se encuentren las bacterias, la naturaleza del suelo y, en algunos casos la represión catabólica, no será posible asegurar que las bacterias tamizadas produzcan una cantidad específica de ácido 5-cetoglucónico (Archana, Buch, y Kumar, 2013).

Los pasos a seguir con los resultados obtenidos son probar los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en bacterias que ya se conoce que producen ácido 5-cetoglucónico, para conocer si estos son efectivos para poder realizar el tamizaje de las bacterias que lo producen. La metodología que se recomienda es utilizar los procedimientos detallados en la sección ANEXOS, para primero encontrar las bacterias que producen el ácido y después utilizar los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados.

Las limitaciones de una investigación hecha a través de bioinformática es que las secuencias utilizadas dependen de que todos los datos colocados en las bases de datos se encuentren previamente verificados. Además, no se conoce si en el suelo donde se cultiva *Saccharum officinarum* se encuentran todas las bacterias de dónde se obtuvieron las secuencias iniciales. Otra limitación es en el método de diseño de los oligonucleótidos iniciadores degenerados. El método utilizado los diseñó a partir de los alineamientos de las proteínas y la tabla de codones de un organismo específico, en el caso de esta investigación se escogió a *E. coli*, por lo que si la tabla de codones de una bacteria fuera muy diferente puede que en esta no funcionen los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados. Otra limitación importante de resaltar fue la manera de comprobar la especificidad de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados. Como no se utilizaron todas las permutaciones generadas, puede que se amplifiquen más organismos no deseados de lo reportados en esta investigación.

En esta investigación fue posible diseñar oligonucleótidos iniciadores degenerados para el transportador de ácido 5-cetoglucónico utilizando secuencias de diferentes bacterias, si se cumplió la hipótesis planteada en un inicio. Como toda proteína es un producto de un gen, si existe un gen suficientemente conservado para realizar tamizaje de proteobacterias.

Se recomienda para futuras investigaciones utilizar más permutaciones de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados para conocer con mayor profundidad su especificidad. Además, se recomienda, en caso sea posible, utilizar secuencias de nucleótidos, debido a que esto facilita la mayor parte de problemas encontrados con realizar el diseño de oligonucleótidos iniciadores degenerados y que exista una menor degeneración.

Según los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que existe un gen conservado en proteobacterias con el cual es posible tamizarlas según si son capaces de producir ácidos orgánicos. Debido a que existe este gen, fue posible diseñar oligonucleótidos iniciadores degenerados para detectar proteobacterias productoras de ácidos orgánicos y solubilizadoras de zinc. Los oligonucleótidos iniciadores generados en esta investigación podrán ser utilizados para tamizar muestras de suelo de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, además de otros suelos de Guatemala, para identificar y aislar microorganismos adaptados para distintos ecosistemas del país.

Conclusiones

- 9.1 Se identificó al transportador de ácido idónico, que transporta el ácido 5-cetoglucónico, presente en diferentes proteobacterias que se encuentran en la rizósfera.
- 9.2 Se encontraron diferentes motivos que se conservaban en los alineamientos de bacterias Gram positivo y Gram negativo e incluso algunos que se compartían para ambos tipos de bacterias.
- 9.3 Se diseñaron cinco diferentes oligonucleótidos iniciadores degenerados que detectan el transportador de ácido idónico en proteobacterias.
- 9.4 Se diseñaron nueve diferentes oligonucleótidos iniciadores degenerados utilizando como base secuencias de proteínas de bacterias de rizósfera. Estos son capaces de detectar transportadores de ácidos orgánicos, incluyendo el ácido 5-cetoglucónico. Debido a que este ácido se conoce que es capaz de solubilizar de zinc, las bacterias que lo secretan pueden solubilizar zinc en forma de óxido de zinc y carbonato de zinc.

CAPÍTULO 10

Recomendaciones

Para comprobar que los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en esta investigación sean capaces de detectar proteobacterias productoras de zinc se recomienda realizarlo a través de un PCR *in vitro*.

Además, se deben de cultivar las bacterias de todas las muestras tamizadas, aun en las que se obtuvo un resultado negativo en el PCR. Para limitar la cantidad de bacterias cultivadas se recomienda también utilizar diferentes medios selectivos, para realizarle más pruebas a bacterias de géneros específicos, en este caso enterobacterias.

A las bacterias cultivadas se le deben de realizar las pruebas detalladas en ANEXOS para asegurar que estos oligonucleótidos iniciadores son capaces de realizar el tamizaje de manera correcta.

Referencias

- Abass Ahanger, M., Morad-Talab, N., Abd-Allah, E. F., Ahmad, P., y Hajiboland, R. (2016). Plant Growth under Drought Stress: Significance of Mineral Nutrients. En P. Ahmad (Ed.), *Water stress and crop plants: A sustainable approach* (Vol. 2, pp. 649–668). John Wiley & Sons, Ltd. Descargado de <https://www.researchgate.net/publication/304479896> doi: 10.1002/9781119054450.ch37
- AKIANTO. (2012). *Impacto Social y Económico del Sector Agrícola Guatemalteco Sobre la Economía Nacional* (Inf. Téc.). Ciudad de Guatemala: Agrequisa.
- Alori, E. T., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2017, jun). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 971. Descargado de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00971/full> doi: 10.3389/fmicb.2017.00971
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. Descargado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2231712/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2231712/?dopt=Citation> doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alvarado-Quiroa, H., y Araya-Rodríguez, F. (2014). Cambios de Uso del Suelo y Crecimiento Urbano. Estudio de Caso en los Municipios Conurbados de la Mancomunidad Metrópoli de Los Altos, Quetzaltenango, Guatemala. *Tecnología en Marcha*, 27(1), 104–113.
- Archana, G., Buch, A., y Kumar, G. N. (2013, oct). Pivotal Role of Organic Acid Secretion by Rhizobacteria in Plant Growth Promotion. En *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology* (pp. 35–53). Springer Netherlands. Descargado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-2214-9_{_}3 doi: 10.1007/978-94-007-2214-9_3
- Bakker, P. A., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C., y Pieterse, C. M. (2013, may). The Rhizosphere Revisited: Root Microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAY). doi: 10.3389/fpls.2013.00165
- BANGUAT. (s.f.). *PIB Período 2000 a 2005*. Descargado 2020-11-05, de <https://www.banguat.gob.gt/inc/ver.asp?id=estaeco/sr/sr024{&}e=46337>
- Barak, P., y Helmke, P. A. (1993). The Chemistry of Zinc. En A. D. Robson (Ed.), *Zinc in soils and plants* (pp. 1–13). Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-011-0878-2_1
- Blum, W. E. (2005, aug). *Functions of Soil for Society and the Environment* (Vol. 4) (n.º 3). Springer. doi: 10.1007/s11157-005-2236-x

