

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Validación de dos protocolos de clonación génica para el aislamiento de fragmentos de ADN relacionados a la resistencia al glifosato y tetraciclina proveniente de bacterias aisladas de muestras de suelos guatemaltecos.

Trabajo de graduación presentado por María Cristina Bolaños Quiros, para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2012

Validación de dos protocolos de clonación génica para el aislamiento de fragmentos de ADN relacionados a la resistencia al glifosato y tetraciclina proveniente de bacterias aisladas de muestras de suelos guatemaltecos.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Validación de dos protocolos de clonación génica para el aislamiento de fragmentos de ADN relacionados a la resistencia al glifosato y tetraciclina proveniente de bacterias aisladas de muestras de suelos guatemaltecos.

Trabajo de graduación presentado por: María Cristina Bolaños Quiros, para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2012

VoBo:

Mónica Stein

Dra, Monica Stein
Asesora de Tesis

Maricruz Álvarez

Lic. Maricruz Álvarez
Asesora de tesis

Terna examinadora:

Mónica Stein

Dra, Monica Stein
Asesora de Tesis

Maricruz Álvarez

Lic. Maricruz Álvarez
Asesora de tesis

Pamela Pennington

Dra. Pamela Pennington
Directora del Departamento de bioquímica y Microbiología

Fecha de aprobación:

Guatemala 12 de Julio 2012

PREFACIO

Este trabajo de investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología, en las instalaciones del laboratorio de Microbiología y Bioquímica de la Universidad del Valle de Guatemala, como parte del proyecto de clonación de un gen de resistencia al glifosato novedoso para poder ser insertado en una planta, a manera de crear una planta transgénica resistente al glifosato. El proyecto actualmente continúa en proceso. El mismo se encuentra financiado por FODECYT (Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología) y es dirigido por la Dra. Monica Stein, quien fue la asesora también de este proyecto de investigación.

Le agradezco a Dios, por darme la oportunidad de ser uno de los pocos privilegiados en Guatemala en tener acceso a una educación superior, especialmente en tan excelente universidad y por darme la fortaleza necesaria a lo largo del camino. Le agradezco a mis papás por el apoyo incondicional, por darme también la oportunidad de estar aquí y de haber cumplido mi sueño de estudiar genética.

Muchas gracias a la Dra. Monica Stein, por sus excelentes cátedras, por su apoyo, su asesoría, por haberme dado la oportunidad de poder realizar esta investigación y mis prácticas profesionales con ella, por su paciencia, sus consejos, por haberme dado inspiración, por su excelente dedicación y constancia. Ella es la prueba que en Guatemala existen científicos con excelente preparación y ética profesional.

Muchas gracias a la Dra. Pamela Pennington, por su apoyo, excelentes consejos y constante atención al proyecto.

Gracias a la Licda. Claudia Paiz, por todo su apoyo, ayuda, asesoría y consejos. Sin ella hubiera sido difícil terminar esta investigación. Trabajar con ella fue una excelente experiencia.

Le agradezco al Laboratorio de Protección Vegetal, en especial a la Licda. Margarita Palmieri, el Lic. Andrés Avalos y la Licda. Elena Dardón. Gracias por prestarme sus instalaciones , de vez en cuando, para poder realizar esta investigación. Gracias por los consejos, la asesoría y el tiempo dedicado a mis dudas y preguntas.

Gracias a los maestros que me inspiraron, con su dedicación en sus cátedras, su constante entusiasmo y su tiempo para resolver dudas sin importar el lugar o el momento. También son prueba que en Guatemala existen profesionales dispuestos a hacer el cambio.

Finalmente, quiero agradecer a mis compañeros de clase y a mis amigos. Sin ellos mi paso por la universidad no hubiera sido el mismo. Gracias por todos los buenos momentos, por el apoyo, la paciencia, los favores y por darme la fuerza para seguir adelante. Me siento muy contenta de haber conocido a tan excelentes personas.

CONTENIDO

PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes	3
B. Justificación	26
C. Objetivos	27
II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
A. Métodos	28
B. Diseño experimental	46
III. RESULTADOS	59
IV. DISCUSIÓN	84
V. CONCLUSIONES	101
VI. RECOMENDACIONES	103
VII. LITERATURA CITADA	105
VIII. APENDICE	111

LISTA DE CUADROS

Título	Página
Cuadro 1 Cultivos transgénicos resistentes al glifosato que han sido deregulados en los Estados Unidos.....	7
Cuadro 2 Cultivos bacterianos realizados y resultados esperados.....	37
Cuadro 3 Cuantificación de ADN genómico extraído por primera vez con kit	49
Cuadro 4 Cuantificación de ADN genómico extraído por el método de Trizol.....	50
Cuadro 5 Cuantificación de ADN genómico extraído por el método de cloroformo:alcohol isoamílico.....	51
Cuadro 6 Cuantificación de ADN genómico extraído por el método de kit optimizado.....	52
Cuadro 7 Cobertura del genoma en las bibliotecas genómicas generadas con las enzimas PstI y HindIII para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina utilizando la relación vector:inserto 1:1.....	56
Cuadro 8 Cobertura del genoma en las bibliotecas genómicas generadas con las enzimas PstI y HindIII para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato utilizando la relación vector:inserto 1:1.....	59
Cuadro 9 Cobertura del genoma de la muestra en las bibliotecas genómicas generadas con la enzima PstI utilizando la relación vector:inserto 1:1.....	61
Cuadro 10 CMI y valor p del clon Glifo1 calculado por el método de Kaplan Meier.....	63
Cuadro 11 CMI y valor p del clon Glifo2 calculado por el método de Kaplan Meier.....	66
Cuadro 12 Análisis en BLAST de la secuencia de los insertos que confieren resistencia a tetraciclina y glifosato.....	70
Cuadro 13 Análisis en BLAST de la secuencia de consenso.....	71

Cuadro 14 Secuencia de los cebadores degenerados diseñados para la amplificación del gen parcial de resistencia al glifosato	72
Cuadro 15 Análisis en BLAST de la secuencia de los insertos.....	78
Cuadro 16 Genes 6 kb antes y 6 kb después de las secuencias dadas por los cebadores M13F y M13R.....	96
Cuadro 17 Cuantificación de ADN digerido por las enzimas PstI y Hind III luego de la purificación del mismo.....	111
Cuadro 18 Conteo de colonias de la biblioteca genómica y porcentaje de cobertura del genoma.....	119
Cuadro 19 Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de <i>E.coli</i> DH5 α	120
Cuadro 20 Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de Mx3.....	120
Cuadro 21 Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de Glifo1	121
Cuadro 22 Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de Glifo 2.....	121
Cuadro 23 Cuantificación del plásmido pUC19 con inserto extraído de los clones Tet1, Tet2, Glifo1 y Glifo2.....	126
Cuadro 24 Número de accesoión según NCBI de los genes utilizados para el diseño de los cebadores degenerados.....	144
Cuadro 25 Código de los cebadores degenerados.....	149
Cuadro 26 Estudio de Iso cebadores diseñados por medio del programa CLC.....	150

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1 Molécula de glifosato.....	3
Figura 2 Ruta shikímica y lugar de inhibición del glifosato.....	4
Figura 3 Dominios de los transportadores ABC y fusión de los dominios.....	15
Figura 4 Transportador ABC y proteína de unión periplásmica.....	18
Figura 5 Pasos a seguir para crear una biblioteca genómica.....	20
Figura 6 Transformación de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
Figura 7 Diagrama de flujo del procedimiento de la metodología	28
Figura 8 Plásmido pUC19	33
Figura 9 Bibliotecas genómicas realizadas.....	38
Figura 10 Plásmido pCR 2.1	44
Figura 11 ADN genómico extraído con kit de la muestra.....	53
Figura 12 Digestión parcial del ADN genómico de la muestra con las enzimas PstI y Hind III.....	54
Figura 13 Plásmido pUC19 sin digerir y digerido con PstI y Hind III.....	55
Figura 14 Clon de resistencia a tetraciclina Tet1	57
Figura 15 Clon de resistencia a tetraciclina Tet2	58
Figura 16 Comparación de las diferentes cepas creciendo bajo selección en tetraciclina.....	59
Figura 17 Clones resistentes a glifosato Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo4 y Glifo5.....	60
Figura 18 Clones G1 a G25 resistentes a 25 mM glifosato.....	62
Figura 19 Gráfica del promedio de la curva de crecimiento de Glifo1 en escala logarítmica comparado con los controles.....	63

Figura 20 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo1 comparado con <i>E.coli</i> DH5 α	64
Figura 21 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo1 comparado con Mx3.....	65
Figura 22 Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de Glifo2 en escala logarítmica comparado con los controles.....	66
Figura 23 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo2 comparado con <i>E.coli</i> DH5 α	67
Figura 24 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo2 comparado con Mx3.....	68
Figura 25 Plásmido pUC19 sin inserto y plásmido pUC19 con los insertos que confieren resistencia a tetraciclina y resistencia a glifosato.....	69
Figura 26 Productos de la PCR con cebadores degenerados destinados para la amplificación el gen de resistencia al glifosato.....	73
Figura 27 Clones PCRG con inserto.....	74
Figura 28 Clones PCRG3, PCRG13, PCRG36, PCRG52, PCRG69, PCRG80, PCRG87, PCRG91, PCRG100.....	75
Figura 29 Plásmido con inserto de los clones PCRG3, PCRG13, PCRG36, PCRG52, PCRG69, PCRG80.....	76
Figura 30 Plásmido con inserto de los clones PCRG87, PCRG91, PCRG100.....	77
Figura 31 Gen EPSPS amplificado parcialmente por los cebadores degenerados diseñados, secuenciado con el cebador M13F.....	80
Figura 32 Gen EPSPS amplificado parcialmente por los cebadores degenerados diseñados, secuenciado con el cebador M13R.....	81
Figura 33 Secuencia del contig de as enzimas EPSPS de <i>Serratia</i> sp. AS13, AS12 y AS9.....	81
Figura 34 Lugar en el cual se unen los cebadores degenerados en relación al contig y a la secuencia de <i>Serratia</i> sp.....	82

Figura 35 Sitio de corte de las enzimas PstI y Hind III.....	88
Figura 36 Lugar en el genoma de <i>Serratia sp.</i> en donde se encuentra el gen del transportador de electrones clonado, secuenciado con el cebador M13.....	95
Figura 37 Lugar en el genoma de <i>Serratia sp.</i> en donde se encuentra el gen del transportador ATPasa clonado, secuenciado con el cebador M13R.....	95
Figura 38 Biblioteca genómica generada con PstI para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina	114
Figura 39 Biblioteca genómica generada con Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina	115
Figura 40 Comparación de la biblioteca genómica generada con PstI y la generada con Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina.....	116
Figura 41 Biblioteca genómica generada con PstI para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato	117
Figura 42 Biblioteca genómica generada con Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato	117
Figura 43 Comparación de la biblioteca genómica generada con PstI y la generada con Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato.....	118
Figura 44 Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de Glifo1 y Glifo2 en escala logarítmica comparado con los controles.....	122
Figura 45 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo1 y Glifo2 comparado con <i>E.coli</i> DH5 α y Mx3.....	123
Figura 46 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo1 comparado con <i>E.coli</i> DH5 α y Mx3.....	124
Figura 47 Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo2 comparado con <i>E.coli</i> DH5 α y Mx3.....	125
Figura 48 Arbol filogenético de los genes EPSPS encontrados y grupos de genes pertenecientes a las Enterobacterias.....	143
Figura 49 Alineación de los genes EPSPS utilizados para el diseño	

de cebadores degenerados.....	144
Figura 50 Alineación de la secuencia de aminoácidos de los genes EPSPS utilizados para el diseño de cebadores degenerados.....	148
Figura 51 Visualización de los productos de la primera prueba de PCR utilizando los cebadores degenerados.....	153
Figura 52 Tamizaje de la transformación de <i>E.coli</i> DH5 α con el vector pCR2.1 con inserto del producto del PCR degenerado.....	154
Figura 53 Colonias blancas PCRG inoculadas en Xgal/kanamicina y en glifosato 25 mM.....	154
Figura 54 Crecimiento de la muestra <i>Serratia marcescens</i> en tetraciclina	155
Figura 55 Caracterización de la muestra <i>Serratia marcescens</i> en diferentes antibióticos.....	155

RESUMEN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro utilizado para tratar malezas en los diferentes cultivos agronómicos. El mismo, inhibe la enzima enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa, EPSPS por sus siglas en inglés. Por ser un herbicida de baja toxicidad y de excelente funcionamiento, es el herbicida de mayor demanda a nivel mundial. Gracias a herramientas genéticas, se ha podido producir cultivos transgénicos resistentes al glifosato, permitiendo la aplicación de glifosato a campos agrícolas para remover las malezas sin dañar al cultivo de interés. El objetivo de este estudio fue el aislamiento de un gen responsable de la resistencia al glifosato por medio de la implementación de dos protocolos de clonación génica y la clonación de un gen de resistencia al antibiótico tetraciclina por uno de los métodos. Para esto se utilizó una cepa *Serratia marcescens* resistente a 75 mM glifosato y también resistente a 1.2 μ M tetraciclina, nombrada como Mx3 (Richter 2011). Para el aislamiento del gen, se utilizaron dos protocolos de clonación génica: método de biblioteca genómica y método de cebadores degenerados. Se logró la clonación de un elemento que confiere resistencia a tetraciclina por el método de biblioteca genómica utilizando la enzima PstI para la digestión parcial de ADN. Se logró la clonación parcial del elemento que confería resistencia a glifosato, por el método de biblioteca genómica utilizando también la enzima PstI para generarla. Las secuencias parciales de los elementos que confieren resistencia no permiten concluir sobre la identidad del inserto que confiere resistencia al glifosato, por lo que se debe repetir, pero sí permitieron identificar un posible transportador que puede ser responsable de la resistencia a la tetraciclina.

I. INTRODUCCIÓN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro y a su vez seguro en cuanto a su manejo, toxicidad y protección del medio ambiente. Desde su introducción comercial en 1974 es el herbicida de preferencia alrededor del mundo. Se transloca de manera adecuada y su acción es lenta, lo cual es una característica que se puede aprovechar para monitorear la acción del herbicida en los cultivos. El glifosato es el único herbicida que ataca la enzima 3-fosfato Enolpiruvilshikimato Sintasa (EPSPS por sus siglas en inglés) y no existe ningún herbicida análogo a éste o que pueda competir con él. El glifosato es un herbicida benigno al medio ambiente, contrario a algunos herbicidas presentes en el mercado, ya que posee una vida media ambiental bastante corta y, se une firmemente a los suelos, evitando el movimiento hacia adentro de los mismos y hacia las aguas subterráneas. Es no volátil y por esto no contribuye a la contaminación atmosférica. Además, la molécula de glifosato en sí no posee efectos en los organismos que no están destinados a ser atacados, es decir, no daña especies secundarias, con la excepción de algunos hongos (Duke 2008).

El aspecto más importante del éxito que presenta el uso del glifosato ha sido la introducción de cultivos transgénicos en 1996. De esta manera se puede aplicar el herbicida en los surcos sin dañar el cultivo de interés. Casi el 90% de los cultivos transgénicos que se encuentran alrededor del mundo son resistentes al glifosato y la adopción de estos cultivos alrededor del mundo está aumentando a un paso rápido debido a que esta tecnología provee beneficios medio ambientales y otros beneficios sobre las tecnologías que lo podrían reemplazar (Duke 2008).

Dentro de los beneficios se puede mencionar la contribución de los cultivos biotecnológicos a la seguridad alimentaria. En los últimos años se ha registrado un incremento de la producción agrícola valorado en 78,000 millones de dólares (1996-2010). Los cultivos biotecnológicos han contribuido a la lucha contra la pobreza ayudando a 14 millones de pequeños agricultores alrededor del mundo. Además, el medio ambiente se ha beneficiado ya que se han ahorrado 443 millones de kg de principios activos en plaguicidas. En el 2010 se redujeron las emisiones de dióxido de carbono

(CO₂) en 19,000 millones de kg. Esto equivale a retirar 9 millones de vehículos que circulan en las carreteras. También, los cultivos biotecnológicos han favorecido a la biodiversidad ya que gracias a ellos se han conservado 91 millones de hectáreas de suelo (James 2011).