- Boardman, R., y McGuire, D. O. (1990, nov). The Role of Zinc in Forestry. I. Zinc in Forest Environments, Ecosystems and Tree Nutrition. *Forest Ecology and Management*, 37(1-3), 167–205. doi: 10.1016/0378-1127(90)90054-F
- Boyce, R., Chilana, P., y Rose, T. M. (2009). iCODEHOP: A New Interactive Program for Designing CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from Multiply Aligned Protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), W222. Descargado de /pmc/articles/PMC2703993/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2703993/ doi: 10.1093/nar/gkp379
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., y Brenner, S. E. (2004, jun). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190. Descargado de www.genome.org doi: 10.1101/gr.849004
- de la Guardia Peña, O., Ustáriz García, C., García García, M. d. l. Á., y Morera Barrios, L. (2011). Algunas Aplicaciones Clínicas del Zinc y su Acción Sobre el Sistema Inmune. Some Clinical Applications of Zinc and Its Effect on the Immune System. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27(3), 367–381. Descargado de http://scielo.sld.cu
- Egamberdieva, D., Wirth, S., y Abd-Allah, E. F. (2017). Tripartite Interaction Among Root-Associated Beneficial Microbes Under Stress. En *Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation* (pp. 219–236). Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-4862-3_11
- El-Debaiky, S. (2019). Biological Control of Some Plant Diseases Using Different Antagonists Including Fungi and Rhizobacteria. En R. Z. Sayyed (Ed.), *Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management volume 2: Rhizobacteria in biotic stress management* (pp. 47–64). Springer Nature Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-6986-5
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., ... Punta, M. (2014, jan). Pfam: The Protein Families Database. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D230. Descargado de /pmc/articles/PMC3965110/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965110/ doi: 10.1093/nar/gkt1223
- Fisher, J. F., y Mobashery, S. (2020, mar). Constructing and Deconstructing the Bacterial Cell Wall. *Protein Science*, 29(3), 629–646. Descargado de https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.3737 doi: 10.1002/pro.3737
- Ghevariya, K., y Desai, P. (2014). Rhizobacteria of Sugarcane: In vitro Screening for Their Plant Growth Promoting Potentials. *Research Journal of Recent Sciences*, 3, 52–58. Descargado de www.isca.me
- GIMBOT. (2014). *Mapa de Bosques y Uso de la Tierra 2012* (Inf. Téc.). Ciudad de Guatemala: MARN.
- Gregory, P. J., y Nortcliff, S. (2013). *Soil Conditions and Plant Growth*. Wiley Blackwell.
- Guzmán, D., Balderrama-Subieta, A., Cardona-Ortuño, C., Guevara-Martínez, M., Callisaya-Quispe, N., y Quillaguamán, J. (2012, apr). Evolutionary patterns of carbohydrate transport and metabolism in *Halomonas boliviensis* as derived from its genome sequence: Influences on polyester production. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 1–12. Descargado de https://link.springer.com/articles/10.1186/2046-9063-8-9 doi: 10.1186/2046-9063-8-9
- Hacisalihoglu, G., y Kochian, L. V. (2003, aug). How Do Some Plants Tolerate Low Levels of Soil Zinc? Mechanisms of Zinc Efficiency in Crop Plants. *New Phytologist*, 159(2), 341–350. Descargado de http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-8137.2003.00826.x doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00826.x
- Haider, M. U., Hussain, M., Farooq, M., y Nawaz, A. (2018). Soil Application of Zinc Improves the Growth, Yield and Grain Zinc Biofortification of Mungbean. *Soil Environ*, 37(2), 123–128. Descargado de http://www.sss-pakistan.org doi: 10.25252/SE/18/71610
- Herrero, E., y Vigil, A. (2003). Metodología Recomendada para la Medición del Contenido de Zinc en Especímenes Biológicos. *Química Clínica*, 22(1), 13–18.
- Ibarra, J., y Encina Rojas, A. (2003). La Degradación del Suelo y sus Efectos Sobre la Población. *Población y Desarrollo*, 25, 5–10.
- Keseler, I. M., Mackie, A., Santos-Zavaleta, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., ... Karp, P. D. (2017, jan). The EcoCyc Database: Reflecting New Knowledge About Escherichia

- coli K-12. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D543–D550. Descargado de <https://academic.oup.com/nar/article/45/D1/D543/2605724> doi: 10.1093/nar/gkw1003
- Krishnan, V., Kumar, S., y Praveen, S. (2019). *Omics Meet Plant Biochemistry: Applications in Nutritional Enhancement with One Health Perspective*. New Delhi: ICAR-Indian Agricultural Research Institute.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018, jun). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kumawat, N., Kumar, R., Kumar, S., y Meena, V. S. (2017). Nutrient Solubilizing Microbes (NSMs): Its Role in Sustainable Crop Production. En V. Meena, P. Mishra, J. Bisht, y A. Pattanayak (Eds.), *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture. volume 2: Applications in crop production and protection* (pp. 25–61). Singapur: Springer Nature Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-5343-6
- Lagos, M. L., Maruyama, F., Nannipieri, P., Mora, M. L., Ogram, A., y Jorquera, M. A. (2015, jun). Current Overview on the Study of Bacteria in the Rhizosphere by Modern Molecular Techniques: A Mini-Review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 504–523. doi: 10.4067/s0718-95162015005000042
- Lata, R., y Gond, S. K. (2019, jan). Plant Growth-Promoting Microbes for Abiotic Stress Tolerance in Plants. En *Role of plant growth promoting microorganisms in sustainable agriculture and nanotechnology* (pp. 89–105). Elsevier. doi: 10.1016/b978-0-12-817004-5.00006-3
- Leal, J. (2002). *Memoria Ataca Congreso de Técnicos Azucareros de C.A. ATAGUA*.
- Liu, M. S., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, Z., Huang, F., y Yu, H. M. (2020, mar). High-Precision Cd Isotope Measurements of Soil and Rock Reference Materials by MC-ICP-MS with Double Spike Correction. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 44(1), 169–182. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ggr.12291> doi: 10.1111/ggr.12291
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., ... Bryant, S. H. (2017, jan). CDD/SPARCLE: Functional Classification of Proteins via Subfamily Domain Architectures. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D200–D203. Descargado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27899674/> doi: 10.1093/nar/gkw1129
- Maret, W. (2013, jan). Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Advances in Nutrition*, 4(1), 82–91. Descargado de <https://academic.oup.com/advances/article/4/1/82/4591598> doi: 10.3945/an.112.003038
- Mendes, R., Garbeva, P., y Raaijmakers, J. M. (2013, sep). *The Rhizosphere Microbiome: Significance of Plant Beneficial, Plant Pathogenic, and Human Pathogenic Microorganisms* (Vol. 37) (n.º 5). Oxford Academic. doi: 10.1111/1574-6976.12028
- Osman, K. T., y Osman, K. T. (2014). Soil Resources and Soil Degradation. En *Soil degradation, conservation and remediation* (pp. 1–43). Springer Netherlands. Descargado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7590-9_{_}1 doi: 10.1007/978-94-007-7590-9_1
- Pacheco, F. A. L., Sanches Fernandes, L. F., Valle Junior, R. F., Valera, C. A., y Pissarra, T. C. T. (2018, oct). Land Degradation: Multiple Environmental Consequences and Routes to Neutrality. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 5, 79–86. doi: 10.1016/j.coesh.2018.07.002
- Peekhaus, N., y Conway, T. (1998). What's for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 180(14), 3495–3502. doi: 10.1128/JB.180.14.3495-3502.1998
- Pimentel, D. (1993). *World Soil Erosion and Conservation* (D. Pimentel, Ed.). Cambridge University Press. Descargado de <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9780511735394/type/book> doi: 10.1017/CBO9780511735394
- Plum, L. M., Rink, L., y Haase, H. (2010, mar). The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1342–1365. Descargado de <http://www.mdpi.com/1660-4601/7/4/1342> doi: 10.3390/ijerph7041342
- Porta, J., López-Acevedo, M., y Poch, R. M. (2019). *Edafología: Uso y Protección de Suelos* (4.^a ed.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

- Reinhold-Hurek, B., Bunger, W., Burbano, C. S., Sabale, M., y Hurek, T. (2015, aug). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 403–424. Descargado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26243728> doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102342
- Romero, W. (2012). *La Agricultura Familiar en Guatemala* (Inf. Tec.). Ciudad de Guatemala: RIMISP. Descargado de www.rimisp.org
- Rose, T. M., Henikoff, J. G., y Henikoff, S. (2003, jul). CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR Primer Design. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3763–3766. Descargado de [/pmc/articles/PMC168931/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC168931/?report=abstract)<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168931/> doi: 10.1093/nar/gkg524
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrovski, S., McCallum, C. M., y Henikoff, S. (1998, apr). Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers for Amplification of Sistantly Related Sequences. *Nucleic Acids Research*, 26(7), 1628–1635. Descargado de <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html> doi: 10.1093/nar/26.7.1628
- Rudani, K., Patel, V., y Prajapati, K. (2018). The Importance of Zinc in Plant Growth - A Review. *International Research Journal of Natural and Applied Sciences ISSN*, 46(2), 2349–4077. Descargado de www.aarf.asia,
- Sadeghzadeh, B. (2013). A Review of Zinc Nutrition and Plant Breeding. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(4), 907–927. Descargado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162013000400012&lng=es&nrm=iso&tlng=enhttps://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-95162013000400012&lng=es&nrm=iso&tlng=en doi: 10.4067/S0718-95162013005000072
- Sadeghzadeh, B., y Rengel, Z. (2011, jul). Zinc in Soils and Crop Nutrition. En *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops* (pp. 335–375). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. Descargado de <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470960707.ch16> doi: 10.1002/9780470960707.ch16
- Sanchez-Moreno, S., y Ferris, H. (2007, feb). Suppressive Service of the Soil Food Web: Effects of Environmental Management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119(1-2), 75–87. doi: 10.1016/j.agee.2006.06.012
- Saravanan, V. S., Rohini Kumar, M., y Sa, T. (2011). Microbial Zinc Solubilization and Their Role on Plants. En D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiology: Plant nutrient management* (Springer ed., pp. 47–63). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-21061-7_3
- Schaller, G. E., Bishopp, A., y Kieber, J. J. (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell*, 27, 44–63. Descargado de www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.114.133595 doi: 10.1105/tpc.114.133595
- Smirnova, I., y Sadanov, A. (2019). The Biological Method of Increasing Seed Germination and Productivity of Grain Crops. En *Plant growth promoting rhizobacteria (pgpr): Prospects for sustainable agriculture* (pp. 47–61). Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-6790-8_3
- Sposito, G. (2008). *The Chemistry of Soils. Second Edition* (Oxford Uni ed.).
- Srinivasan, M., y Dunker, A. K. (2012). Proline Rich Motifs as Drug Targets in Immune Mediated Disorders. *International Journal of Peptides*, 2012, 14. doi: 10.1155/2012/634769
- Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A., y Spiliopoulou, C. (2006, jan). *Zinc: A Multipurpose Trace Element* (Vol. 80) (n.º 1). Springer. doi: 10.1007/s00204-005-0009-5
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology, Fifth Edition*. Sinauer Associates, Inc.
- Taylor, P. D., Toseland, C. P., Attwood, T. K., y Flower, D. R. (2006, nov). Alpha helical trans-membrane proteins: Enhanced prediction using a Bayesian approach. *Bioinformatics*, 1(6), 234–6. Descargado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597896><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1891692>
- Thomas, G. W., y Hanway, J. (1968, apr). Determining Fertilizer Needs. En L. B. Nelson Chairman, M. H. McVickar, R. D. Munson, L. F. Seatz, S. L. Tisdale, y W. C. White (Eds.), *Changing patterns in fertilizer use* (pp. 119–140). Soil Science Society of America. doi: 10.2136/1968.changingpatterns.c5

USDA. (1999). *Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys* (Second ed.).

12.1. Metodología para detección de bacterias solubilizadoras de zinc

12.1.1. Metodología detallada

12.1 Aislamiento de bacterias

- 12.1 Dividir muestra en dos partes.
- 12.2 Parte 1: Pesar 1 g de tierra y colocar en 10 mL de agua estéril.
- 12.3 Parte 2: Colocar a 70 °C por 10 minutos, pesar 1 g de tierra y colocar en 10 mL de agua estéril
- 12.4 Para ambas: Esperar a que se sedimente y realizar diluciones hasta 10⁻⁸
- 12.5 Sembrar en agar Bunt y Rovira, Pikovskaya y MSM.
- 12.6 Incubar a 28 °C por 3 días

12.2 Verificación de solubilización de zinc

- 12.7 Verificar halos producidos en agar.
- 12.8 Medir halos producidos y utilizar la siguiente fórmula para conocer eficiencia.

$$%E = \frac{\text{diámetro halo}}{\text{diámetro colonia}} \times 100 \%$$

- 12.9 Bacterias productoras de halos se reaislan en BHI.

12.3 Ensayo de solubilización de zinc

- 12.10 Preparar cultivo OV de bacterias solubilizadoras
- 12.11 Sembrar 100 uL de bacterias solubilizadoras en 50 mL de medio Bunt y Rovira
- 12.12 Incubar por 7 días a 200 rpm y 30 °C.
- 12.13 Centrifugar.
- 12.14 Tomar sobrenadante y filtrar con filtro 0.45 um
- 12.15 Determinar zinc solubilizado usando AAS.