Se pueden encontrar bacterias con genes de resistencia al glifosato, en sus diferentes formas, en muestras de suelos donde se aplica este herbicida (Jin *et al.* 2008). Estas bacterias se pueden aislar de las muestras, probar su resistencia, clonar el gen e identificarlo por medio de secuenciación (Yi *et al.* 2007). El gen, además, puede ser insertado en otra bacteria o en plantas, en un proceso llamado transformación, generando así organismos resistentes al herbicida que antes no poseían esa resistencia a manera de aislarlo y luego poder secuenciarlo (Chaoyang *et al.* 2008).

En Guatemala, este tipo de tecnología no se encuentra accesible a todo público debido a que la forma comercial del gen de resistencia al glifosato se encuentra patentada por la compañía Monsanto (Monsanto 2005). El precio de acceso a la tecnología es bastante elevado debido a esta patente y puesto que en Guatemala el sector agrícola representa un alto porcentaje de los ingresos al país, es importante contar con acceso a dicha tecnología.

El proyecto consta de tres fases. En la primera se ha logrado aislar las bacterias, demostrar que las bacterias encontradas son resistentes al glifosato y caracterizarlas morfológica y molecularmente. La segunda fase consiste en clonar ese gen y comparar su secuencia a las secuencias patentadas a manera de encontrar uno con una secuencia diferente. La tercera fase consiste en, con el mismo gen, la transformación de una planta no resistente para que posea resistencia.

La culminación de este proyecto podría ser uno de los pasos que ayudaría a que en Guatemala puedan existir otras alternativas para la utilización de la biotecnología aplicada a la agricultura.

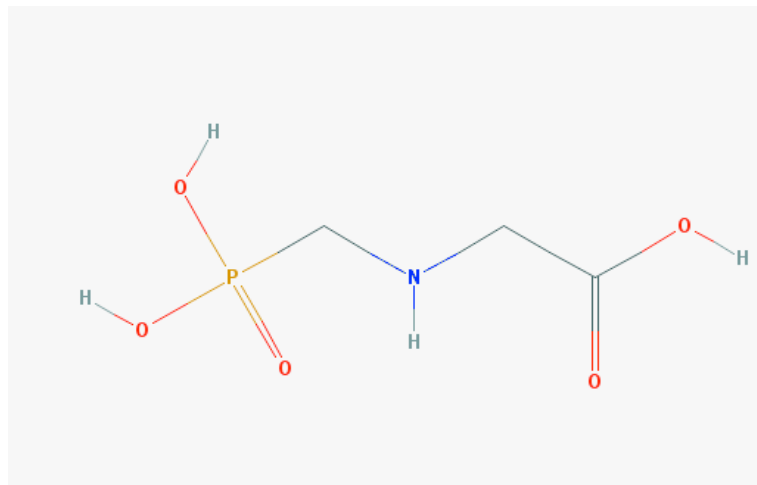
Como parte de este esfuerzo, es necesario establecer la metodología para la clonación de genes que confieren resistencia a antibióticos y otros compuestos a bacterias de suelo. En este trabajo se optimizó la técnica de clonación de genes bacteriales a través del uso de cebadores degenerados y de la generación y tamizaje de bibliotecas genómicas, utilizando una cepa aislada del campo con resistencia al herbicida glifosato y resistente al antibiótico tetraciclina.

A. Antecedentes

1. Glifosato

a. Generalidades e historia del herbicida. El glifosato es el ingrediente activo en el herbicida Roundup® y en muchas otras marcas de herbicida que controlan un amplio espectro de especies de plantas. Este ataca una enzima que se encuentra presente únicamente en plantas y en ciertas bacterias y hongos (Dill 2005). El glifosato es aniónico a pH fisiológico y es activo como sal con varios cationes (Duke 2008). Es por esto que posee un perfil toxicológico y ambiental excelente. Sin embargo, en su aplicación destruye las especies de plantas que se encuentran cultivadas. Es por esto que hoy en día la resistencia al glifosato se ha introducido en especies cultivadas (Dill 2005).

Figura 1. Molécula del glifosato



(Fuente: NCBI 2011)

Henry Martin fue el primer científico en sintetizar la molécula de glifosato en una compañía farmacéutica suiza llamada Cilag. El glifosato nunca fue probado o patentado para su uso como herbicida hasta en 1970 cuando la compañía Monsanto lo sintetizó y probó sus propiedades herbicidas. En 1974 el glifosato ingresó al mercado de los herbicidas como un herbicida no selectivo y su popularidad aumentó por muchas de las razones que serán detalladas a continuación (Duke 2008). Actualmente la patente del herbicida glifosato ha expirado y éste se puede obtener de forma genérica (Monsanto 2005).

b. Mecanismo de acción del glifosato. El mecanismo de acción del glifosato es una de las características por las cuales es uno de los herbicidas de mayor demanda. El glifosato inhibe la enzima 3-fosfato Enolpiruvilshikimato sintasa (EPSPS por sus siglas en inglés). Esta enzima cataliza la transferencia de la parte enolpiruvato de la molécula fosfoenolpiruvato (PEP por sus siglas en inglés) al compuesto 3-fosfato shikimato (S3P) (Pollegioni *et al* 2011). Este es un paso clave en la síntesis de los aminoácidos aromáticos y en rutas más elaboradas de hormonas y otros metabolitos de las plantas como lo son los flavonoides y otros compuesto fenólicos (Dill 2005). A continuación se muestra la ruta shikímica y el lugar donde el glifosato actúa en ella:

Figura 2. Ruta shikímica y lugar de inhibición del glifosato.



(Fuente: Duke 2008).

El sitio activo de la enzima EPSPS en plantas desarrolladas es altamente conservado. El glifosato compite con PEP por el sitio de unión en la EPSPS, pero no es competitivo con respecto a S3P y esto resulta en un complejo glifosato:EPSPS:S3P que es bastante estable (Yong-Sheng *et al* 2010), tiene una tasa de reversión bastante baja y corta la ruta metabólica en la enzima EPSPS (Dill 2005). No se tiene claro cómo la inhibición de la ruta de shikimato hace que las plantas mueran. Se cree que la inhibición de esta ruta resulta en escasez de fuentes de carbono para otras rutas metabólicas esenciales además de la no formación de los metabolitos y aminoácidos mencionados anteriormente (Duke 2008).

El glifosato es un herbicida único e ideal debido a que es el único compuesto que se ha podido encontrar como un excelente inhibidor de EPSPS, sin análogos o clases químicas alternativas comercializadas que puedan atacar a esta enzima. (Dill, 2005). Una de las principales razones por las cuales el glifosato posee una excelente eficacia es su buena recepción a los sitios de crecimiento de la planta y su modo de acción lento. El glifosato se absorbe rápidamente en la superficie de la planta y se cree que éste se transporta por medio de difusión, a través de la cutícula. Luego, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, éste es translocado desde las hojas hacia los otros tejidos de la planta, como los meristemos, raíces en crecimiento y otros órganos y tejidos activos, por medio de la vía del floema (Duke 2008).

c. Toxicología y perfil medio ambiental del glifosato. En general, el glifosato es un herbicida benigno al medio ambiente. Tiene poco movimiento a hacia adentro de los suelos y aguas subterráneas ya que se une firmemente a los constituyentes del suelo. Además posee una vida ambiental corta gracias a la degradación de microorganismos del suelo del mismo y es no volátil por lo que no contamina la atmósfera (Duke 2008). En concentraciones comerciales, la molécula de glifosato por sí sola no es tóxica a animales ni humanos ya que no poseen ruta del shikimato (Pollegioni *et al* 2001)

El glifosato se utiliza en control de malezas, tanto en áreas recreacionales como en cultivos industriales. Es menos tóxico que químicos comunes como el cloruro de sodio o la aspirina y no es una toxina reproductiva o carcinógena ni tiene alguna toxicidad crónica aguda. Utilizando el mismo, acorde con las instrucciones, no debería de presentar riesgos a la salud humana (Duke 2008).

Se intentaron varios métodos de ingeniería genética y de biotecnología para poder producir cultivos con resistencia genética al glifosato hasta que en *Agrobacterium* sp. se encontró el gen CP4 que codificaba una forma de la enzima EPSPS. Cuando este gen CP4 se une con un promotor y se coloca en ciertos cultivos, se puede observar que los cultivos expresan altos niveles de resistencia al glifosato (Duke 2008). Existen otros métodos para desarrollar enzimas o rutas de resistencia al glifosato. como genes que codifican otras formas de la enzima EPSP, mutagénesis dirigida, evolución selectiva o tamizajes microbianos y se proponen en algún futuro enzimas de detoxificación de glifosato. Hasta el día de hoy el CP4 es el gen responsable de la resistencia al glifosato en la mayoría de cultivos comerciales (Pollegioni *et al* 2001).

d. Utilización de cultivos transgénicos resistentes al glifosato. En Estados Unidos, la comunidad agrícola ha aprobado seis cultivos agronómicos que son resistentes al glifosato por medio de mejoramiento genético. Solamente cuatro de estos cultivos: soya, algodón, maíz y canola, están siendo cultivados en estos días (Dill 2005). El 90% de la soya cultivada en Estados Unidos es resistente a glifosato, al igual que el 100% de la soya en Argentina y en Brasil la adopción de este cultivo ha sido rápida. El 70% del algodón cultivado en Estados Unidos es resistente a glifosato al igual que el 75% de la canola en Canadá y Estados Unidos. En total, el 80% de los cultivos transgénicos en el mundo, son cultivos resistentes a glifosato (Duke 2008). A continuación se presenta un cuadro en donde se muestra el año en el que el cultivo transgénico resistente al glifosato fue adoptado en el mercado de Estados Unidos:

Cuadro 1 Cultivos transgénicos resistentes al glifosato que han sido deregulados en los Estados Unidos.

Cultivo	Año de adopción
Soya	1996
Canola	1996
Algodón	1997
Maíz	1998
Remolacha^a	1999
Alfalfa^b	2005

(Fuente: Duke 2008).

En la figura se muestran los cultivos transgénicos resistentes al glifosato que han sido aprobados (deregulados) por los agricultores durante los diferentes años. La letra “a” representa los productos que han sido removidos del mercado, pero que fueron introducidos nuevamente en 2007. La letra “b” representa los productos que fueron regresados a su estado de regulación en el año 2007 (Duke 2008).

Conforme los cultivos resistentes al glifosato han sido aceptados por los gobiernos en otras partes del mundo, los agricultores en estos países han adoptado rápidamente la tecnología debido a sus extensos beneficios, como es el caso de Argentina, Brasil y Canadá. (Duke 2008).

Dentro de los beneficios, se pueden mencionar los beneficios económicos, como el incremento de la productividad. En cifras, estos beneficios tienen un valor de 78,000 millones de dólares (años 1996-2010). El 40% de estos se derivan de la reducción de los costos de producción, debido a menor rotación, menos aplicación de plaguicidas y

disminución de la mano de obra. El 60% restante son incrementos en productividad. (James 2011).

Los beneficios ambientales de la agrobiotecnología son numerosos. Economiza el suelo, ya que ésta incrementa la productividad y con esto se puede prevenir la deforestación y proteger la biodiversidad de los bosques y otros refugios naturales. En el caso de los países en desarrollo, se pierden 13 millones de hectáreas anuales de bosques tropicales ricos en biodiversidad, estas pérdidas pueden ser contrarrestadas utilizando cultivos biotecnológicos. Entre 1996 y 2010 se produjeron 276 millones de toneladas adicionales de alimentos, forrajes y fibra gracias a la agrobiotecnología, lo cual ayudó a contrarrestar las 91 millones de hectáreas de cultivos convencionales que hubieran echo falta para producir el mismo tonelaje. Si en estas tierras no hubieran existido cultivos biotecnológicos, es probable que hubieran sido tierras frágiles marginales, no adecuadas para la producción agrícola o bosques tropicales ricos en biodiversidad que hubieran tenido que ser talados para dar paso a la agricultura tradicional de los países en desarrollo, que destruye la biodiversidad (James 2011).

La agricultura convencional causa grandes impactos en el ambiente y la huella ecológica puede reducirse si se utiliza la biotecnología. Desde la adopción de cultivos biotecnológicos, se ha notado una gran reducción en la aplicación de plaguicidas, un notable ahorro de combustibles fósiles, descensos en las emisiones de CO₂ y una mejor conservación de suelo y humedad optimizando las prácticas agrícolas para que no haya necesidad de llevar a cabo labranza. Todo esto gracias a cultivos resistentes a herbicidas. En cuanto a los plaguicidas, la reducción acumulada de 1996 a 2010 se cifra en un 9.1%, lo que significan 443 millones de kilogramos en principios activos, es decir kilogramos de principios activos que no fueron aplicados. Esto equivale a una reducción de un 17.9%, el impacto ambiental que ha sido provocado por la aplicación de plaguicidas. Según las cifras de 2010 la reducción fue de 43.2 millones de kg en principios activos y una reducción del 26.2% del impacto ambiental (James 2011).

2. Aislamiento y caracterización de bacterias de muestras de suelo. La biotecnología ofrece un abordaje sostenible a muchas aplicaciones industriales y medio ambientales de beneficio económicos. La biodiversidad microbiana que se encuentra en los lugares donde se llevan los procesos industriales puede ofrecer una gran oportunidad para extraer genes y proteínas de interés para aplicaciones medio ambientales e industriales (Yi-Cheng *et al.* 2005).

a. Aislamiento de bacterias resistentes al glifosato en muestras de suelos. Se pueden extraer e aislar cepas bacterianas que presentan resistencia a glifosato en los lugares donde se aplica comúnmente este herbicida. La metodología es bastante simple. Se toman muestras de suelo del lugar donde se aplica comúnmente el herbicida (Bakken 1995). Luego las muestras son resuspendidas en ciertas soluciones que harán que los sólidos se precipiten y las bacterias queden suspendidas o se puede realizar una centrifugación para crear fracciones (Steubing 1993). Las muestras son inoculadas en placas con una concentración de glifosato 25 mM. Este es el punto de corte para determinar que una bacteria presenta resistencia al herbicida. Toda bacteria que crezca bajo esta concentración debe ser aislada a una nueva placa, separando colonias que demuestren diferencias físicas, clasificándolas por su morfología. El siguiente paso consiste en realizar curvas de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de glifosato a manera de realizar un tamizaje para obtener las bacterias que puedan crecer a la mayor concentración de glifosato. Estas bacterias serán las candidatas para el aislamiento del gen (Yi-Cheng *et al.* 2005).

3. Mecanismos de resistencia bacteriana.

a. Generalidades de los mecanismos de resistencia. La resistencia bacteriana a ciertos compuestos, se puede definir como la capacidad de una bacteria de no ser susceptible a dicho compuesto (Luria 1943). La resistencia a antibióticos y otros compuestos en bacterias se divide en mecanismos que son intrínsecos al microorganismo o adquiridos. Los mecanismos intrínsecos de resistencia son características inatas de las microorganismos y se transmiten en la progenie verticalmente. Los mecanismos

adquiridos son aquellos que resultan en la adquisición del ADN ya sea por transformación, recombinación o adquisición de ADN extra-cromosomal. Este tipo de resistencia se transmite de manera horizontal y puede ser por la adquisición de plásmidos o transposones (Mahon *et al* 2007).

La resistencia de bacterias a ciertos compuestos depende en la naturaleza hidrofóbica e hidrofílica de los compuestos y de la impermeabilidad del compuesto a través de la pared celular. La resistencia intrínseca depende de la composición de la pared celular, la formación de biofilms y flujos de salida (Mahon *et al* 2007).

Para que los compuestos afecten el proceso interno celular, primero deben penetrar la pared celular de las bacterias. Existen dos estructuras fundamentales de la pared celular que llevan a resistencia relevante debido a la impermeabilidad: la composición de lipopolisacáridos y la expresión de proteínas de membrana (Mahon *et al* 2007). Las proteínas de membrana se llaman porinas y son proteínas encargadas de restringir el flujo de compuestos que ingresan a la célula. Éstas permiten el ingreso de nutrientes a la célula así como el egreso de productos de desecho hacia fuera de la misma (Alberts *et al* 2004). Pueden existir alteraciones en las porinas, las cuales llevan a una disminución en su producción. También existen alteraciones que reducen la afinidad de los compuestos a la porina (Mahon *et al* 2007).

Los biofilms son comunidades bacterianas que se unen de manera irreversible a un sustrato y se encuentran embebidas en una matriz polimérica extracelular llamada glucocalix (Pommerville 2007). La resistencia a compuestos por medio de biofilms se debe a diferentes factores, como el bajo crecimiento, el estado fisiológico de los microorganismos asociados con la expresión de genes que corresponden a estrés y la penetración e interacción del compuesto retardada a través del glucocalix extracelular (Mahon *et al* 2007).

Las bombas de flujo de salida se encuentran tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas. Éstas funcionan como transportadores de proteínas y además ayudan en

la remoción de compuestos y sustancias tóxicas desde el interior de la célula hacia el exterior de la misma. La especificidad en estas bombas puede variar ya que puede ser única a un sustrato o puede transportar múltiples sustratos (Alberts *et al* 2004). Existen cinco familias de proteínas de bombas de flujo de salida que están involucradas en la resistencia a compuestos: la subfamilia de facilitadores mayores, la subfamilia de nodulación de resistencia a la división celular, la subfamilia de reguladores multidrogas pequeños, la familia de transportadores ABC y la familia de multidrogas y efectos tóxicos (Mahon *et al* 2007). La mayoría de estas familias de proteínas funcionan por medio del movimiento de protones que crean una fuerza motriz. La única excepción es la familia de los transportadores ABC, los cuales utilizan la hidrólisis de ATP por medio de ATPasas para proveer la energía para el transporte activo de compuestos tóxicos (Becker *et al* 2007). Los mecanismos de flujo de salida intrínsecos se localizan en el cromosoma y se activan por medio de señales o de mutaciones en genes regulatorios (Mahon *et al* 2007).

La resistencia a compuestos también se puede adquirir por la inactivación enzimática. Existen enzimas en las bacterias que degradan los compuestos que son tóxicos para las bacterias. Un ejemplo de esto son las enzimas beta lactamasas, las cuales hidrolizan los antibióticos beta-lactámicos como las penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. Al hidrolizar el compuesto que es tóxico para la bacteria, éste se inactiva y no tiene efecto bactericida para la bacteria (Mahon *et al* 2007).

Los mecanismos adquiridos, son aquellos que no se encontraban en un principio en la bacteria y se adquieren por procesos de selección natural. Ciertos organismos blanco pueden adquirir los mecanismos, evolucionar y diseminar las resistencias. Por ejemplo, en las bacterias, las bombas de flujo pueden ser intrínsecas o adquiridas. También se puede modificar el sitio blanco en el cual actúa el compuesto. Esto reduce la afinidad del blanco a el compuesto. Esto se obtiene principalmente por mutaciones en el cromosoma o por alteraciones enzimáticas. Mutaciones en las enzimas blanco de los compuestos puede causar resistencias debido a que la enzima ya no reconoce el compuesto como su sustrato. De igual manera pueden existir alteraciones en enzimas que hidrolicen el compuesto que

es tóxico a manera que los supproductos de esta hidrólisis ya no sean tóxicos para la bacteria (Mahon *et al* 2007).

Los elementos de transmisión o diseminación de resistencias, que evolucionan a mejorar el intercambio y diseminación de material genético son los plásmidos, transposones, secuencias de inserción y las integrinas. Los plásmidos con ADN extracromosomal, usualmente circular que están presentes en las bacterias y estos contienen genes que codifican proteínas y ARN. Tienen la capacidad de auto-replicarse y repartirse en las células hijas durante la división celular (Pommerville 2007). Los transposones son elementos que codifican transposición y funciones de excisión y pueden transponerse de un lugar del cromosoma al otro o de un plásmido a otro. La transposasa es la enzima que facilita la recombinación y ayuda el evento de transposición. Los transposones, como los plásmidos, también son capaces de llevar genes de resistencia. Las integrinas son elementos genéticos capaces de integrar genes de resistencia por medio de recombinasas codificadas en la integrina que son específicas de un sitio en particular. Las secuencias de inserción son transposones que se encuentran en bacterias y que llevan genes únicamente de las enzimas que necesitan para su propia transposición (Alberts *et al* 2004).

b. Resistencia a antibióticos. Como se mencionó anteriormente, la resistencia a compuestos tóxicos para la bacteria puede ser de varios tipos. Ya sea enzimática, por medio de bombas de flujo, por formación de biofilms, etc. En el caso de los antibióticos, para cada familia o cada antibiótico en específico existe un mecanismo de resistencia diferente (Mahon *et al* 2007). En el caso de la tetraciclina, esta inhibe el crecimiento bacteriano inhibiendo la producción de ciertas proteínas. Existen tres mecanismos de resistencia a tetraciclina identificados: flujo de salida por medio de transportadores (proteínas de exportación), protección de los ribosomas y modificación de la molécula de tetraciclina (Collard, 1999). Debido a la emergencia de resistencias, el uso de este antibiótico se encuentra limitado y los primeros dos mecanismos son los encontrados con mayor frecuencia en la naturaleza. La mayoría de genes de esta resistencia se obtienen por medio de la transferencia de plásmidos o transposones (Todar, 2008).

Los aminoglicosidos, como la estreptomicina y kanamicina, son compuestos que se caracterizan por la presencia de un anillo aminociclitol unido a amino-azúcares en su estructura. Su actividad bactericida se atribuye a la unión irreversible a los ribosomas aunque también ha sido considerada su interacción con otras estructuras celulares y procesos metabólicos. Tienen un espectro antimicrobiano amplio y se conocen tres mecanismos de resistencia a estos antibióticos por las bacterias: alteración de los ribosomas, descenso en la permeabilidad e inactivación de los aminoglucosidos. Este último mecanismo es el de mayor importancia clínica ya que los genes que codifican las enzimas modificadores de aminoglucósidos se pueden diseminar por plásmidos o transposones. En el caso de la alteración de los ribosomas, la resistencia se da por mutaciones puntuales en los genes que codifican proteínas ribosomales. La ausencia o alteración de los sistemas de transporte de los aminoglucósidos es lo que genera el descenso de permeabilidad para los mismos, lo cual genera también un potencial de membrana inadecuado. Por último, la modificación o inactivación de los aminoglucósidos se da por las enzimas acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas o adeniltransferasas y fosfotransferasas (Collard 1999).

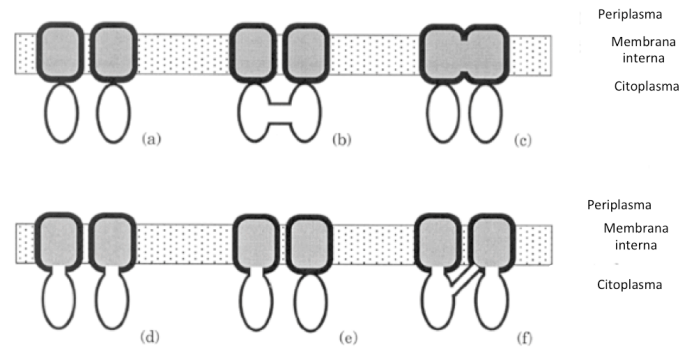
La resistencia a cloroanfencol proviene del gen llamado Cat. Este gen codifica a una enzima llamada cloroanfencol acetiltransferasa, la cual es encargada de acetilar el cloroanfencol. Esto previene que el mismo se una al ribosoma y de esta manera ya no tiene acción sobre la bacteria, se genera la resistencia. Este tipo de resistencia se encuentra en un plásmido (Nogrady *et al* 2005).

c. Transportadores ABC. Los transportadores ABC comprenden una de las familias más grandes dentro de las proteínas. Se encuentran en todas las especies, desde los microbios hasta los humanos y tienen varios roles importantes, especialmente en el ámbito medicinal. En los microorganismos, estos transportadores son centrales a la resistencia de antibióticos y fungicidas (Rees *et al* 2010).

El número de transportadores ABC difiere entre las especies. Ciertos organismos como *E. coli*, que viven en diversos ambientes y necesitan adaptarse a condiciones externas pueden tener muchos transportadores (Rees *et al* 2010). En general, cada transportador ABC es relativamente específico a su sustrato pero existen transportadores que son multiespecíficos como los transportadores de oligopéptidos que pueden transportar esencialmente todos los di y tripéptidos. Algunos transportadores tienen especificidad amplia hacia compuestos hidrofóbicos o se han caracterizado transportadores con especificidad a moléculas pequeñas, moléculas grandes, con muchas cargas, iones orgánicos, azúcares, aminoácidos, proteínas y polisacáridos complejos (Becker *et al* 2007). La diversidad en la especificidad del sustrato viene de la diversidad de roles fisiológicos que este tipo de transportadores tienen. Aunque la primera caracterización de los mismos fue en sistemas de toma de nutrientes, muchos transportadores también funcionan como exportadores. Muchos funcionan en la eliminación de productos de desecho o toxinas de la célula y en la exportación de polipéptidos (Higgins 2001).

La unidad básica de un transportador ABC consiste en cuatro dominios nucleares, como se observa en la Figura 3. Frecuentemente, cada uno de los cuatro dominios está codificado como un polipeptido separado aunque en algunos transportadores los dominios pueden estar fusionados para formar un péptido con multidominios. En casos en donde el cuarto dominio aparece ausente, otro de los dominios funciona como homodímero para mantener la complementación. Los dos dominios transmembranales (TDM por sus siglas en inglés) se extienden a la membrana varias veces formando alfa-hélices putativas y éstos forman la ruta por la cual el soluto pasa por la membrana (cuadrados en la Figura 3). También determinan la especificidad del transportador utilizando sitios de unión. Los otros dos dominios, los dominios ATP (óvalos en la Figura 3) o de unión de nucleótidos (dominios ABC), son hidrofílicos y están asociados al citoplasma. Estos dominios son los que definen y delimitan la familia de los transportadores ABC (Higgins 2001). A continuación se muestra una figura ilustrando los dominios de los transportadores ABC:

Figura 3. Dominios de los transportadores ABC y fusión de los dominios



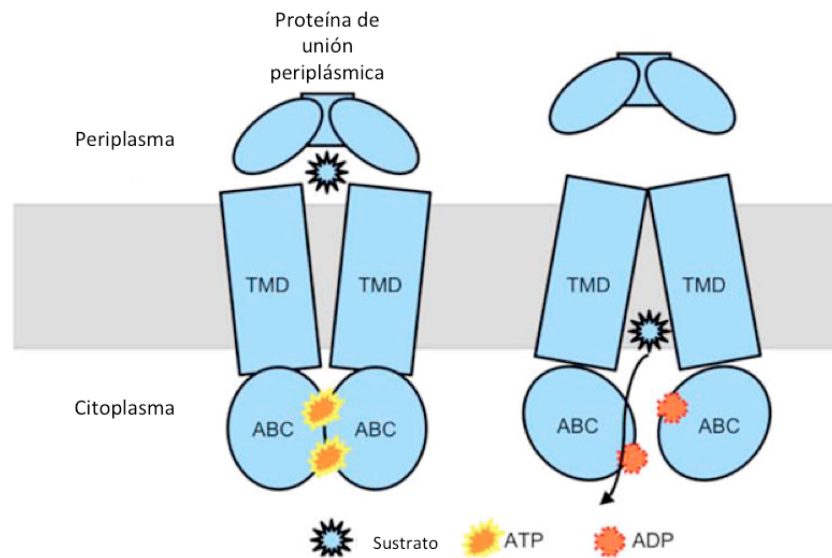
(Fuente: Higgins 2001)

En la figura, los cuadrados representan los dominios transmembranales y los óvalos representan los dominios ATP o dominios ABC. Los dominios pueden estar fusionados de varias maneras. En a) se muestra como cuatro polipeptidos separados, en b) los dominios ABC se encuentran fusionados, en c) los dominios transmembranales se encuentran fusionados, en d) un dominio transmembranal se encuentra fusionado con un dominio ABC, funcionando como homodímeros, en e) uno de los dominios transmembranales se encuentra fusionado con uno de los dominios ABC, mientras que el otro se encuentra separado y en f) los cuatro dominios se encuentran fusionados, esta es una característica de los transportadores ABC en eucariotas.

Algunos transportadores ABC pueden utilizar proteínas de unión periplásmica. Éstas funcionan como dominios auxiliares y se unen al sustrato que se encuentra fuera de la célula para depositar el mismo en el complejo asociado a la membrana. Se cree que las proteínas de unión preiplásmica tienen dos funciones: la primera es dar afinidad y especificidad y la segunda conferir direccionalidad. En cuanto a la afinidad y especificidad, la mayoría de transportadores ABC que no poseen este tipo de proteínas tienen amplia especificidad, contrario a los que sí las poseen y es por esto que se cree que son las responsables de la afinidad del complejo. En cuanto a la direccionalidad, la interacción de las proteínas de unión periplásmica con el transportador afuera de la célula puede iniciar la hidrólisis de ATP en el citoplasma, esto crea cierta direccionalidad en cuanto a la entrada o salida de compuestos del complejo. Otros transportadores ABC

requieren de las proteínas de membrana externa para facilitar el ingreso de solutos al periplasma (Higgins 2001). A continuación se muestra la figura de los dominios de los transportadores ABC y las proteínas de unión periplásmica:

Figura 4. Transportador ABC y proteína de unión periplásmica



(Fuente: Rees *et al* 2010)

El ciclo de transporte llevado a cabo por los transportadores ABC se inicia con la interacción del sustrato con los dominios de transmembrana de la cara intracelular de la membrana. En el caso que se estén importando compuestos, el sustrato forma un complejo con las proteínas de unión periplásmica las cuales interactúan en parte extracelular de la membrana. El sustrato se libera de las proteínas para interactuar con los dominios de transmembrana. La unión del sustrato induce un cambio conformacional en los dominios de transmembrana, el cual se transmite a los dominios ATP para iniciar la hidrólisis del ATP. Ambos dominios se requieren y ambos dominios deben hidrolizar ATP. No se sabe con exactitud cuántas moléculas de ATP se hidrolizan por molécula de sustrato, pero se cree que son dos. La hidrólisis del ATP induce cambios conformacionales en los dominios ATP, los cuales se traducen a los dominios

transmembranales. En el caso de las moléculas que están siendo exportadas, un sitio de unión del sustrato de alta afinidad en el interior de la membrana se reorienta para ser expuesto al exterior de la membrana, simultáneamente se afecta la afinidad del sustrato al sitio de unión, se reduce la afinidad y esto resulta en la liberación del sustrato. Finalmente el transportador debe ser reajustado y el sitio de unión se reorienta de nuevo al interior de la membrana, al igual que se afinidad es restaurada. La reorientación de un sitio de unión no significa un gran movimiento a través de la bicapa. El sitio se queda en la cara intracelular de la membrana y los cambios conformacionales sirven para alterar la exposición del mismo a la parte extracelular del transportador. (Higgins 2001).

4. Clonación genética.

a. Generalidades y bases de la clonación. En biología molecular, la clonación de ADN puede referirse a la amplificación de una secuencia de ADN particular, es decir, producir muchas copias idénticas de una molécula de ADN. También puede referirse a el aislamiento de un fragmento particular de ADN (generalmente un gen específico) del resto de ADN en la célula (Alberts *et al.* 2002). Sin importar el método, la clonación de moléculas de ADN da paso a moléculas de ADN recombinantes, que se mantienen en generalmente en células bacteriales (Nicholl 2008).

La clonación de ADN se puede llevar a cabo de varias maneras. La más simple consiste en insertar un fragmento de ADN particular que ha sido purificado, en un elemento genético autoreplicador, como puede ser un virus o un plásmido. De esta manera se crean moléculas de ADN recombinante las cuales pueden ser introducidas en células bacterianas o virus. El fragmento se puede amplificar por medio de la replicación de los virus o bacterias el factor de veces que estos se repliquen (Alberts *et al.* 2002). De esta manera un virus o un plásmido se puede utilizar como un vector de clonación y el ADN propagado por la inserción se dice que ha sufrido una clonación (Nicholl 2008).

Para aislar un gen específico, generalmente se inicia construyendo una biblioteca de ADN. Una biblioteca de ADN es una colección de fragmentos de ADN de una célula, tejido u organismo. Esta librería incluye por lo menos un fragmento que contiene el gen

de interés (Alberts *et al* 2002). Una biblioteca genómica debe representar el genoma completo de un organismo en una colección de fragmentos clonados que se sobreponen entre sí (Nicholl 200). Las bibliotecas pueden ser construidas por medio de un vector viral o bacteriano y generalmente son mantenidas en una población de células bacterianas. Actualmente, la mayoría de clonaciones son llevadas a cabo por medio de vectores de plásmidos (Alberts *et al.* 2002).