12.1.2. Medios de cultivo a utilizar

Preparación de agar Bunt y Rovira

Reactivos para 1 litro:

- 10 g de glucosa
- 1 g de sulfato de amonio (NH_4SO_4)
- 0.2 g de cloruro de potasio (KCl)
- 0.1 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4)
- 0.2 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4$)
- 15 g de agar
- 0.1 % de óxido de zinc (ZnO)

Procedimiento:

Mezclar y ajustar a pH 7.0. Pasar por autoclave.

Preparación de agar Pikovskaya

Reactivos para 1 litro:

- 0.5 g de extracto de levadura
- 10 g de dextrosa
- 0.5 g de sulfato de amonio (NH_4SO_4)
- 0.2 g de cloruro de potasio (KCl)
- 0.1 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4$)
- 0.0001 g de sulfato de manganeso ($MnSO_4$)
- 0.0001 g de sulfato ferroso ($FeSO_4$)
- 1 g de óxido de zinc (ZnO)
- 15 g de agar

Procedimiento:

Mezclar y ajustar a pH 7.0. Pasar por autoclave.

Preparación de agar MSM

Reactivos para 1 litro:

- 10 g de glucosa
- 1.8 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4)
- 4.0 g de cloruro de amonio (NH_4Cl)
- 0.2 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 * 7H_2O$)
- 0.1 g de cloruro de sodio ($NaCl$)
- 0.01 g de sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 * 7H_2O$)
- 15 g de agar
- 0.1 % óxido de zinc (ZnO)

Procedimiento:

Mezclar y ajustar el pH a 7.0. Pasar por autoclave.

12.2. Características de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en esta investigación

12.2.1. Oligonucleótidos iniciadores degenerados no seleccionados

Los oligonucleótidos iniciadores degenerados presentados en la Tabla 12.1 no fueron utilizados debido principalmente a la presencia de estructuras secundarias y, en otros casos, poca o nula especificidad.

Tabla 12.1: Oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados, pero no seleccionados en esta investigación. Los nombres de cada oligonucleótidos iniciadores degenerados corresponden a la secuencia de aminoácidos utilizada como base por el programa de diseño. Las secuencias al ser degeneradas incluyen letras que no corresponden a un solo nucleótido. Las letras al final del nombre F y R indican si el oligonucleótidos iniciadores degenerados va hacia delante o hacia atrás.

Nombre oligonucleótido iniciador degenerado	Secuencia (5'-3')	Alineamiento utilizado
SHVND-F	TGGCTCTCTGATGTTTCWSYCAYGTAAYGA	Gram negativo
FKEYF-F	TTCTGGCTTCTGGATGTTYAARGARTAYTT	Gram negativo
LPPH-F	GACCCACGGCTTCYTNCNCNCNA	Gram negativo
PpHP-R	GGCGGTAGGGCCNGGRTGNGGNGG	Gram negativo
LMVL-F	CGTGGACCCTGACYTNATGGTNYT	Gram negativo
SHVN-F	GGCTCCCTGATGTTTCWSNCAYGTAAYGA	Gram negativo
HVND-F	CTCCCTGATGTTCTCCCAYGTAAYGA	Gram negativo
FKEY-F	CCGGCTTCTGGATGTTYAARGARTA	Gram negativo
KEYF-F	CGGCTTCTGGATGTTCAARGARTAYTT	Gram negativo
HVND-R	CATCCAGAAGCCGGARTCRTTNACRTG	Gram negativo
KEYF-R	TCCTTCATGGACAGGTTAARTAYTCYTT	Gram negativo
TAAGI-R	AATCAGAGGTCCCACDATNCCNGCNGCNGT	Gram positivo
LMVLA-F	CAACTGATGTTAATCCTGAAYTNATGGTNYTRGC	Gram positivo
iGFGA-F	TCTCTGGCGCTGATTATHGGNTTYGGNGC	Gram positivo
LGKLM-F	GCTTTGGCGCAATGYTNGGNAARYTNAT	Gram positivo
GAAQR-F	AAACTGATGGCAGATTCTGGNGCNGCNCARMG	Gram positivo
AAQRI-F	ATGGCAGATTCTGGCGCNGCNCARMGNAT	Gram positivo
GAAQR-R	CAATCAGTGTCAATGCAATNCKYTGNGCNGCNC	Gram positivo
AAQRI-R	TATCAATCAGTGTCAATGCDATNCKYTGNGCNGC	Gram positivo
AQRIA-R	CAAATTTATCAATCAGTGTCAATGCDATNCKYTGNGC	Gram positivo
FYEVa-F	TGTATTTGGCATTGCTATGTTYTAYGARGTNGC	Gram positivo
YEVaF-F	TTTGGCATTGCTATGTTCTAYGARGTNGCNTT	Gram positivo
PmvAA-F	CTGTATGTGGGCATGCCNATGGTNGCNGC	Gram positivo
mvAAI-F	ATGTGGGCATGCCATGTTGTTGNGCNGCNYT	Gram positivo
PPhPG-F	ACGCATGGCTTTCTGCCNCCNCAAYCCNGG	Gram positivo
PhPGP-F	CATGGCTTTCTGCCNCCNCAAYCCNGGNC	Gram positivo
hPGPT-F	GGCTTTCTGCCCTCCTCAYCCNGGNCNAC	Gram positivo
PGPTA-F	CTTTCTGCCCTCCTCATCCNGGNCNACNGC	Gram positivo
FYEVa-R	AGAGGAACCAGAATCATAAANGCNACYTCRTARAA	Gram positivo
YEVaF-R	CAGAGGAACCAGAATCATRAANGCNACYTCRTA	Gram positivo
PmvAA-R	CAGAGGAACCAGAATCATRAANGCNACYTCRTA	Gram positivo
mvAAI-R	GCCATGCGTCATAGTNARNGCNGCNCACCAT	Gram positivo
PPhPG-R	CAGCAATTGCTGTAGGNCNGGRTGNGGNGG	Gram positivo

PhPGP-R	CATCAGCAATTGCTGTNGGNCCNGGRTGNGG	Gram positivo
hPGPT-R	ATGCATCAGCAATTGCNGTNGGNCCNGGRTG	Gram positivo
PGPTA-R	ATGAAATGCATCAGCAATNGCNGTNGGNCCNGG	Gram positivo
GGAFK-F	TTATGTTTATTATTGGCGCAGGNGGNGCNTTYAA	Gram positivo
LilAW-F	GAAGATACGACTATTTCTCCTYTNATHYTNGCNTG	Gram positivo
ilAWL-F	TACGACTATTTCTCCTCTGATHYTNGCNTGGYT	Gram positivo
lAWLI-F	CGACTATTTCTCCTCTGATTYTNGCNTGGYT NAT	Gram positivo
AWLIa-F	GACTATTTCTCCTCTGATTATGGCNTGGYT NATHGC	Gram positivo
WLIaA-F	TCTCCTCTGATTATGGCATGGYT NATHGCNGC	Gram positivo
GGAFK-R	CCAGCATCAATTATAACTTGYYTTRAANGCNCCNCC	Gram positivo
GAFKq-R	ACACCAGCATCAATTATAACYTGYYTTRAANGCNCC	Gram positivo
AFKqV-R	CAACACCAGCATCAATTATNACYTGYYTTRAANGC	Gram positivo
FKqVI-R	CCAACACCAGCATCAATNARNACYTGYYTTRAA	Gram positivo
ilAWL-R	GAATCACTGCTGCAATNARCCANGCNARDAT	Gram positivo
AWLIa-R	GCAATACGAATCACTGCNGCDATNARCCANGC	Gram positivo
WLIaA-R	CCATAGCAATACGAATCACNGCNGCDATNARCCA	Gram positivo
LMVLA-F	CAACTGATGTTAATCCTGAAAYTNATGGTNYTNGC	Gram positivo
MVLAT-F	CTGATGTTAATCCTGAACTGATGGTNYTNGCNAC	Gram positivo
sHVND-F	AGCTGGCTCTATTACATTTWSNCAAYGTNAAAYGA	Gram positivo
HVND-A-F	CTGGCTCTATTACATTTACTCAYGTNAAAYGAYGC	Gram positivo
VNDAg-F	GGCTCTATTACATTTACTCATGTNAAAYGAYGCNGG	Gram positivo
MVLAT-R	TAATAGAGCCAGCTGCNGTNGCNARNACCAT	Gram positivo
iGFGA-R	CAGTTTGCCAGCATNGCNCCRAANCCDAT	Gram positivo
GAFKq-F	TTATTGGCGCAGGCGGNGCNTTYAARCA	Gram positivo
AFKqV-F	CGCAGGCGGCGCNTTYAARCARGT	Gram positivo
FKqVI-F	CAGGCGGCGCATTYAARCARGTNYT	Gram positivo

12.2.2. Estructuras secundarias

En la Tabla 12.2 se muestra las estructuras secundarias que se pueden formar con los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados. En las tablas se incluyen todos los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados, no solo los seleccionados.

Tabla 12.2: Estructuras secundarias de oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados en esta investigación.

Nombre oligonucleótido iniciador degenerado	Horquillas	Homodimeros	Heterodimeros
SHVND-F	No hay	No hay	No hay
FKEYF-F	No hay	1	FKEYF-F
FKEYF-R	No hay	No hay	FKEYF-R
LPPH-F	No hay	No hay	PPHP-R
PPHP-F	No hay	No hay	PPHP-R
PPHP-R	No hay	No hay	LPPH-F y PPHP-F
LMVL-F	No hay	No hay	No hay
SHVN-F	No hay	No hay	HVND-R
HVND-F	No hay	No hay	HVND-R y KEYF-R
FKEY-F	No hay	No hay	HVND-R y FKEY-R
KEYF-F	No hay	No hay	HVND-R, FKEY-R y KEYF-R

HVND-R	No hay	No hay	SHVN-F, HVND-F, FKEY-F y KEYF-F
FKEY-R	No hay	1	FKEY-F y KEYF-F
KEYF-R	No hay	No hay	FKEY-F y KEYF-F
TAAGI-R	No hay	3	No hay
LMVLA-F	No hay	No hay	No hay
iGFGA-F	No hay	No hay	iGFGA-R, GAAQR-R, AAQRI-R, AQRIA-R y PmvAA-R
LGKLM-F	No hay	No hay	AFKqV-R
GAAQR-F	No hay	1	AAQRI-F, AQRIA-F, GAAQR-R, AAQRI-R, AQRIA-R, PmvAA-F, PmvAA-R y PPhPG-R
AAQRI-F	No hay	1	GAAQR-F, AQRIA-F, GAAQR-R, AAQRI-R, AQRIA-R y PmvAA-F
AQRIA-F	No hay	No hay	GAAQR-F, AAQRI-F, GAAQR-R, AAQRI-R, AQRIA-R, PmvAA-R, AWLIa-R y WLIaA-R
iGFGA-R	No hay	No hay	iGFGA-F y mvAAI-F
GAAQR-R	No hay	2	iGFGA-F, GAAQR-F, AAQRI-F, AQRIA-F, AAQRI-R, FYEVa-F, YEVaF-F y PmvAA-F
AAQRI-R	No hay	No hay	iGFGA-F, GAAQR-F, AAQRI-F, AQRIA-F y GAAQR-R
AQRIA-R	No hay	No hay	iGFGA-F, GAAQR-F, AAQRI-F, AQRIA-F, FYEVa-R, AWLIa-F, GGAFK-R y MVLAT-F
FYEVa-F	No hay	No hay	GAAQR-R, FYEVa-R, YEVaF-R y WLIaA-R
YEVaF-F	No hay	No hay	GAAQR-R, FYEVa-R, YEVaF-R, GGAFK-R, GAFKq-R y WLIaA-R
PmvAA-R	No hay	No hay	iGFGA-F, GAAQR-F, AQRIA-F, PmvAA-F, mvAAI-F, GGAFK-F, AWLIa-F y WLIaA-F
mvAAI-R	No hay	No hay	PmvAA-F, mvAAI-F, PPhPG-F, GGAFK-F, LMVLA-F y MVLAT-F
PPhPG-R	No hay	1	GAAQR-F, PPhPG-F, PhPGP-F, hPGPT-F, PGPTA-F, PhPGP-R, hPGPT-R, PGPTA-R y GGAFK-R