Hoy en día, que muchas secuencias y genomas están disponibles, los genes pueden ser clonados directamente sin la necesidad de construir bibliotecas de ADN. La clonación es posible debido a la técnica de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). PCR permite que el ADN de una región selecta en un genoma sea amplificada, “purificando” el fragmento de ADN del genoma restante (Alberts *et al.* 2002).

b. Clonación de genes utilizando el método de biblioteca genómica. La clonación de ADN, sin importar el método a utilizar, produce una población de moléculas de ADN recombinante, generalmente introducidas en un plásmido y mantenida en células bacterianas (Alberts *et al* 2002). La colección de los clones independientes se conoce como biblioteca genómica. Estas son grupos de clones que representan el genoma entero de un organismo y la producción de estas bibliotecas es usualmente el primer paso en aislar una secuencia de ADN específica del genoma de un organismo (Nicholl 2008).

Los fragmentos a clonar deben, idealmente, ser generados por un procedimiento que sea independiente a la secuencia, de esta manera se puede asegurar que los fragmentos son generados al azar y que no hay una tendencia hacia alguna secuencia en particular. Finalmente, los fragmentos clonados se deben mantener en una forma estable (Nicholl 2008).

La primera consideración para construir una biblioteca genómica es el número de clones requeridos. Esto depende de muchos factores, principalmente el tamaño del genoma. Un genoma pequeño, como el de *E.coli* requiere menos clones que un genoma grande, como el genoma humano. El tipo de vector es importante ya que éste determinará

el tamaño de los fragmentos que pueden ser clonados. El tamaño de la biblioteca puede ser calculado con las bases de la probabilidad de una secuencia particular siendo representada en la biblioteca. La fórmula:

$$N = \ln(1-P)/\ln(1-a/b)$$

(Nicholl 2008)

predice el número de clones necesarios. “N” es el número de clones requeridos, “P” representa la probabilidad deseada de una secuencia particular a representar (siendo casi siempre 0.95 o 0.99), “a” es el tamaño promedio de los fragmentos de ADN que se desean clonar y “b” representa el tamaño del genoma. Utilizando esta fórmula, es posible determinar la magnitud del experimento y planear la estrategia de clonación de acuerdo a esto (Nicholl 2008).

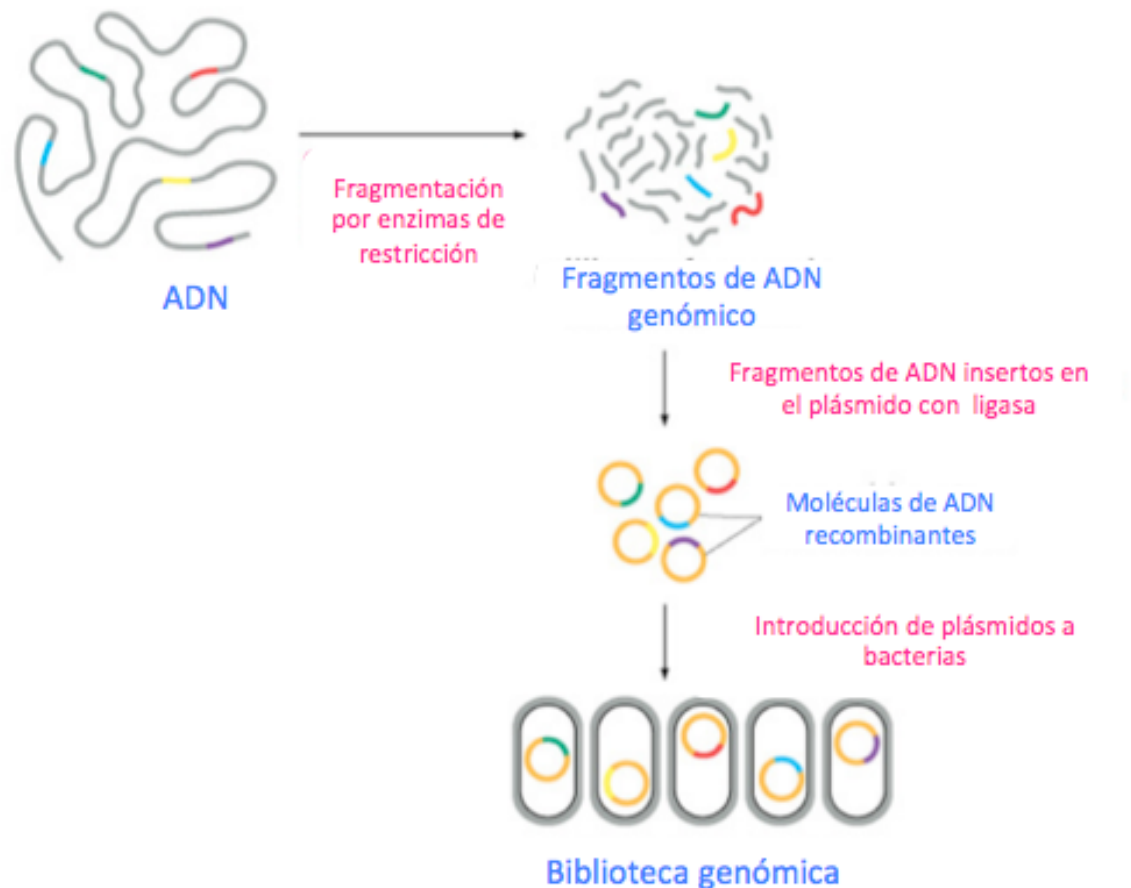
Uno de los aspectos más importantes de la producción de bibliotecas es la generación de los fragmentos de ADN a clonar. Es importante que los fragmentos no sean muy pequeños ya que esto da posibilidad a que se generen demasiados insertos y cuando se realice la ligación estos se peguen en secuencias continuas al vector . Es por esto que el método de fragmentación es importante. La fragmentación generalmente se lleva a cabo por digestión parcial enzimática o por métodos mecánicos. Luego los fragmentos se deben ligar al vector de elección (Nicholl 2008).

Luego de la digestión la muestra puede ser purificada. Se pueden utilizar métodos de centrifugación o los fragmentos se pueden extraer de un gel de electroforesis. Se buscan los fragmentos con el tamaño deseado y se seleccionan para la ligación. El ADN a ligar en el vector puede ser tratado con una fosfatasa para reducir la ligación de el mismo o la concatenación. El vector debe ser digerido con enzimas para generar extremos cohesivos para clonar (Alberts *et al* 2002).

El ADN recombinante, luego de la ligación, está listo para ser introducido en las células en las cuales se va a mantener y las características genéticas pueden ser seleccionadas

utilizando técnicas de selección y tamizaje acordes al vector utilizado y al gen que se desea clonar (Nicholl 2008). A continuación se muestra una figura con los pasos del método de clonación génica por medio de la producción de una biblioteca genómica:

Figura 5. Pasos a seguir para crear una biblioteca genómica.



(Fuente: Alberts *et al.* 2004).

c. Clonación de genes utilizando el método de cebadores degenerados.

Los cebadores degenerados son aquellos que poseen un número de opciones de bases nitrogenadas en varias posiciones en la secuencia de los mismos para así permitir alineamiento y amplificación de una gran variedad de secuencias relacionadas. En realidad, son un grupo de cebadores que tienen distintas opciones de bases nitrogenadas en cierto lugar específico del cebador. Un ejemplo de una secuencia de un cebador degenerado podría ser:

5' – TCG ATT TCI CCY AAY TGR CCN T- 3'
(Cortazar 2004)

En donde la “A” representa adenina, “C” las citosinas, “G” las guaninas y “T” las timinas. “Y” representa la opción de pirimidinas (en ese espacio puede haber una C o una T), la “R” representa la opción de purinas (puede ser A o G), “I” las inosinas (C,G,A,T) y “N” nucleótidos (C,G,A,T) (Cortazar 2004).

Los cebadores degenerados se pueden utilizar en la amplificación de las secuencias conservadas de uno o varios de genes del genoma de un organismo o para conseguir la secuencia de nucleótidos luego de haber llevado a cabo una secuenciación de aminoácidos de una proteína de interés. Se pueden utilizar para amplificar secuencias de regiones conservadas entre especies, las secuencias amplificadas pueden ser secuenciadas y luego se pueden realizar comparaciones (Linhart *et al* 2002). También se pueden utilizar como sondas para amplificar genes de interés de una biblioteca genómica o biblioteca de ADN (Cortazar 2004).

El diseño de los cebadores degenerados es relativamente sencillo. Primero se deben recuperar secuencias de aminoácidos de proteínas similares y homólogas que correspondan al gen de interés. Las secuencias se alinean y se buscan las regiones conservadas. La alineación también puede ser a nivel de nucleótido y estas alineaciones ayudan a determinar el tamaño previsto del producto de la reacción de PCR (Cortazar 2004). Los cebadores se diseñan a partir de las regiones conservadas y estos deben tener por lo menos 20-30 nucleótidos de longitud. La degeneración de los cebadores depende de muchos factores, la más importante la secuencia. Si ciertas bases no son conservadas en el lugar en donde se quiere diseñado el cebador, estas se dejan abiertas para tener la opción de una o más bases en ese sitio específico (es aquí en donde se utilizan las letras “Y”, “X”, “N”, etc.), esto produce la degeneración (Linhart *et al* 2002). Conforme la degeneración aumenta, la concentración de un cebador específico disminuirá, es por esto que se debe ser cuidadoso en no degenerar mucho los cebadores. En general esta técnica

es una técnica bastante confiable si el diseño se realizó de la manera adecuada (Cortazar 2004).

Luego que se ha llevado a cabo la amplificación de la secuencia deseada, los pasos a seguir en la clonación son relativamente los mismos a cuando se realiza la biblioteca genómica. Los fragmentos se separan en gel de agarosa, se extrae el fragmento de interés, éste se liga al vector de preferencia y luego el ADN recombinante se inserta en las células que lo acarrearan y se pueden hacer selecciones y tamizajes, según el vector y el inserto (Nicholl 2008).

d. Clonación del gen de glifosato. Genes de resistencia al glifosato han sido clonados de varias fuentes. En un estudio llevado a cabo en la universidad estatal de Louisiana se clonó el gen de resistencia al glifosato presente en una cepa de *Pseudomonas* sp. En este estudio se extrajo el ADN cromosomal y los plásmidos de la cepa. Se creó una biblioteca de ADN en vectores lambda. La biblioteca entera fue secuenciada y por medio de ella y bioinformática se determinó en donde se encontraba el gen de interés. Gracias a esta identificación, el gen se mantuvo en los plásmidos bacteriales y se clonó en células bacterianas (Fitzgibbon *et al.* 1990).

Según Yi-Cheng (2005) de la Universidad de Pekín, otra manera de clonar el gen del glifosato es aislando el ADN cromosomal de la bacteria. El ADN es digerido con enzimas de restricción y luego los fragmentos pueden ser ligados a un plásmido con puntas cohesivas (cósmidos). La librería de los cósmidos se mantiene en colonias de *E.coli* y se realiza una secuenciación de los fragmentos para determinar en dónde se encuentra el gen de interés. Se extrae el ADN con el gen de interés y se amplifica por medio de PCR. Con el ADN amplificado se crean plásmidos recombinantes para poder realizar la transformación. Las células transformadas se deben inocular en placas con glifosato hasta determinar si la bacteria ha alcanzado el nivel de resistencia a glifosato que se esperaba.

Otro estudio, llevado a cabo en la Academia de Ciencias Agrícolas en, Shanghái, China, utiliza técnicas de clonación básicas para el aislamiento del gen de resistencia al

glifosato. Para aislar el gen de una bacteria resistente al glifosato de la especie *Ochrobactrum anthropi* construyeron una biblioteca genómica con fragmentos de 2 a 4 kb del genoma de la bacteria, obtenidos por medio de enzimas de restricción. Los fragmentos se insertaron en el vector pUC18 el cual fue digerido con la enzima de restricción BamHI. La mezcla de la ligación fue transformada en células *E.coli* ElectroMax DH10B T1 por medio de electroporación. Los clones se inocularon en placas con agar LB y luego fueron seleccionados por su habilidad de crecer en medio con concentración 60 mM de glifosato. Los clones seleccionados fueron secuenciados y analizados (Yong-Sheng *et al.* 2010).

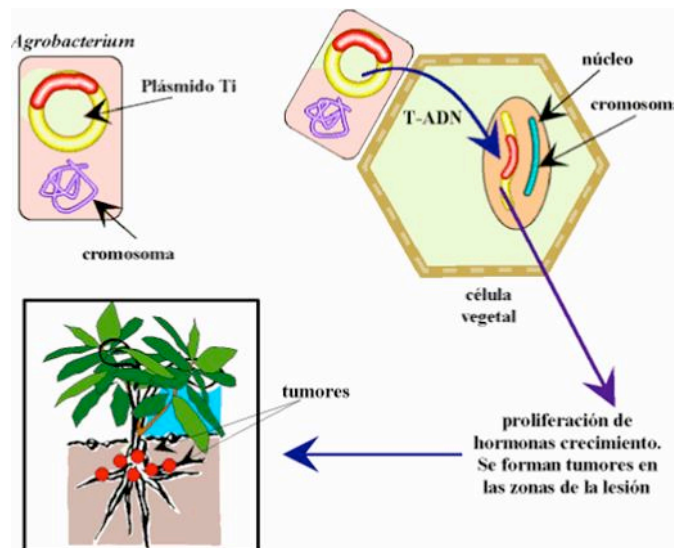
5. Transformación bacteriana y de plantas con el gen de interés

a. Transformación bacteriana. La transformación bacteriana es el proceso en el que las bacterias incorporan moléculas de ADN libres. Si el ADN desconocido posee un origen de replicación reconocido por las polimerasas de ADN de la célula, la bacteria replicará el ADN desconocido en conjunto con su propio ADN. Cuando la transformación es acoplada con técnicas de selección por antibióticos, las bacterias pueden ser inducidas a incorporar ciertas moléculas de ADN y luego esas bacterias pueden ser seleccionadas de las que no incorporaron el ADN externo (Roe 2001).

Existen cuatro métodos básicos utilizados para la transformación bacteriana: transformación natural, transformación utilizando células competentes preparadas químicamente, electroporación y conjugación (Schweizer 2008). En el estudio realizado en la Universidad de Pekín, se aisló el gen de resistencia de glifosato de *Pseudomona putida* aislada de muestras de suelo de un ambiente contaminado. El gen aislado es clonado e insertado en bacterias *E.coli* XL1 Blue. En este estudio se utiliza el método de la transformación por medio de células competentes para transferir el gen de resistencia al glifosato unido a un plásmido a las bacterias *E.coli* XL1 Blue, lo que demuestra que por métodos convencionales de laboratorio las transformaciones pueden ser llevadas a cabo de manera sencilla si ya se tiene el gen de interés clonado (Yi-Cheng *et al.* 2005).

b. Transformación de plantas y *Agrobacterium*. Además de la transformación bacteriana, existe también la transformación de plantas mediada por bacterias. La transformación genética mediada por la bacteria *Agrobacterium* es la tecnología dominante utilizada para la producción de plantas modificadas genéticamente. *Agrobacterium* transforma genéticamente a su hospedero transfiriendo un segmento definido de ADN desde su plásmido llamado Ti (inductor de tumores) hasta el genoma de la célula huésped. La generación y el transporte del ADN bacterial hacia la célula hospedera ha logrado que se existan muchas cepas de *Agrobacterium* recombinantes ya que el gen de interés puede ser insertado en el plásmido Ti de *Agrobacterium*, creando un plásmido recombinante, y luego transferir ese ADN a la planta (Tzfira *et al.* 2006). A continuación se muestra la figura del método de transformación de plantas utilizando *Agrobacterium sp.*

Figura 6. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.



(Fuente: Zamundio 2005).

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* posee un plásmido llamado Ti en el cuál se puede insertar el gen de interés (región roja en la figura) en la transformación. *Agrobacterium* posee la capacidad de poder transferir su ADN a la célula hospedera,

transfiriendo así el gen de interés a la planta. Este gen de interés podría ser el gen de resistencia a un herbicida (Zamundio 2005).

En la Universidad de Zhejigang, se llevó a cabo un estudio en donde se generaron plantas de arroz transgénicas utilizando un gen de glifosato nuevo extraído de *Pseudomona putida* como gen de interés. La transformación fue llevada a cabo por medio de *Agrobacterium*. La transformación fue llevada a cabo de manera satisfactoria ya que las plantas presentaron la resistencia al glifosato que se esperaba. (Chaoyang *et al.* 2008)

6. Proyectos actuales en Guatemala con relación al aislamiento de genes en bacterias resistentes al glifosato. Actualmente, en Guatemala se lleva a cabo un proyecto de clonación del gen de glifosato que será extraído de bacterias de muestras de suelo de la finca de piña de Agropecuaria Popoyán ubicada en el kilómetro 101 carretera a Mazatenango. El proyecto consiste en extraer bacterias de suelos en donde se aplica el glifosato como herbicida de preferencia. Aislar las bacterias que presenten crecimiento a altas concentraciones de glifosato, identificarlas molecularmente por medio de su secuencia ADNr 16s, clonar el gen de resistencia al glifosato y compararlo con secuencias de genes que se encuentren patentados. Luego se busca transformar una bacteria que no posea resistencia a manera de probar los mecanismos de la transformación y finalmente transformar una planta no resistente para que posea resistencia y el herbicida pueda ser aplicado a su alrededor sin dañar la planta. El proyecto se encuentra financiado por el FODECYT y se encuentra en la fase de caracterización molecular de las bacterias resistentes (Richter 2011).

7. Importancia del estudio y del desarrollo de la tecnología en Guatemala. Como se mencionó anteriormente, en Guatemala ya se llevan a cabo estudios con el gen de resistencia al glifosato a manera de clonar el gen y brindar la tecnología para crear plantas transgénicas resistentes al glifosato (Stein datos no publicados). Las normas regulatorias actuales dictan que dadas a las patentes de Monsanto sobre el gen de resistencia al glifosato la tecnología para utilizar productos transgénicos con esta resistencia llega a costos de \$50 a \$100 millones de dólares. (Dill 2005) Es por esto que la

generación de un gen de resistencia al glifosato diferente a la forma patentada sería un gran ingreso para las compañías de Guatemala que patenten o vendan la nueva forma del gen. (Stein Mayo 2012)

A. Justificación

El sector agrícola en Guatemala es responsable de 35.1% (aprox.) del Producto Interno Bruto (PIB) del país (Cardona 2006). Por ende, las buenas prácticas agrícolas y las tecnologías que incrementan la productividad juegan un rol importante para la economía nacional. Los cultivos resistentes al glifosato mejoran la productividad contribuyendo así a la seguridad alimentaria. Además, son de baja toxicidad y benignos al medio ambiente, reduciendo el impacto ambiental que provocan las prácticas agrícolas convencionales (James 2011). Así mismo poseen otros beneficios sobre las tecnologías que la podrían reemplazar. Por tal razón se busca aislar un nuevo gen resistente al glifosato, de una forma diferente a la que se encuentra patentada y de esta manera hacer accesible la tecnología para el sector productor agrícola del país. El aislamiento del gen permitirá a futuro incentivar al sector agrícola a utilizar el glifosato como herbicida de baja toxicidad para que éste reemplace a los herbicidas de alta toxicidad. Además el desarrollo de esta tecnología probaría que en Guatemala existen genes diferentes los cuales poseen las características necesarias para ser utilizados comercialmente y que en Guatemala es posible desarrollar este tipo de tecnologías, las cuales traen beneficios económicos y medioambientales a países desarrollados.

La primera fase de este proyecto ya ha sido llevada a cabo y se han aislado e identificado bacterias que poseen un alto espectro de resistencia al glifosato (concentración milimolar de glifosato en placa). Se identificó una *Serratia marcescens* resistente a 75 mM glifosato y a tetraciclina 1.2 μ M (Richter 2011). La resistencia a tetraciclina es un rasgo común y caracterizado para una variedad de bacterias, por lo que puede ser utilizado como control interno de clonación. La clonación de los genes de resistencia a glifosato y tetraciclina, así como la transformación de plantas, pueden llevarse a cabo con métodos convencionales de laboratorio de biología molecular y utilizando ingeniería genética, por lo que la investigación es factible. El llevar a cabo este

proyecto en Guatemala, beneficiará al sector agrícola ya que provee la alternativa de utilizar esta nueva tecnología que se ha adoptado en muchas partes del mundo en cultivos variados y que provee beneficios ambientales. Adicionalmente, fortalecerá la capacidad instalada y expertaje en técnicas de ingeniería genética, contribuyendo al desarrollo de nuevas tecnologías en el país.

B. Objetivos

1. Objetivo general

Aislar un gen responsable de la resistencia al glifosato por medio de la implementación de dos protocolos de clonación génica.

2. Objetivos específicos

a. Validar un protocolo de clonación por biblioteca genómica utilizando una *Serratia marcescens* resistente a 75 mM glifosato como muestra y resistente a el antibiótico tetraciclina como control.

b. Validar un protocolo de clonación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando una cepa resistente al glifosato como muestra.

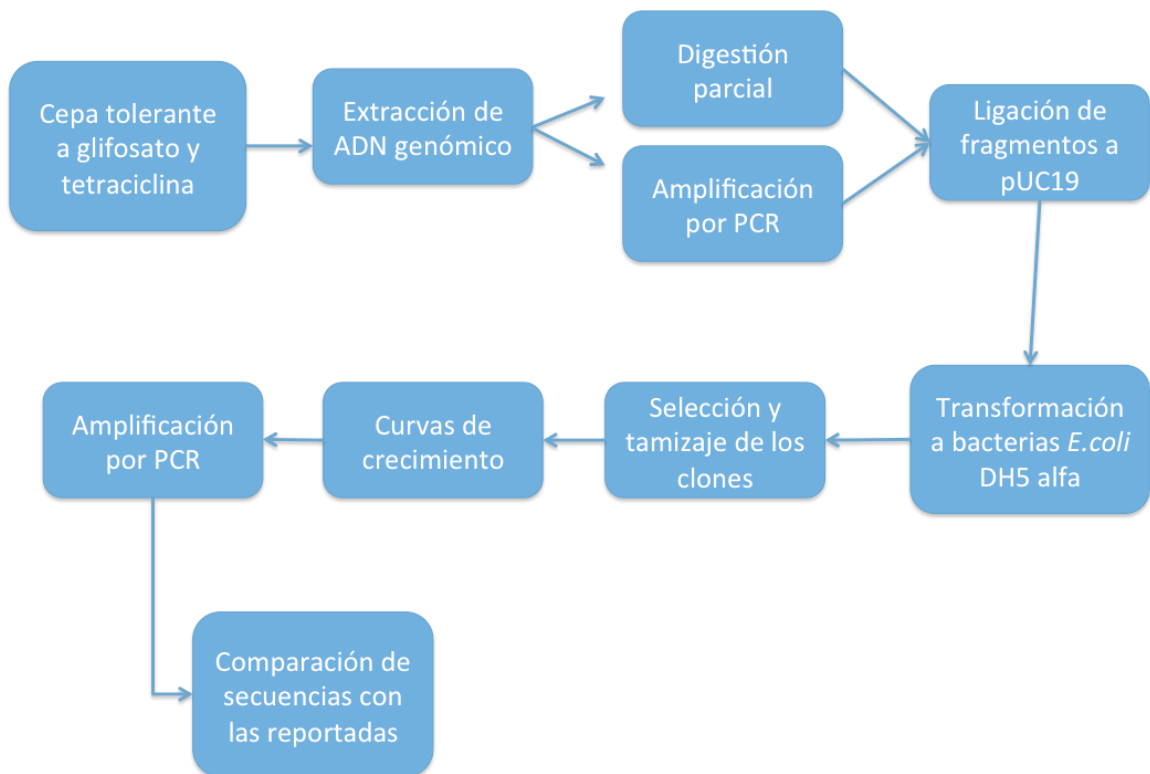
c. Secuenciar los fragmentos clonados para determinar por medio de BLAST, si este fragmento corresponde a un gen completo o parcial y determinar su identidad.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Métodos

El procedimiento de la validación de dos protocolos de clonación génica para aislar el gen responsable de la resistencia al glifosato proveniente de bacterias aisladas de muestras de suelos guatemaltecos se muestra resumizado en el diagrama de flujo de la siguiente figura:

Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento de la metodología.



1. Aislamiento del gen de resistencia al glifosato y a la tetraciclina por el método de biblioteca genómica.

a. Caracterización de la muestra *Serratia marcescens*. Como muestra, se utilizó una bacteria *Serratia marcescens* resistente a 75 mM glifosato (Richter 2011). Esta bacteria además se caracterizó en diferentes antibióticos para determinar si existía resistencia a los mismos. La bacteria fue inoculada en placas de LB con tetraciclina 1.2 μM , kanamicina 0.103 μM , estreptomycinina 0.085 μM y cloroanfenicol 0.092 μM (Sambrook *et al.* 2001). Se utilizó la resistencia a tetraciclina como un control interno del método. Esto es porque la resistencia a tetraciclina es la resistencia más común dentro de los microorganismos y la más caracterizada (Mahon *et al* 2007). Esto quiere decir que se sabe la concentración a la cual un organismo se considera resistente a la misma y además se sabe que este rasgo es típicamente conferido por transportadores. De esta manera se intentó clonar dos rasgos del mismo genoma, de manera que si la clonación es exitosa se podría validar el método de clonación. (Apéndice I).

b. Extracción y cuantificación de ADN genómico. Para la extracción de ADN genómico de la muestra (*Serratia marcescens* resistente al glifosato y a tetraciclina) se utilizó el kit Purelink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, K 1820-00, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Este kit utiliza soluciones tampón que permiten la lisis simple con la ayuda de la enzima Proteinasa K, sin la necesidad de realizar lisis celular mecánica. El ADN luego se une a una membrana de sílica y éste es purificado utilizando columnas y procedimientos de centrifugación (Eppendorf, Minispin). Se inició recolectando 2×10^9 de células bacterianas (aprox. 1 mL de cultivo ON de células *E.coli*) por centrifugación. Luego se resuspendió el precipitado en 180 μL de solución tampón de digestión PureLink™ y se agregaron 20 μL de proteinasa K PureLink™, se vortexearon para mezclar bien. Las muestras se incubaron a 55° C por una hora, vortexeando ocasionalmente. Luego de esto, se agregaron 20 μL de ARNasa al lisado, se mezcló por medio de vortex y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por dos minutos. Se agregaron 200 μL de solución tampón de unión PureLink™ y se mezcló bien utilizando el

vortex para obtener una solución homogénea. Se agregaron 200 μ L de etanol al 100% al lisado, se mezcló con vortex por cinco segundos para obtener una solución homogénea. Agregar el lisado (aprox. 640) a una de las columnas del kit con un tubo colector, se centrifugó la columna a 10,000 x g por un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector, se colocó uno nuevo y se agregaron 500 μ L de solución tampón de lavado 1 a la columna. La columna se centrifugó a 10,000 x g por un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo en la columna, luego se agregaron 500 μ L de solución tampón de lavado 2. Se centrifugó la columna a velocidad máxima (13,500 x g) por tres minutos a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna en un tubo estéril de 1.5 mL. Se agregaron 100 μ L de solución tampón de elución PureLinktm, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por un minuto, se centrifugó la columna a máxima por un minuto a temperatura ambiente, el ADN recuperado se cuantificó. La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio de espectrofotometría, realizando una dilución 1:10 de ADN extraído en agua, se realizaron lecturas a 260, 280 y 320 nm, en un espectrofotómetro (Agilent, 8453), utilizando una celda de cuarzo de 5 μ L y 10 mm (Agilent, 5063-6565), calculando así la concentración del ADN extraído (Invitrogen, K 1820-00, EEUU). Algunas muestras fueron visualizadas por medio de electroforesis, la cual se realizó en gel de agarosa al 0.8% en solución tampón TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8) en concentración 1X, separado también en TBE 1X a 90 Volts/cm por 50 minutos. Para visualizar la electroforesis se utilizó tinción con Gel Red (Biotium, 41003), preparado según las instrucciones del fabricante en 100 mL, por 40 minutos y se visualizó en una cámara de luz UV (UVP, 950415-01). Se tomó la fotografía del gel utilizando una campana oscura (UVP Photo Doc-it imaging system 60, 97-0274-01) y una cámara fotográfica marca Canon modelo Powershot A480 (Sambrook *et al.* 2001).

La extracción de ADN se inició con 1 mL de cultivo ON (cultivo “overnight”, cultivo dejado toda la noche a 37° C con agitación 25 rpm (MaxQ 4000, Barnstead Line), en 3 mL de caldo nutritivo) utilizando el kit. Se intentaron varias modificaciones al kit: realizar lavados de los precipitados bacterianos con caldo nutritivo, iniciar con 500 μ L,

750µl, realizar diluciones 1:10 y medir en espectrofotómetro la densidad bacteriana a 600 nm, a manera de optimizar la extracción.

Para el protocolo de extracción de ADN con Trizol, se inició con 1 mL, 500 µL, 400 µL de cultivo bacteriano ON tanto del control como de la muestra en caldo nutritivo, a manera de intentar variaciones en el protocolo para su optimización. Luego las células bacterianas se precipitaron centrifugando 90 segundos a 8,600 g (Accuspin micro 17R, Fischer). Se agregaron 0,75mL de Trizol (Invitrogen, 15596-026) y las células se lisaron utilizando un homogenizador (Pyrex). Las muestras se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregaron 0,2 mL de cloroformo y se agitaron las muestras por 15 segundos. Las muestras se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12, 000 g (Accuspin micro 17R, Fischer) por 15 minutos a 4° C y se removió la fase acuosa de la solución (fase superior), se agregaron 300 µL de etanol al 100% y los tubos se mezclaron por inversión. Las muestras se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 12, 000 g (Accuspin micro 17R, Fischer) por 5 minutos a 4° C para precipitar el ADN. Se removió el sobrenadante y se realizó el lavado del precipitado. Para este lavado se agregó 1 mL de solución de citrato de sodio/etanol (0.1 M citrato de sodio en 10% etanol, pH 8.5) el precipitado anterior, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 12, 000 g (Accuspin micro 17R, Fischer) por 5 minutos a 4° C. Se removió y descarto el sobrenadante. Este lavado se repitió una vez más. Luego se agregaron 1.5 mL de etanol al 75% y las muestras se incubaron 10-20 minutos a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó a 12,000 g (Accuspin micro 17R, Fischer) por 5 minutos a 4° C. Se removió el sobrenadante, se secó el precipitado por 10 minutos al aire y el ADN se resuspendió en solución tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM). La cuantificación del ADN se realizó por medio de espectrofotometría, como se mencionó anteriormente (Invitrogen, Trizol Reagent, 15596-026)

El protocolo de extracción de ADN utilizando cloroformo y alcohol isoamílico se inició centrifugando 1.5 mL de cultivo ON, tanto de la muestra como del control, 90 segundos a 8, 000 g . Luego el precipitado fue resuspendido en 500 µL de solución

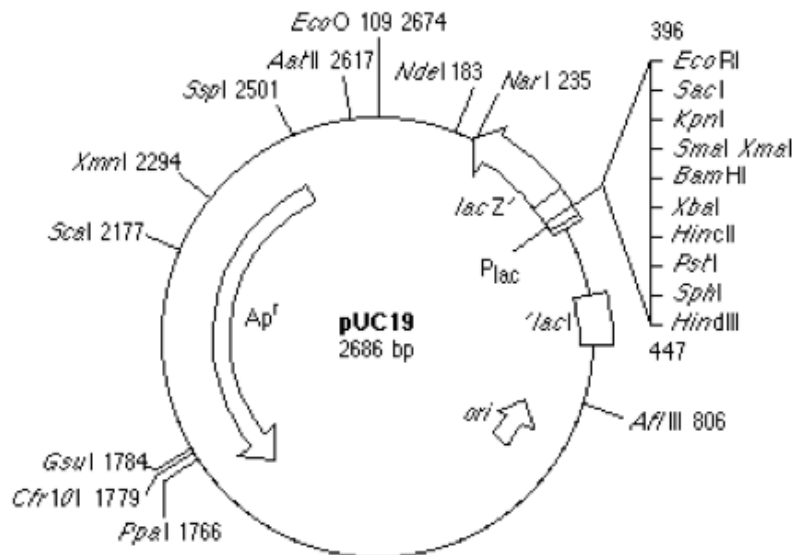
tampón TE y se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 250 μL de solución de lisis (SDS 0.5%, proteinasa K 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se agitó y luego incubó por 15 minutos a 56° C. Las muestras fueron agitadas y se agregaron 250 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (1:1), se centrifugaron a 8,500 rpm por 15 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. A esta fase acuosa se agregaron 350 μL de etanol 100%, se mezcló y luego se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm. Para precipitar el ADN se agregaron 1/10 volúmenes de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol 100%. Las muestras se mezclaron por inversión y luego se centrifugaron a máxima velocidad por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 300 μL de agua destilada estéril. Estos pasos de la precipitación, se repitieron una segunda vez y luego el precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 70%. Por último se realizó una centrifugación rápida, se descartó el etanol, se secó el precipitado al aire por 5 minutos y se resuspendió el mismo en solución tampón TE. A manera de optimizar el protocolo, se intentaron modificaciones del mismo: se inició con 100, 250, 500, 750 μL de cultivo, al igual que se cambió la proporción de cloroformo: alcohol isoamílico 1:1 a 1:24 (Stein M, curso de Biología Molecular). La cuantificación del ADN obtenido por este método se realizó por medio de espectrofotometría, como mencionó anteriormente. Con ninguna de estas modificaciones se obtuvo los resultados esperados (Apendice, Cuadro 5), es por esto que se intentó la optimización del kit una vez más.