PhPGP-R	No hay	1	PPhPG-F, PhPGP-F, hPGPT-F, PGPTA-F, PPhPG-R, hPGPT-R y PGPTA-R
hPGPT-R	No hay	1	PPhPG-F, hPGPT-F, PGPTA-F, PPhPG-R, PhPGP-R, PGPTA-R y VNDAg-F
PGPTA-R	No hay	No hay	mvAAI-F, PhPGP-F, hPGPT-F, PGPTA-F, PPhPG-R, PhPGP-R y hPGPT-R
GGAFK-F	No hay	No hay	hPGPT-F, PGPTA-F, FYEVa-R, YEVaF-R, PmvAA-R, mvAAI-R, mIII-R, ILLi-R, GGAFK-R, GAFKq-R y AFKqV-R
GAFKq-F	No hay	No hay	YEVaF-R, mIII-R, ILLi-R, GGAFK-R, GAFKq-R, AFKqV-R y FKqVI-R
AFKqV-F	No hay	No hay	GGAFK-R, GAFKq-R, AFKqV-R y FKqVI-R
FKqVI-F	No hay	No hay	GGAFK-R, GAFKq-R, AFKqV-R y FKqVI-R
LilAW-F	No hay	No hay	FYEVa-R, mIII-R, ILLi-R y ilAWL-R
ilAWL-F	No hay	No hay	mIII-R, ILLi-R, ilAWL-R, AWLIa-R y MVLAT-R
lAWLI-F	No hay	No hay	mIII-R, ilAWL-R, AWLIa-R, WLIaA-R y MVLAT-R
AWLIa-F	No hay	No hay	AQRIA-R, FYEVa-R, PmvAA-R, ilAWL-R, AWLIa-R y WLIaA-R
WLIaA-F	No hay	No hay	FYEVa-R, PmvAA-R, ilAWL-R, AWLIa-R y WLIaA-R
mIII-R	No hay	No hay	GGAFK-F, GAFKq-F, LilAW-F, ilAWL-F y lAWLI-F
ILLi-R	No hay	No hay	GGAFK-F, GAFKq-F, LilAW-F y ilAWL-F
GGAFK-R	No hay	No hay	AQRIA-R, YEVaF-F, mvAAI-F, PPhPG-R, GGAFK-F, GAFKq-F, AFKqV-F y FKqVI-F
GAFKq-R	No hay	No hay	YEVaF-F, mvAAI-F, GGAFK-F, GAFKq-F, AFKqV-F y FKqVI-F
AFKqV-R	No hay	No hay	LGKLM-F, GGAFK-F, GAFKq-F, AFKqV-F y FKqVI-F
FKqVI-R	No hay	No hay	GAFKq-F, AFKqV-F y FKqVI-F

iAWL-R	No hay	No hay	LilAW-F, iAWL-F, lAWLI-F, AWLIa-F, WLIaA-F y MVLAT-F
AWLIa-R	No hay	No hay	AQRIA-F, PmvAA-F, iAWL-F, lAWLI-F, AWLIa-F y WLIaA-F
WLIaA-R	No hay	No hay	AQRIA-F, YEVaF-F, PmvAA-F, mvAAI-F, lAWLI-F, AWLIa-F y WLIaA-F
LMVLA-F	No hay	No hay	mvAAI-R y MVLAT-R
MVLAT-F	No hay	1	AQRIA-R, mvAAI-R, iAWL-R y MVLAT-R
sHVND-F	No hay	No hay	MVLAT-R
HVNDA-F	No hay	No hay	MVLAT-R
VNDag-F	No hay	No hay	FYEVa-R, YEVaF-R, hPGPT-R y MVLAT-R
MVLAT-R	No hay	1	PmvAA-F, PGPTA-F, iAWL-F, lAWLI-F, LMVLA-F, MVLAT-F, sHVND-F, HVNDA-F y VNDag-F

12.2.3. BLASTn de oligonucleótidos iniciadores degenerados seleccionados

En las Tablas 12.3, 12.4, 12.5, 12.6 y 12.7 se muestran los resultados del BLASTn realizado para cada oligonucleótido iniciador degenerado seleccionado. Estos resultados se utilizaron para su selección.

Tabla 12.3: Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado PPHP-F. Los resultados se obtuvieron de las diferentes permutaciones que se pueden obtener de este oligonucleótido iniciador degenerado. Estos fueron los resultados que presentaron un Valor E debajo de 4.

Bacteria	Valor E	% Identidad	Gram
<i>Escherichia fergusonii</i> HNC11W	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> 3057	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> 2013c-4282	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> 89-3506	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> RHB08-C20	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> RHB08-C16	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia fergusonii</i> RHB23-C01	0.004	100.00 %	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.017	100.00 %	Negativo
<i>Chanos chanos</i>	0.27	100.00 %	Ninguno
<i>Desulfovibrio carbinolicus</i>	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Yersinia aldovae</i>	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Ewingella americana</i>	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> 1517k	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> CE1628	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> CE1803A	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Escherichia coli</i> WP2-W18-ESBL-08	0.27	100.00 %	Negativo

Tabla 12.4: Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado FKEY-R. Los resultados se obtuvieron de las diferentes permutaciones que se pueden obtener de este oligonucleótido iniciador degenerado. Estos fueron los resultados que presentaron un Valor E debajo de 4.

Bacteria	Valor E	% Identidad	Gram
<i>Streptomyces</i> sp. CC0208	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces</i> sp. CRXT-G-22	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces chartreusis</i> ATCC 14922	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces cuaneochromognes</i> MK-45	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces lincolnesis</i> LC-G	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces lincolnesis</i> NRRL 2936	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces lincolnesis</i> B48	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces chartreusis</i> NA02069	0.009	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces hawaiiensis</i> ATCC 12236	0.035	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces</i> sp. MOE7	0.035	100.00 %	Positivo
<i>Streptomyces lydicus</i> GS93	0.035	100.00 %	Positivo
<i>Kocuria</i> sp. TGY1120	0.035	100.00 %	Positivo
<i>Pseudomonas</i> sp. TUM18999	0.035	100.00 %	Negativo
<i>Streptomyces lydicus</i> 103	0.035	100.00 %	Positivo
<i>Pseudoxanthomonas swonensis</i> 11-1	0.035	96.30 %	Negativo
<i>Runella</i> sp.	0.14	96.15 %	Negativo
<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	0.14	96.15 %	Negativo
<i>Bacillus pumillus</i> SF-4	0.54	96.00 %	Positivo
<i>Citrobacter</i> sp. RHB21-C01	0.54	100.00 %	Negativo
<i>Citrobacter</i> sp. RHB21-C05	0.54	100.00 %	Negativo
<i>Scleropages formosus</i>	0.54	100.00 %	Ninguna
<i>Bacillus pumillus</i> 150a	0.54	96.00 %	Positivo
<i>Bacillus pumillus</i> SAFR-032	0.54	96.00 %	Positivo
<i>Bacillus pumillus</i> SH-B9	0.54	100.00 %	Positivo

Tabla 12.5: Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado AQR1A-F. Los resultados se obtuvieron de las diferentes permutaciones que se pueden obtener de este oligonucleótido iniciador degenerado. Estos fueron los resultados que presentaron un Valor E debajo de 4.

Bacteria	Valor E	% identidad	Gram
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UTI-045	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UTI-050	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UTI-058y	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UTI-056	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UTI-042y	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UTI-035	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 1A	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subesp. saprophyticus ATCC 15305	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subesp. saprophyticus NCTC766	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 883	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> FDAARGOS_55	0.27	100.00 %	Positivo

<i>Staphylococcus saprophyticus</i> FDAARGOS_36	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> FDAARGOS_68	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> FDAARGOS_37	0.27	100.00 %	Positivo
<i>Pantoea dispersa</i> BJQ007	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Staphylococcus arlettae</i> P2	1.1	100.00 %	Positivo
<i>Coccomyxa subellipsoligonucleótidos</i> <i>iniciadores degeneradosea</i> C-169	1.1	100.00 %	Ninguno
<i>Nibrubacter</i> sp. BT10	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas marincola</i> YSy11	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Sodalis glossinidiys</i> 'morsitans' B4	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Sodalis glossinidiys</i> 'morsitans'	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Yokenella regensburgei</i> W13	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Corynebacterium</i> sp. LMM-1652	1.1	100.00 %	Positivo

Tabla 12.6: Resultados de uso de BLASTn para oligonucleótido iniciador degenerado mIII-R. Los resultados se obtuvieron de las diferentes permutaciones que se pueden obtener de este oligonucleótido iniciador degenerado. Estos fueron los resultados que presentaron un Valor E debajo de 4.

Bacteria	Valor E	% Identidad	Gram
<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. lactilytica TAM6421	0.41	100.00 %	Positivo
<i>Microbulbifer aggregans</i> CCB-MM1	0.41	100.00 %	Negativo
<i>Aeromonas media</i> WS	0.41	100.00 %	Negativo
<i>Pandoravirus macleodensis</i>	1.6	100.00 %	Ninguno
<i>Alteromonas</i> sp. MB-3u-76	1.6	100.00 %	Negativo
<i>Alteromonas</i> sp. RW2A1	1.6	100.00 %	Negativo
<i>Thalassotalea crassostreae</i> LPB0090	1.6	100.00 %	Negativo
<i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1	1.6	100.00 %	Ninguno

Tabla 12.7: Resultados de uso de BLASTh para oligonucleótido iniciador degenerado IIII-R. Los resultados se obtuvieron de las diferentes permutaciones que se pueden obtener de este oligonucleótido iniciador degenerado. Estos fueron los resultados que presentaron un Valor E debajo de 4.

Bacteria	Valor E	% Identidad	Gram
<i>Alteromonas</i> sp. MB-3u-76	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Alteromonas</i> sp. RW2A1	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas</i> sp. LPH1	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Enterobacter lignolyticus</i> G5	0.27	96.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas mendocina</i> S5.2	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas</i> sp. phDV1	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas mendocina</i> NCTC 10897	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> JAB1	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas sihuiensis</i> KCTC 32346	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Mucilaginibacter gotjawli</i>	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas</i> sp. MSPm1	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Enterobacter lignolyticus</i> SCF1	0.27	96.00 %	Negativo
<i>Geothallobacter subterraneus</i> Red1	0.27	100.00 %	Negativo
<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. lactilytica TAM6421	1.1	100.00 %	Positivo
<i>Alcaligenes faecalis</i> AN70	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Nocardia mangyaensis</i> Y48	1.1	100.00 %	Positivo
<i>Brevundimonas</i> sp. MF30-B	1.1	100.00 %	Negativo
<i>Calothrix</i> sp. NIES-4105	1.1	95.83 %	Ninguno
<i>Calothrix</i> sp. NIES-4071	1.1	95.83 %	Ninguno

12.3. Proteínas utilizadas para los alineamientos

En las Tablas 12.9 y 12.11 se muestran el número de referencia de NCBI para las secuencias utilizadas para realizar los alineamientos de bacterias Gram negativo y Gram positivo.

Tabla 12.9: Proteínas utilizadas en los alineamientos de bacterias Gram negativo realizados en esta investigación.

Referencia NCBI	Bacteria
QDZ65388.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica
ACX41337.1	<i>Escherichia coli</i> DH1
BBG71598.1	<i>Serratia marcescens</i>
WP_013668311.1	Sphingobacteriaceae
WP_014219883.1	<i>Niastella koreensis</i>
WP_023455790.1	<i>Asticcacaulis</i> sp. AC460
GFE79952.1	<i>Steroligonucleótidos iniciadores degeneradosobacter</i> sp. YU21-B
GDX44587.1	<i>Bacteroligonucleótidos iniciadores degeneradosetes bacterium</i>
WP_013536567.1	<i>Pseudozanthomonas suwonensis</i>
WP_023449754.1	<i>Asticcacaulis</i> sp. AC402
GET22464.1	<i>Prolixibacter denitrificans</i>
GEP95916.1	<i>Chitinophaga cymbidii</i>
BBS12301.1	<i>Klebsiella aerogenes</i>
WP_007370289.1	<i>Kosakonia</i>
GEM69141.1	<i>Sphingobacterium mizutaii</i> NBRC 14946 = DSM 11724
WP_009088798.1	<i>Elizabethkingia anophelis</i>
GFE90078.1	<i>Steroligonucleótidos iniciadores degeneradosobacter</i> sp. SA29-B
WP_019397918.1	unclassified <i>Pseudozanthomonas</i>
GET34707.1	<i>Prolixibacter bellariivorans</i>
GDX43177.1	<i>Bacteroligonucleótidos iniciadores degeneradosetes bacterium</i>

Tabla 12.11: Proteínas utilizadas en los alineamientos de bacterias Gram positivo realizados en esta investigación.

Referencia NCBI	Bacteria
GDY50601.1	<i>Streptomyces violaceusniger</i>
WP_008355563.1	<i>Bacillus</i>
GEQ03359.1	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. urealyticus
GEP86052.1	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. cohnii
BBK27080.1	<i>Staphylococcus arlettae</i>
GEK02156.1	<i>Streptomyces</i> sp. 1-11
WP_017368345.1	<i>Bacillus altitudinis</i>
GCD09929.1	<i>Clostridium taghuense</i>
WP_010237460.1	<i>Clostridium arbusti</i>
WP_010011396.1	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
WP_003706916.1	<i>Lactobacillus</i>
WP_008405615.1	<i>Solibacillus</i>
WP_002506542.1	<i>Staphylococcus</i>
WP_022866347.1	<i>Actinotignum urinale</i>
WP_014822668.1	<i>Solibacillus silvestris</i>
WP_013237825.1	<i>Clostridium</i>
WP_003214671.1	<i>Bacillus pumilus</i>
WP_008214089.1	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>
NP_624936.1	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
ADU52103.1	<i>Thermaerobacter marianensis</i> DSM 12885