En este caso, se inició con 500 μL de cultivo ON, la modificación fue que el cultivo ON se dejó ocho horas de incubación en lugar de diez horas. La cuantificación de ADN por este método se realizó en espectrofotometría y el ADN se visualizó por electroforesis (con las condiciones mencionadas anteriormente), se obtuvieron resultados positivos (Apéndice, Cuadro 6) y es por esto que se tomó como optimizado el protocolo y se siguió a la digestión del ADN genómico.

c. Extracción del plásmido pUC19. Se extrajo plásmido pUC19 de cepas bacterianas *E.coli* DH5 α (Invitrogen, 18258-012). Para esto se utilizó el kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen, k2100-2, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Si inició con 20 mL de cultivo ON de células *E.coli* DH5 α y

se utilizó la modalidad “Midiprep” del kit. El kit utiliza una resina de intercambio de aniones para purificar el ADN plasmidial. Las células primero se recolectan y se resuspenden en una solución tampón con ARNasa, luego la lisis celular se realiza utilizando detergentes. La precipitación se lleva a cabo utilizando solución tampón con acetato de potasio y el lisado se clarifica por medio de centrifugación. El lisado pasa por una columna de intercambio de aniones en donde, los fosfatos cargados negativamente en la estructura del ADN interactúan con las cargas positivas de la superficie de la resina. El plásmido se mantiene unido a la resina y las proteínas, ARN, carbohidratos y demás impurezas se lavan utilizando una solución tampón. El plásmido se eluye de la columna por medio de una solución tampón alta en sales. Luego se eliminan las sales y se concentra por precipitación con etanol (Invitrogen, k2100-2, EEUU). A continuación se muestra la figura del plásmido pUC 19:

Figura 8. Plásmido pUC19.



(Fuente: Feinbaum 2001).

d. Digestión del ADN genómico y del plásmido con enzimas de restricción. El ADN genómico extraído de la muestra con anterioridad fue digerido por medio de enzimas de restricción. Se seleccionaron enzimas de restricción que cortan aproximadamente cada 4000 kilobases (kb) en el genoma bacteriano a manera de obtener

fragmentos de 4 kb. Esto fue calculado a partir de una estimación de el tamaño de genoma de la bacteria *Serratia marcescens* (No. de accesoión PRJNA59561) (NCBI, 2012) y la estimación del tamaño del gen de resistencia al glifosato en una bacteria el cual es de 2 kb (NCBI, 2010), a manera que el gen quede dentro de esos fragmentos. La restricción se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante de cada una de las enzimas, en un volúmen total de reacción de 80 μ L. Las enzimas a utilizadas fueron: Hind III (New England Biolab, R0104S y PstI (New England Biolab, R0140S). La digestión realizada con las enzimas PstI y Hnd III fue una digestión parcial del ADN. Para esto se realizó la digestión siguiendo las especificaciones del fabricante pero incubando a 30, 60, 90 y 120 minutos a 37° C en una incubadora marca Lab-line, modelo Imperial III (New England Biolab, R0140S y R0140S). Luego se visualizaron los productos de la digestión por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en TBE, corrido en solución tampón TBE por 4 horas a 100 V/cm. El gel fue teñido con tinción Gel Red por 40 minutos y visualizado con cámara de luz UV, como se mencionó con anterioridad (Biotium, 41003),.

El plásmido fue digerido con cada una de las enzimas (la misma enzima utilizada para digerir parcialmente el ADN genómico a manera de producir extremos cohesivos para la ligación) en el “Multi Cloning Site” (MCS) a manera que los fragmentos de ADN genómico cortados de las bacterias resistentes se pudieran ligar a ese sitio para formar una biblioteca genómica de cada una de las bacterias. La restricción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de cada una de las enzimas de restricción mencionadas anteriormente (PstI y Hind III), en un volúmen total de reacción de 80 μ L, incubando a 37° C. Se siguió el protocolo indicado por el fabricante (New England Biolab, R0140S y R0140S) (en colaboración con Claudia Paiz). El producto de la reacción se visualizó por medio de electroforesis, en gel de agarosa al 0.8% en solución tampón TBE, corrido también en TBE a 90 voltios por 50 minutos. El gel fue teñido por tinción Gel Red durante 40 minutos y luego visualizado en cámara UV, como se mencionó con anterioridad (Biotium, 41003),

También el plásmido fue tratado con la enzima fosfatasa antártica (New England Biolab, M02988) para eliminar los fosfatos de los extremos del plásmido e impedir que éste se pudiera volver a ligar consigo mismo. Para esto se realizó la digestión siguiendo las indicaciones del fabricante de la enzima en un volumen de reacción de 80 μ L (New England Biolab, M02988) (en colaboración con Claudia Paiz).

e. Purificación de la digestión parcial de ADN genómico y de la digestión de pUC19. Para la purificación de ADN genómico digerido y de pUC19 se agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 a cada uno de los tubos de reacción. Luego se agregaron 2.5 volúmenes de etanol al 100%, las muestras se agitaron y el ADN se dejó precipitando a -20° C por 24 horas. Luego, las muestras se centrifugaron 20 minutos a 12,000 g (Accuspin micro 17R, Fischer) a 4° C, se agregó 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugaron 10 minutos a 12,000 g (Accuspin micro 17R, Fischer) a 4° C. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado a temperatura ambiente por 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 25 μ L de solución tampón TE (Sambrook *et al.* 2001). La cuantificación de esta precipitación se realizó por medio de espectrofotometría, se realizó una dilución 1:10 de ADN con agua destilada y ultrapura, se realizaron lecturas a 260, 280 y 320 nm, calculando así la concentración del ADN, como se mencionó anteriormente (Apéndice, cuadro 17).

f. Ligación de los fragmentos al plásmido PUC19. Los fragmentos de ADN genómico se ligaron al plásmido PUC19 por medio de la enzima T4 ligasa de ADN (New England Biolabs, M0202S, EEUU). Se siguieron las instrucciones del fabricante, en un volumen total de reacción de 10 μ L, se modificó el protocolo incubando a temperatura ambiente durante 24 horas y luego se realizó la inactivación de la enzima según el fabricante. Se intentó ligar en varias proporciones vector:inserto a manera de determinar cuál era la mejor proporción para la transformación. Las proporciones vector:inserto utilizadas fueron 1:5, 1:2, 1:1 y 1:0.5 (New England Biolabs sin año).

g. Transformación de células *E.coli* DH5 α , selección y tamizaje de las células transformadas. El producto de la ligación fue introducido en bacterias *E.coli* DH5 α por medio de una transformación. La transformación se realizó utilizando el kit MAX Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells (Invitrogen, 18258-012, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células del kit han sido preparadas para ser competentes por medio del procedimiento de Hanahan. (Invitrogen, 18258-012, EEUU). El protocolo del kit se basa en el método de transformación por choque térmico. Se agregaron 40 μ L de agua a la reacción de ligación para diluir 5 veces. Se realizaron los cálculos para determinar que el ADN se encontrara en una concentración en el rango de 1-10 ng/ μ L. Luego se tomaron 50 μ L de células competentes y se agregó 1 μ L de la dilución de la reacción de ligación, se incubó en hielo por 30 minutos, luego se realizó el choque térmico 45 segundos a 42° C (Precision, 180 Series Water Bath) y luego se incubó de nuevo 2 minutos en hielo. Se agregaron 250 μ L de medio SOC (provisto por el kit) y se incubó 1 hora a 37° C con agitación a 2500 rpm (Sambrook *et al.* 2001).

Para cultivar las bacterias transformadas en placa también se siguieron las indicaciones del kit MAX Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells (Invitrogen, 18258-012, EEUU). Todos los crecimientos bacterianos se realizaron a 37° C.

El tamizaje se realizó inoculando 25 μ L del cultivo en 12 placas con Xgal (50 μ g/mL) y ampicilina (50 μ g/mL) a manera de poder distinguir las colonias que poseen inserto, las cuales aparecerán con una coloración blanca ya que el gen de la betalactamasa (*lacZ*), que se encuentra en el plásmido pUC19, se encuentra interrumpido. Las colonias con coloración azul, son colonias que no poseen inserto ya que el gen de la betalactamasa (*lacZ*) se encuentra intacto. Las placas poseían ampicilina para asegurar que crecieran únicamente las bacterias que poseían el plásmido pUC19, por lo tanto resistencia a ampicilina (Grooms 2009).

La selección se realizó, inoculando 100 μ L del cultivo en placas con tetraciclina 1.2 μ M a manera de seleccionar únicamente las bacterias que tuvieran como inserto en pUC19 el gen de la resistencia a tetraciclina clonado. En el caso de la biblioteca genómica

para aislar el gen de resistencia a glifosato, se inocularon 100 μ L de cultivo en placas con 50 mM de glifosato (Roundup, 35.6 SL) y luego se ajustó la concentración de glifosato y se inocularon placas 25 mM de glifosato. Esto a manera de seleccionar únicamente las bacterias que tuvieran el gen de resistencia al glifosato clonado (Stein M, curso de Ingeniería Genética). Se sembró toda la reacción de transformación en las placas, a manera de no dejar ningún clon sin ser inoculado. A continuación se muestra un cuadro resumiendo los cultivos bacterianos realizados:

Cuadro 2 Cultivos bacterianos realizados y resultados esperados.

Bacteria	Plásmido	Cultivo en placa	Resultado esperado
<i>E.coli</i> DH5 α	pUC19	Placas con ampicilina y Xgal	Colonias azules
<i>E.coli</i> DH5 α	pUC19 + inserto	Placas con ampicilina y Xgal	Colonias blancas
<i>E.coli</i> DH5 α	pUC19 + inserto tet o inserto glifosato	Placas con tetraciclina o placas con glifosato	Colonias

En el caso del tamizaje, para determinar la cobertura del genoma ligado a pUC19 y transformado en células DH5 α se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de individuos a tamizar} = \ln(1-P) / \ln(1-a/b)$$

Donde:

a = el tamaño promedio de los fragmentos de ADN que se desean clonar

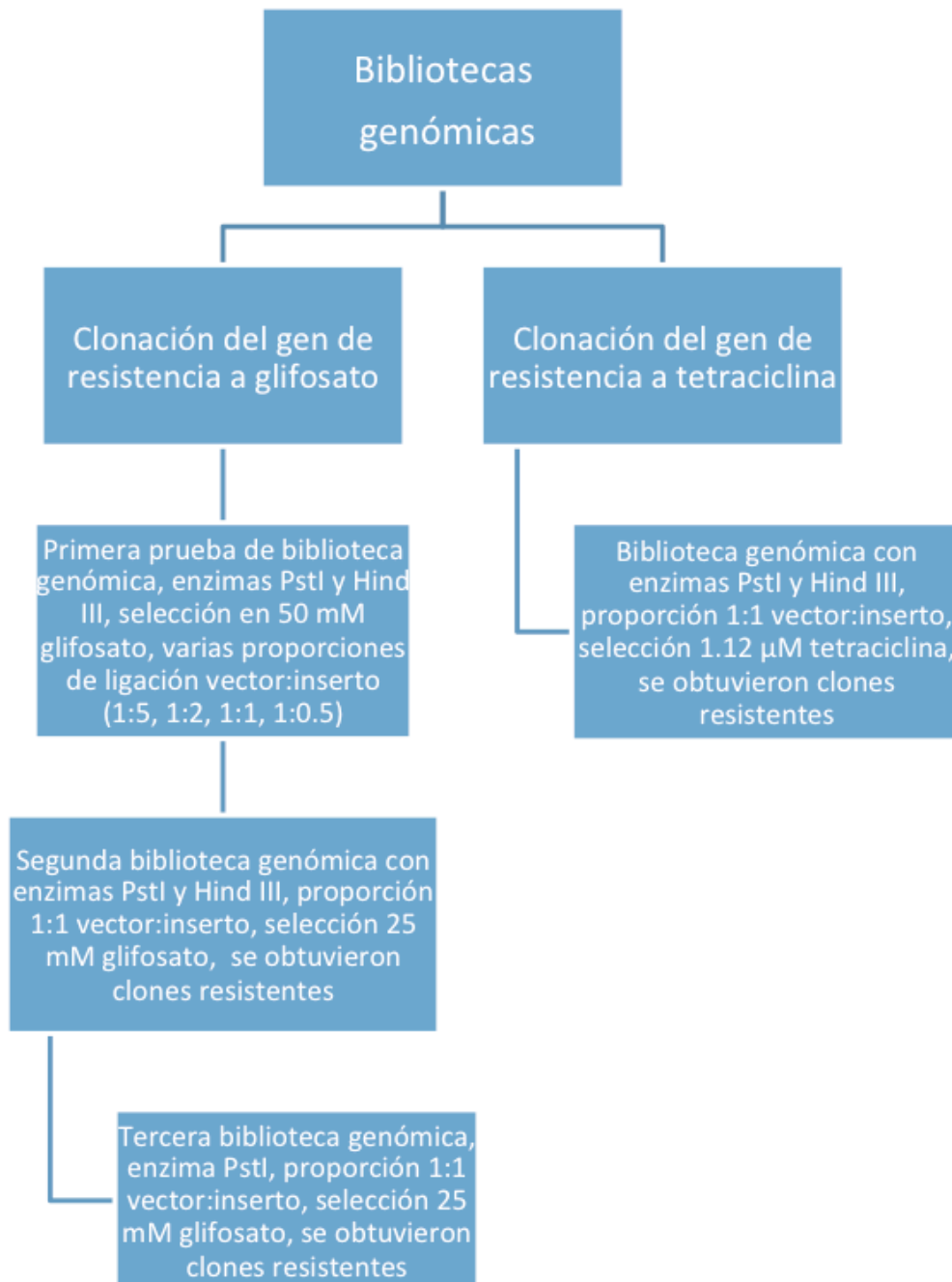
b = es tamaño del genoma

P=probabilidad de encontrar el gen (cobertura del genoma)

(Nicoll 2008)

A continuación se muestra el diagrama resumiendo las bibliotecas genómicas realizadas:

Figura 9. Bibliotecas genómicas realizadas.



h. Confirmación de la resistencia al glifosato y tetraciclina de las bacterias transformadas. Se caracterizaron las bacterias transformadas que presentaron resistencia al glifosato, las cuales fueron nombradas glifo1 y glifo2 y se compararon las curvas de crecimiento de glifosato a manera de determinar si se ha clonado uno de los elementos que proveen resistencia (ya sea un fragmento del gen, uno de los genes que confiere resistencia, etc) o el elemento completo (gen completo). Como controles se utilizaron *E.coli* DH5 α y la muestra de campo inicial (*Serratia marcescens*).

En caso de las bacterias resistentes a tetraciclina, las cuales fueron nombradas tet1 y tet2, se confirmó la resistencia realizando una re-siembra de los clones en placas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetraciclina e incubando 24 horas a 37° C. En el caso de las bacterias resistentes a glifosato, se confirmó la resistencia realizando una re-siembra de los clones en placas con 25, 50 y 75 mM de glifosato (Richter 2011).

Para realizar las curvas de crecimiento de glifosato en placa se tomó una colonia de cada una de las muestras y cada una se inoculó en 3 mL de caldo nutritivo toda la noche a 37° C con agitación a 25 rpm. Luego de la incubación, se tomaron 5 μL de las muestras incubadas y se inocularon en 3 mL de caldo nutritivo a 37° C con agitación, hasta que la densidad óptica del cultivo a 600 nm fuera de 0.01 A. Se realizó una dilución 1/100 de este cultivo y se inocularon 5 μL de cada bacteria en cada placa. Las concentraciones de glifosato utilizadas para preparar la curva en placa fueron de [0], [0.5], [1], [5], [10], [25], [50] [75], [80], [90] y [100] mM. Estas placas fueron incubadas 48 horas a 37° C para *E.coli* DH5 α y los clones. Las placas con muestra inicial, *Serratia marcescens*, se incubaron a 30° C (Blue M, Electric Company). Luego se realizaron los conteos de colonias en cada una de las placas para generar las curvas de crecimiento. Todas las curvas se realizaron en triplicado (Richter 2011)

i. Extracción del plásmido que contiene el elemento (gen) que confiere la resistencia. Para extraer el plásmido que contiene el gen de resistencia a tetraciclina y resistencia a glifosato se utilizó el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit

(Invitrogen, K2100-10, EEUU), en su modalidad de extracción por medio de centrifugación. El kit utiliza lisis alcalina y con SDS. El lisado luego se coloca en una columna con membrana de sílica que une selectivamente el ADN plasmidial. Los contaminantes se remueven con soluciones tampón de lavado y el ADN plasmidial se eluye en solución tampón TE. Se siguieron las instrucciones del fabricante, se inició con 1.5 mL de cultivo ON de los clones resistentes a tetraciclina y resistentes a glifosato. El ADN plasmidial fue visualizado por medio de electroforesis, en un gel de agarosa al 0.8% en TBE corrido también en TBE a 90 V/cm por 40 minutos. El gel se tiñó con tinción Gel Red durante 40 minutos y luego se visualizó en una cámara con luz UV, como se mencionó anteriormente.

j. Secuenciación del fragmento de interés por medio de cebadores M13. Los plásmidos con inserto del gen de resistencia a tetraciclina y el gen de resistencia a glifosato fueron secuenciados utilizando cebadores M13. Estos cebadores se utilizan en la secuenciación de insertos en el MCS ya que se unen a la región *lacZ* del pUC19. Se extrajo ADN plasmidial del control y la muestra.

Los insertos clonados en el vector pUC19 fueron secuenciados por la empresa Magrogen, en Corea. Esta secuenciación se lleva a cabo por medio del sistema BigDye Terminator y los datos se analizan por el secuenciador automático 3730xl de Applied Biosystems. Como se mencionó anteriormente, para secuenciar se utilizaron los cebadores M13 iniciador y reverso a manera de amplificar todo lo insertado en el sitio de múltiple clonamiento del vector pUC19.

A partir de estos resultados, se comparó la secuencia de los insertos con las secuencias reportadas en la base de datos GENBANK por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El programa BLAST es una herramienta de alineación en la cual se pueden introducir secuencias de genes y alinearlas, esta herramienta determina la homología entre genes y comparación de nuevas secuencias con las que ya han sido previamente caracterizadas. De esta manera se puede asignar una identidad a los insertos.

2. Aislamiento del gen de resistencia al glifosato por el método de cebadores degenerados.

a. Diseño de cebadores degenerados para la amplificación del gen de resistencia al glifosato. Utilizando la herramienta “GenBank” (National Center for Biotechnology Information, 2011) se tomaron secuencias de genes de la enzima EPSPS de bacterias de diferentes tipos y grupos, tanto Gram negativas como Gram positivas, bacterias aisladas de muestras de suelos, bacterias aisladas de muestras clínicas, etc (Apéndice G). Utilizando la herramienta “Clustal W2” (European Bioinformatics Institute, 2011) se alineó la secuencia de todos los genes EPSPS. No se logró una alineación ya que la secuencia de los genes difería mucho entre sí, por lo que se realizó un árbol filogenético de estos mismos genes utilizando la misma herramienta “Clustal W2”. Con el árbol filogenético (Apéndice, Figura 48), se agruparon los genes y se tomó el grupo de genes que pertenecía al grupo de bacterias Enterobacterias. Esto debido a que la muestra en la cual se quería amplificar el gen EPSPS pertenece a este grupo (la muestra es una *Serratia marcescens*). Las secuencias del grupo de genes que pertenecía a las Enterobacterias se introdujeron una vez más al programa “Clustal W2”, en el cuál se realizó la alineación de la secuencia de los genes (Apéndice, Figura 49). Con esta alineación se buscaron sitios conservados al inicio y al final de la alineación para poder diseñar los cebadores. Para facilitar el diseño y determinar de mejor manera los sitios conservados, las secuencias de genes fueron transformadas a secuencias de aminoácidos y alineadas (Apéndice, Figura 50). A partir de esta secuencia de aminoácidos, se diseñó el cebador delantero utilizando el lenguaje de cebadores degenerados, a mano, en un sitio conservado al inicio de los genes, de la base 77 a la base 98 (Apéndice, Figura 49). El cebador reverso se diseñó utilizando la secuencia de bases nitrogenadas de los genes, ya que con la secuencia de aminoácidos se tuvo problemas encontrando el sitio conservado al final de los genes. El cebador reverso también fue diseñado a mano, utilizando el lenguaje de cebadores degenerados, se une a la base 1167 a la base 1190 (Apéndice, Figura 49) (Dardón 2011) (en colaboración con Elena Dardón).

Para determinar la calidad de los cebadores, se utilizó el programa “CLC Sequence Viewer” versión 6.6.2. Los cebadores se introdujeron al programa y con esto se determinó la calidad del cebador, la complejidad lingüística, la temperatura de hibridación (Apéndice, cuadro 26) (Dardón 2011) (en colaboración con Elena Dardón). Los cebadores fueron fabricados por la compañía “Integrated Device Techonolgy”.

b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores degenerados para la amplificación del gen de resistencia al glifosato. Los cebadores fueron resuspendidos en agua desmineralizada y desionizada a una concentración de 100 μM a manera de preparar una solución “stock”. Se prepararon alícuotas de trabajo a 10 μM . Utilizando la herramienta “Oligo calculator” se determinaron las temperaturas de hibridación de los cebadores. Las secuencias de los cebadores se ingresaron en “Oligo calculator” versión 3.26, el cual proporcionó un rango de temperaturas adecuadas y con esto se escogió al azar la temperatura de hibridización, la cuál fue de 60° C (en colaboración con Claudia Paiz).

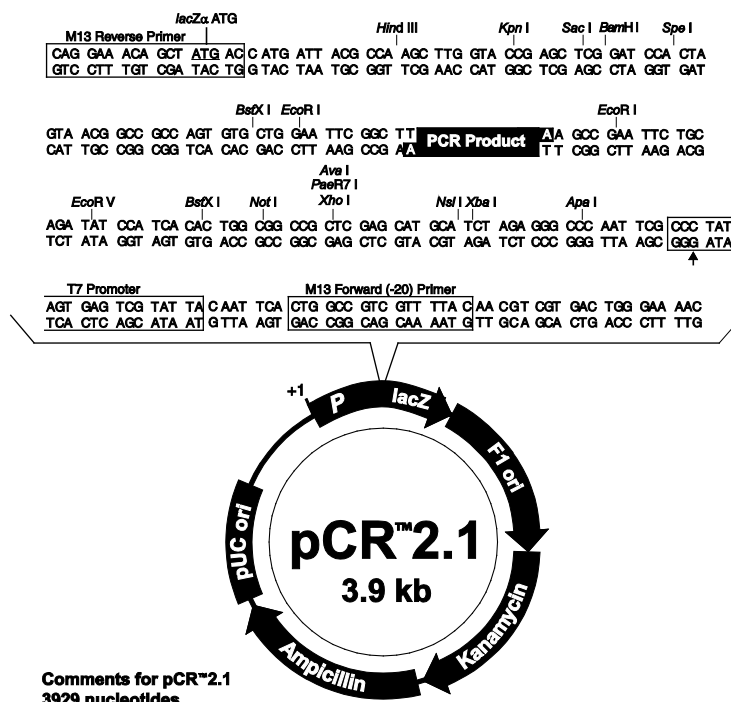
El ADN genómico utilizado en la PCR fue el extraído con anterioridad de la muestra (Ver materiales y métodos, sección 1, artículo a), La receta de la PCR se realizó en base a la receta que aparecía en el kit de PCR (Invitrogen, 18038-018) utilizado. La mezcla de reacción de 25 μL , contenía 2.5 μL de solución tampón 10X (10X PCR Buffer –Mg), 0.5 μL de mezcla de dDNTTP 10 mM (10 mM dDNTTP mix), 0.75 μL de MgCl_2 50 mM, 1.25 μL de cebador de inicio a 10 μM , 1.25 μL de cebador reverso a 10 μM , 1.0 μL de Taq 5U/ μL , 0.5 μL de ADN genómico de la muestra en dilución 1/10 a manera de tener aproximadamente 10 ng de ADN en la reacción y 17.25 μL de agua. El programa utilizado en el termociclador, marca Apollo modelo ATC 201, fue el titulado “Glifosato” el cual inicia con un ciclo de 3 minutos de incubación a 94° C, 30 ciclos de 45 segundos con incubación a 94° C, 30 segundos con incubación a 60° C y 2 minutos de incubación a 72° C, por último un ciclo de 10 minutos de incubación a 72° C (Invitrogen, 18038-018). Para visualizar el producto de la amplificación se realizó una electroforesis en un gel 1.2% de agarosa en solución tampón TBE, separado en solución tampón TBE durante 40 minutos a 100 V/cm. El gel fue teñido con tinción Gel Red durante 40 minutos y luego

visualizado en cámara UV, como se realizó con anterioridad (en colaboración con Claudia Paiz).

A manera de optimizar la PCR se realizó un segundo intento, variando la cantidad de Taq, la cantidad de ADN genómico y los ciclos del programa del termociclador. El ADN genómico utilizado en la PCR fue el extraído con anterioridad de la muestra (Ver materiales y métodos, sección 1, artículo a), La receta de la PCR se realizó en base a la receta que aparecía en el kit de PCR (Invitrogen, 18038-018) utilizado, modificando la concentración de Taq y la concentración de ADN agregados. La mezcla de reacción de 25 μL , contenía 2.5 μL de solución tampón 10X (10X PCR Buffer –Mg), 0.5 μL de mezcla de dNTP 10 mM (10 mM dNTP mix), 0.75 μL de MgCl_2 50 mM, 1.25 μL de cebador de inicio a 10 μM , 1.25 μL de cebador reverso a 10 μM , 0.5 μL de Taq 5U/ μL , 1.0 μL de ADN genómico de la muestra en dilución 1/5 a manera de tener aproximadamente 10 ng de ADN en la reacción y 17.25 μL de agua. El programa utilizado en el termociclador fue el titulado “Glifosato” el cual se modificó para que iniciara con un ciclo de 3 minutos de incubación a 94° C, 35 ciclos de 45 segundos con incubación a 94° C, 30 segundos con incubación a 60° C y 2 minutos de incubación a 72° C, por último un ciclo de 10 minutos de incubación a 72° C (Invitrogen, 18038-018). Para visualizar el producto de la amplificación se realizó una electroforesis en un gel 0.8% de agarosa en solución tampón TBE, corrido en solución tampón TBE durante 40 minutos a 100 V. El gel fue teñido con tinción Gel Red durante 40 minutos y luego visualizado en cámara UV, como se mencionó anteriormente.

c. Ligación del producto de PCR al vector PCR 2.1. Para la clonación del producto de PCR se utilizó el kit TA Cloning[®] Kit with One Shot[®] INV α F' Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen, K2000-01, EEUU). El kit se compone del vector pCR 2.1 linearizado, solución tampón PCR 10X, solución tampón 10x ligación, 50 mM dNTPs, T4 ADN ligasa, agua estéril, cebadores control, ADN control, medio SOC, células INV α F' competentes y ADN de pUC19 como control. Este kit provee una estrategia de clonación somple para directamente insertar productos de PCR a un vector plasmidial.

Figura 10. Plásmido pCR 2.1



(Fuente: Invitrogen K2000-01, EEUU)

Se utilizó el producto de PCR producido el mismo día, los componentes de kit y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se agregaron 1.6 μL de producto de PCR fresco, 1 μL de 10X solución tampón de ligación, 2 μL del vector pCR 2.1 (25 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 4.4 μL de agua y 1 μL de la T4 ADN ligasa, para un volumen de reacción total de 10 μL . La reacción se incubó ON a 14° C en el termociclador, marca Apollo modelo ATC 201 (en colaboración con Claudia Paiz).

d. Transformación de células *E.coli* DH5 α , selección y tamizaje de las células transformadas. El producto de la ligación fue introducido en bacterias *E.coli* DH5 α por medio de una transformación. La transformación se realizó utilizando el kit MAX Efficiency® DH5 α ™ Competent Cells (Invitrogen, 18258-012, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células del kit han sido preparadas para ser

competentes por medio del procedimiento de Hanahan. (Invitrogen, 18258-012, EEUU). El protocolo del kit se basa en el método de transformación por choque térmico. Se tomaron 50 μL de células competentes y se agregaron 2 μL de la reacción de ligación, se incubó en hielo por 30 minutos, luego se realizó el choque térmico 45 segundos a 42° C (Precision, 180 Series Water Bath) y luego se incubó de nuevo 2 minutos en hielo. Se agregaron 250 μL de medio SOC (provisto por el kit) y se incubó 1 hora a 37° C con agitación a 25 rpm (Sambrook *et al.* 2001) (en colaboración con Claudia Paiz).

Para cultivar las bacterias transformadas en placa también se siguieron las indicaciones del kit MAX Efficiency[®] DH5 α^{TM} Competent Cells (Invitrogen, 18258-012, EEUU). Todos los crecimientos bacterianos se realizaron a 37° C (en colaboración con Claudia Paiz).

El tamizaje se realizó inoculando 25 μL del cultivo en 6 placas con Xgal (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y kanamicina (0.103 μM) a manera de poder distinguir las colonias que poseen inserto, las cuales aparecerán con una coloración blanca ya que el gen de la betalactamasa (*lacZ*), que se encuentra en el plásmido pUC19, se encuentra interrumpido. Las colonias con coloración azul, son colonias que no poseen inserto ya que el gen de la betalactamasa (*lacZ*) se encuentra intacto. Las placas poseían kanamicina para asegurar que crecieran únicamente las bacterias que poseían el plásmido pUC19, por lo tanto resistencia a kanamicina (Grooms 2009) (en colaboración con Claudia Paiz).

La selección se realizó, tomando las colonias blancas de la transformación y sembrándolas en glifosato 25 mM a manera de intentar aislar únicamente las que tuvieran el inserto que confiere resistencia a glifosato. No hubo ningún crecimiento por lo que se aislaron únicamente las colonias blancas en kanamicina y Xgal de nuevo a manera de determinar si realmente poseían inserto. Las colonias con inserto fueron aisladas una vez más en medio LB con kanamicina 0.103 μM y luego se procedió a extraer el plásmido de las mismas (en colaboración con Claudia Paiz).

e. Extracción del plásmido con inserto. Para extraer el plásmido con inserto se utilizó el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, K2100-10, EEUU), en su modalidad de extracción por medio de centrifugación, como se mencionó anteriormente y se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa, también como se mencionó anteriormente. (en colaboración con Claudia Paiz).

f. Secuenciación del fragmento de interés por medio de cebadores M13. Los insertos fueron secuenciados utilizando cebadores M13. Estos cebadores se utilizan en la secuenciación de insertos en el MCS ya que se unen a la región *lacZ* del pUC19.

Los insertos clonados en el vector pUC19 fueron secuenciados por la empresa Magrogen, en Corea. Esta secuenciación se lleva a cabo por medio del sistema BigDye Terminator y los datos se analizan por el secuenciador automático 3730xl de Applied Biosystems. Como se mencionó anteriormente, para secuenciar se utilizaron los cebadores M13 iniciador y reverso a manera de amplificar todo lo insertado en el sitio de multiple clonamiento del vector pUC19.

A partir de estos resultados, se comparó la secuencia de los insertos con las secuencias reportadas en la base de datos GENBANK por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El programa BLAST es una herramienta de alineación en la cual se pueden introducir secuencias de genes y alinearlas, esta herramienta determina la homología entre genes y comparación de nuevas secuencias con las que ya han sido previamente caracterizadas. De esta manera se puede asignar una identidad a los insertos.

B. Diseño experimental

1. Enfoque y diseño de la investigación. Este estudio posee un diseño experimental de tipo pre experimento debido a que las muestras son no aleatorias y de enfoque cualitativo.