12.4. Código BasesN

El programa fue hecho por Juan Pablo Pira utilizando Free Pascal.

```
program BasesN;
uses Crt, Sysutils;
var
  Linea1:STRING; {Linea que dice Forward}
  Linea2:STRING; {Linea que dice Reverse}
  entrada:STRING;
  Forward: TextFile;
  Reverse: TextFile;
  TemporalF:textFile;
  TemporalR: TextFile;
  i, j : Integer;
  Longitud1, Longitud2: Integer;
  Mascara1, Mascara2: ARRAY[1..255] of Integer;
  Total1, Total2: Integer;
  Alteracion: Integer;
  cambio1, cambio2: Integer;
  conteo1, conteo2: Integer;
  letra: char;
  W, S, M, K, R, Y, B, D, H, V, N: array [1..4] of char;

BEGIN
{ Preparamos las bases y las letras que codifican para cosas que no son bases }
  W[1]:= 'A';
  W[2]:= 'T';
  S[1]:= 'C';
  S[2]:= 'G';
  M[1]:= 'A';
  M[2]:= 'C';
  K[1]:= 'G';
  K[2]:= 'T';
  R[1]:= 'A';
  R[2]:= 'G';
  Y[1]:= 'C';
  Y[2]:= 'T';
  B[1]:= 'C';
  B[2]:= 'G';
  B[3]:= 'T';
  D[1]:= 'A';
  D[2]:= 'G';
  D[3]:= 'T';
  H[1]:= 'A';
  H[2]:= 'C';
  H[3]:= 'T';
  V[1]:= 'A';
  V[2]:= 'C';
  V[3]:= 'G';
  N[1]:= 'A';
  N[2]:= 'C';
  N[3]:= 'T';
```

```
N[4]:='G';
```

{Obtenemos las dos líneas importantes. La primera es Forward y la segunda es Reverse
Después las vamos a hacer para que las lea de un archivo, por el momento las lee del teclado.}

```
ClrScr;  
writeln;  
writeln;  
writeln('Buenos días biodegradable usuario!');  
writeln;  
writeln;  
writeln('Por favor, ingrese la línea 1 -la que empieza con Forward: ');  
readln(entrada);  
Linea1:=entrada;  
writeln;  
writeln;  
writeln('Por favor, ingrese la línea 2 -la que empieza con Reverse ');  
readln(entrada);  
Linea2:=entrada;  
writeln;  
  
writeln;  
Longitud1:=length(Linea1);  
Longitud2:=length(Linea2);  
writeln('Forward: ',Linea1,' tiene un total de ',Longitud1,' bases');  
writeln('Reverse: ',Linea2,' tiene un total de ',Longitud2,' bases');  
writeln;
```

{Vamos a crear las máscaras que indican cuantas veces voy a generar una tira de bases}

```
For i:=1 to Longitud1 DO  
  Begin  
    Letra:=Linea1[i];  
    Case Letra of  
      'A': mascara1[i]:=1;  
      'C': mascara1[i]:=1;  
      'G': mascara1[i]:=1;  
      'T': mascara1[i]:=1;  
      'U': mascara1[i]:=1;  
      'W': mascara1[i]:=2;  
      'S': mascara1[i]:=2;  
      'M': mascara1[i]:=2;  
      'K': mascara1[i]:=2;  
      'R': mascara1[i]:=2;  
      'Y': mascara1[i]:=2;  
      'B': mascara1[i]:=3;  
      'D': mascara1[i]:=3;  
      'H': mascara1[i]:=3;  
      'V': mascara1[i]:=3;  
      'N': mascara1[i]:=4;  
    END;  
  END;  
  WRITELN;  
  WRITELN;
```

```

writeln('En número de diferentes expresiones para cada posición ser ');
for i:=1 to Longitud1 do
    write(mascaral[i]);
writeln;
Total1:=1;
FOR i :=1 to Longitud1 do
    Total1:= Total1*mascaral[i];
writeln;
writeln('Crearemos un total de ',Total1, ' líneas');
writeln;
conteo1:=0;
writeln;
writeln;
Assign(Forward,'Forward.txt');
Assign(TemporalF,'TemporalF.txt');
rewrite(Forward);
rewrite(TemporalF);
writeln('Hice el rewrite');
write(Forward,Lineal);
Writeln('escribi en Forward');
Reset(Forward);
writeln('reset para forward');
Repeat
    Alteracion:=0;
    while not eof(Forward) do
        Begin
            ReadLN(Forward,Lineal);
            WRITELN('LEI LA LINEA ',lineal);
            i:=0;
            cambio1:=0;
            Repeat
                i:=i+1;
                letra:=Lineal[i];
                case letra of
                    'W': begin
                        write(TemporalF,LeftStr(Lineal,i-1),'A',RightStr
(Lineal,Longitud1-i),#10);
                        write(TemporalF,LeftStr(Lineal,i-1),'T',RightStr
(Lineal,Longitud1-i),#10);
                        cambio1:=1
                    end;
                    'S': begin
                        write(TemporalF,LeftStr(Lineal,i-1),'C',RightStr
(Lineal,Longitud1-i),#10);
                        write(TemporalF,LeftStr(Lineal,i-1),'G',RightStr
(Lineal,Longitud1-i),#10);
                        cambio1:=1
                    end;
                    'M': begin
                        write(TemporalF,LeftStr(Lineal,i-1),'A',RightStr
(Lineal,Longitud1-i),#10);
                        write(TemporalF,LeftStr(Lineal,i-1),'C',RightStr
(Lineal,Longitud1-i),#10);
                        cambio1:=1
                end;
            end;
        end;
    end;

```

```

        end;
    'K': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'G',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'T',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'R': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'A',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'G',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'Y': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'C',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'T',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'B': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'C',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'G',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'T',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'D': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'A',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'G',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'T',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'H': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'A',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'C',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'T',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'V': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'A',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'C',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);

```

```

        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'G',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
    'N': begin
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'A',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'C',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'G',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        write(TemporalF,LeftStr(Linea1,i-1),'T',RightStr
(Linea1,Longitud1-i),#10);
        cambio1:=1
    end;
end;
alteracion:=alteracion+cambio1;
until (cambio1=1)OR(i=Longitud1);
if alteracion=0 then
    begin
        writeln('llegu, aqui');
        write(TemporalF,Linea1,#10);
        writeln('escribi ',Linea1)
    end
end;
End;

```

```

{ Hacemos un swapping de los archivos}
Close (TemporalF);
writeln('Voy a hacer el swapping');
Reset(TemporalF);
rewrite(Forward);
While not EOF(TemporalF) DO
    Begin
        READLN(TemporalF,Linea1);
        Write(Forward,Linea1,#10);
        Writeln('Acabo de escribir',Linea1);
    end;
Reset(Forward);
writeln('Hice el reset antes del regreso');
rewrite(TemporalF);
Until Alteracion=0;
i:=0;
writeln('Ahora voy a escribir lo que puse en el archivo');
while not EOF(Forward) DO
    BEGIN
        i:=i+1;
        READLN(Forward,Linea1);
        Writeln(I:5,' ',Linea1)
    End;

writeln('Ya leyφ');
ReadKey

```

END.