2. Tipo y número de muestra. Las muestras bacterianas a utilizar son no probabilísticas debido a que éstas han sido escogidas por conveniencia ya que, ya han sido caracterizadas y ya se ha confirmado que poseen resistencia al glifosato. Para obtener estas muestras se realizó un muestreo de suelos en la finca de piña de Agropecuaria Popoyán ubicada en el kilómetro 101 carretera a Mazatenango, el pasado Julio del 2010. A partir de estas muestras se lograron aislar seis cepas bacterianas diferentes que presentan resistencia al glifosato. Estas bacterias han crecido a una concentración mínima de 70 milimolar (mM) y es por esto que se consideran resistentes al glifosato (Richter, 2011). Estas bacterias ya han sido caracterizadas tanto física, morfológica y molecularmente por medio del gen ARNr 16s (Richter 2011). Para los propósitos de este estudio se utilizarán únicamente una de las cuatro cepas bacterianas ya que su caracterización y curvas de crecimiento en glifosato han determinado que es la más adecuada a utilizar por su facilidad de manipulación. Puesto que es la cepa que ha crecido a mayores concentraciones de glifosato también presenta una mayor resistencia que las demás (Richter 2011).

Cabe mencionar que, se utilizará únicamente una cepa como muestra ya que al secuenciar el resto de las cepas resistentes a glifosato se determinó que todas las cepas pertenecen a la misma especie bacteriana, *Serratia marcescens* (Richter, 2011). Se escogió la cepa que mejor comportamiento mostró al realizar las curvas de crecimiento en glifosato y la que presentó mayor resistencia al mismo. Que el estudio presente resultados positivos, no depende del número de muestras que presenten resultados positivos. Se necesita únicamente un gen novedoso de resistencia al glifosato para considerar los resultados como positivos.

3. Controles. Como control de la clonación, se realizó la clonación del gen de tetraciclina de *Serratia marcescens* utilizando los métodos de biblioteca genómica. Como controles de las curvas de crecimiento para la confirmación de la resistencia al glifosato de los clones, se utilizó la bacteria *E.coli* DH5 α y la muestra original *Serratia marcescens*. *E.coli* DH5 α se utilizó a manera de comparar una bacteria que no posee resistencia al glifosato y que no posee el plásmido con el inserto que confiere resistencia,

con los clones que sí poseen el inserto que confiere resistencia. *Serratia marcescens* se utilizó a manera de comparar la cepa original con resistencia al glifosato con las cepas clonadas que contienen el inserto que confiere resistencia.

4. Análisis de resultados

a. Análisis de la cobertura del genoma. Para determinar la probabilidad de cobertura del genoma en la muestra en la biblioteca genómica, se utilizó la fórmula: $\text{Número de individuos a tamizar} = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-a/b)}$, despejando para el valor P, el cual es el porcentaje de cobertura del genoma con respecto al número de clones que se tamizaron (Nicoll 2008)

b. Análisis estadístico. Se utilizó el programa estadístico SPSS (Statistical Package of the Social Sciences)® versión 12 y la hoja de cálculo Microsoft Excel. La hoja de cálculo Excel se utilizó para calcular la desviación estándar a manera de determinar la reproducibilidad del fenotipo y un análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés). El análisis de MIC se lleva a cabo para determinar la susceptibilidad de ciertos organismos ante distintos agentes, en este caso el glifosato y realizar comparaciones de susceptibilidad dentro de diferentes organismos. El programa SPSS se utilizó para estimar la supervivencia acumulada por medio del método de Kaplan-Meier. Este es un método no paramétrico que supone una distribución no normal de los datos. Utilizando este método se calculó un valor MIC y un valor de significancia p, el cual si es menor o igual a 0.05 indica que la muestra que está siendo p, comparada con el control, pertenece a un grupo diferente del mismo. Si el valor p es mayor a 0.05, la muestra y el control pertenecen al mismo grupo (Chan 2004).

c. Análisis de la secuencia de los clones. Se utilizó el programa DNA Baser, versión 3.5.3, para ensamblar contigs derivados de las secuencias de los insertos clonados. La secuencia de consenso fue analizada por medio del programa BLAST para identificar similitud con otras secuencias reportadas.

III. RESULTADOS

A. Aislamiento del gen de resistencia al glifosato y a la tetraciclina por el método de biblioteca genómica.

Cuadro 3. Cuantificación de ADN extraído por primera vez con kit.

En el cuadro se muestran las diferentes modificaciones que se intentaron con el kit de extracción de ADN genómico, a manera de optimizarlo

Muestra y cantidad de cultivo para iniciar la extracción	260 nm	280 nm	320 nm	Concentración (µg/mL)	Pureza
Primera prueba					
750 µL del ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.135	0.086	0.027	67.95	1.56
750 µL del ON de la Mx	0.115	0.61	0.004	55.75	1.88
7050 µL de la dilución 1/10 del ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	-0.006	-0.006	-0.004	0	0
750 µL de la dilución 1/10 del ON de la Mx	-0.015	-0.018	-0.02	0	0
Segunda prueba					
0.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue sin lavar precipitado	0.029	0.028	0.023	14.6	1.01
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue sin lavar precipitado	2.195	2.331	2.214	1097.6	0.94
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue lavando precipitado	0.016	0.016	0.009	8.4	1.04
0.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue sin lavar precipitado	0.143	0.138	0.136	71.9	1.03
0.5 mL de ON de Mx sin lavar precipitado	0.048	0.035	0.018	24.25	1.37
1 mL de ON de Mx sin lavar precipitado	0.056	0.033	0.002	28.25	1.6
0.5 mL de ON Mx lavando precipitado	0.058	0.040	0.016	29.25	1.4
0.5 mL de ON Mx lavando precipitado	0.221	0.173	0.107	110.6	1.3
Tercera prueba					
1 mL de ON de <i>Agrobacterium</i>	0.021	0.017	0.009	10.85	0.52
1 mL de ON de <i>Agrobacterium</i>	-0.016	-0.017	-0.020	-8.2	0.947
1.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	3.166	2.862	2.868	1583.2	1.106
1.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	2.426	2.364	2.042	1213.05	1.026
0.75 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.098	0.060	-0.013	49.1	1.631
0.75 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.123	0.058	-0.019	61.6	2.098
1.5 mL de ON de Mx	2.4675	2.4242	2.0176	1233.75	1.017

Continuación Cuadro 3.

1.5 mL de ON de Mx	0.1752	0.0882	-0.013	87.6	1.986
0.75 mL de ON de Mx	3.1664	2.5332	2.2133	1583.2	1.249
0.75 mL de ON de Mx	2.3883	2.1957	2.1356	1194.15	1.087

Cuadro 4. Cuantificación de ADN genómico extraído por el método de Trizol.

Muestra y cantidad de cultivo para iniciar la extracción	260	280	320	Concentracion (µg/mL)	Purez a
Primera prueba					
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	2.7	2.99	2.43	1380.05	0.921
	6	4	1		
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.8	0.55	0.01	406.35	1.457
	1	7	8		
1 mL de ON de Mx	0.7	0.54	0.00	399.6	1.454
	9	9	4		
1 mL de ON de Mx	0.4	0.27	0.00	203.4	1.478
	0	5	0		
Segunda prueba					
0.5 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue	0	0	0	0	0
0.5 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue	0	0	0	0	0
0.5 mL de ON de Mx	0	0	0	0	0
0.5 mL de ON de Mx	0	0	0	0	0
Tercera prueba					
0.4 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue	0	0	0	0	0
0.4 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue	0.2	0.07	0.33	138.1	3.573
0.4 mL de ON de Mx	0.1	0.20	0.19	58.25	0.568
0.4 mL de ON de Mx	0.1	0.16	0.25	58.2	0.687
Cuarta prueba					
0.4 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue	0	0	0	0	0
0.4 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue	0	0	0	0	0
0.4 mL de ON de Mx	0	0	0	0	0
0.4 mL de ON de Mx	0	0	0	0	0
0.4 mL de ON de <i>E.coli</i> X11 Blue y resuspensión final del ADN en NaOH	0	0	0	0	0
0.4 mL de ON de Mx y resuspensión final del ADN en NaOH	1.0	-0.1	-0.6	0	0

Cuadro 5. Cuantificación de ADN genómico extraído por el método de Cloroformo:alcohol isoamílico.

Muestra y cantidad de cultivo para iniciar la extracción	260	280	320	Concentracion (µg/mL)	Pureza
Primera prueba					
1.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0	0	0	0	0
1.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0	0	0	0	0
1.5 mL de ON de Mx	0	0	0	0	0
1.5 mL de ON de Mx	0	0	0	0	0
Segunda prueba					
Cloroformo: alcohol isoamílico (1:1)					
1.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	1.171	0.5392	-0.1318	585.5	2.171735905
0.75 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	2.5228	2.4704	-0.0915	1261.4	1.02121114
0.75 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.7924	0.2507	-0.2474	396.2	3.1607499
1.5 mL de ON de Mx	2.3866	3.0895	2.4608	1193.3	0.772487458
0.75 mL de ON de Mx	3.2317	3.4633	2.0206	1615.85	0.933127364
0.75 mL de ON de Mx	2.2775	1.0791	-0.1359	1138.75	2.110555092
Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)					
1.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	2.0556	2.239	1.9017	1027.8	0.918088432
0.75 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	2.0856	1.9369	2.0343	1042.8	1.076772162
0.75 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	2.0275	1.936	2.3313	1013.75	1.047262397
1.5 mL de ON de Mx	2.436	2.7622	0.5922	1218	0.881905727
0.75 mL de ON de Mx	3.2317	2.835	17,993	1615.85	1.139929453
0.75 mL de ON de Mx	0.7279	0.2275	-0.2222	363.95	3.19956044
Tercera prueba					
Cloroformo: alcohol isoamílico (1:1)					
0.50 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0	0	0	0	0
0.25 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.3245	-0.0159	0.0228	162.25	-20.40880503
0.10 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	1.2788	1.2319	-1.5293	639.4	1.038071272
0.50 mL de ON de Mx	0.5006	0.2439	0.0729	250.3	2.052480525
0.25 mL de ON de Mx	0	0	0	0	#DIV/0!
0.10 mL de ON de Mx	1.2788	0.8601	-1.7164	639.4	1.48680386

Cuadro 6. Cuantificación de ADN genómico extraído por el método de kit optimizado.

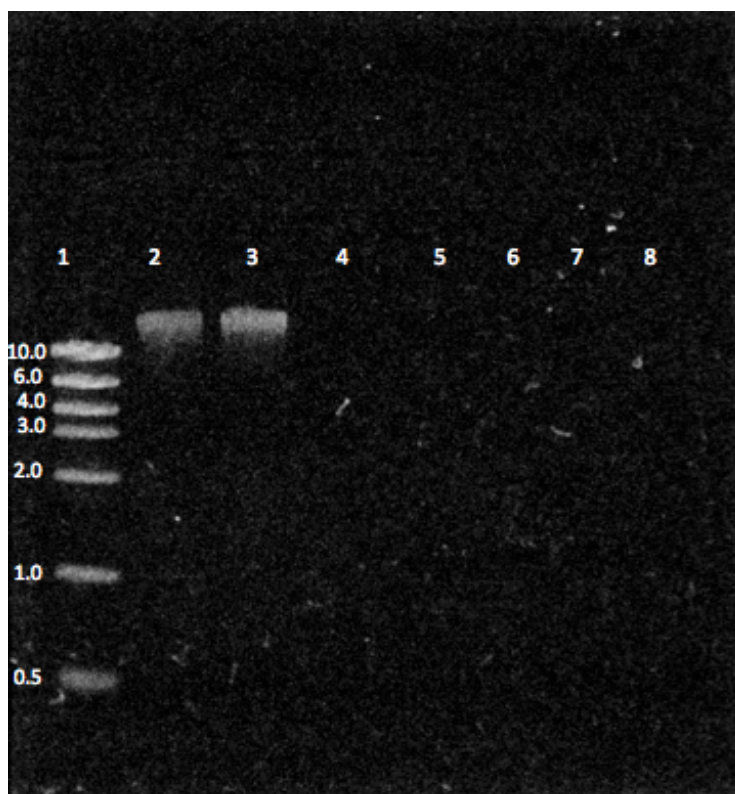
En el cuadro se muestra una primera prueba realizada con el kit con menor concentración de ON para iniciar la extracción. Luego de esto, el kit fue optimizado y la segunda prueba pertenece a las muestras de ADN genómico que fueron utilizadas para todos los experimentos.

Muestra y cantidad de cultivo para iniciar la extracción	260	280	320	Concentracion (µg/mL)	Pureza
Primera prueba					
0.50 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.0792	0.0575	0.0712	39.6	1.377391304
0.50 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.2273	0.294	0.1495	113.65	0.773129252
Segunda lectura	0.0638	0.0334	0.004	31.9	1.910179641
Promedio	0.2911	0.3274	0.1535	145.55	0.889126451
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.2688	0.1995	0.1753	134.4	1.347368421
Segunda lectura	1.2788	0.8601	-1.7164	639.4	1.48680386
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.0741	0.0422	0.0047	37.05	1.755924171
Segunda prueba					
0.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.035	0.026	No medición	136	1.48
0.5 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.05	0.032	No medición	236	1.6
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.035	0.027	No medición	171	1.32
1 mL de ON de <i>E.coli</i> XL1 Blue	0.037	0.026	No medición	153	1.6
0.5 mL de ON de Mx	0.085	0.067	No medición	319	1.41
0.5 mL de ON de Mx	0.083	0.059	No medición	343	1.54
1 mL de ON de Mx3	0.077	0.06	No medición	293	1.43
1 mL de ON de Mx3	0.101	0.065	No medición	458	1.66

Como se mencionó anteriormente, se logró una exitosa extracción de ADN genómico luego de la optimización del kit, en la figura a continuación se muestra la visualización del ADN genómico extraído de la muestra:

Figura 11. ADN genómico extraído con ki de la muestra.

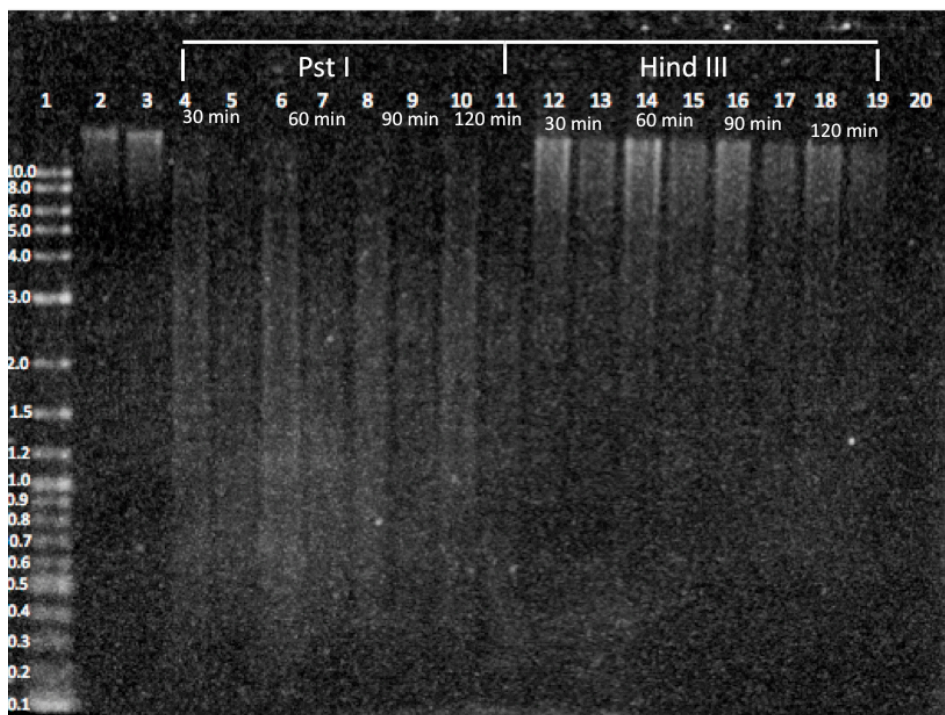
Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue y la muestra. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S), en el pozo 2 se encuentra el ADN genómico extraído de *E.coli*XL1 Blue, en el pozo 3 se encuentra el ADN genómico extraído de la muestra. Los pozos 4 al 8 se encuentran vacíos.



Luego de extraer ADN genómico, el ADN fue digerido por medio de digestión parcial (ver sección Métodos), a continuación se muestra la figura de la digestión parcial:

Figura 12. Digestión parcial del ADN genómico de la muestra con las enzimas PstI y Hind III. Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización de la digestión parcial de ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue y la muestra. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Tridye 2-log DNA ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3270S), en el pozo 2 se encuentra el ADN genómico extraído de *E.coli*XL1

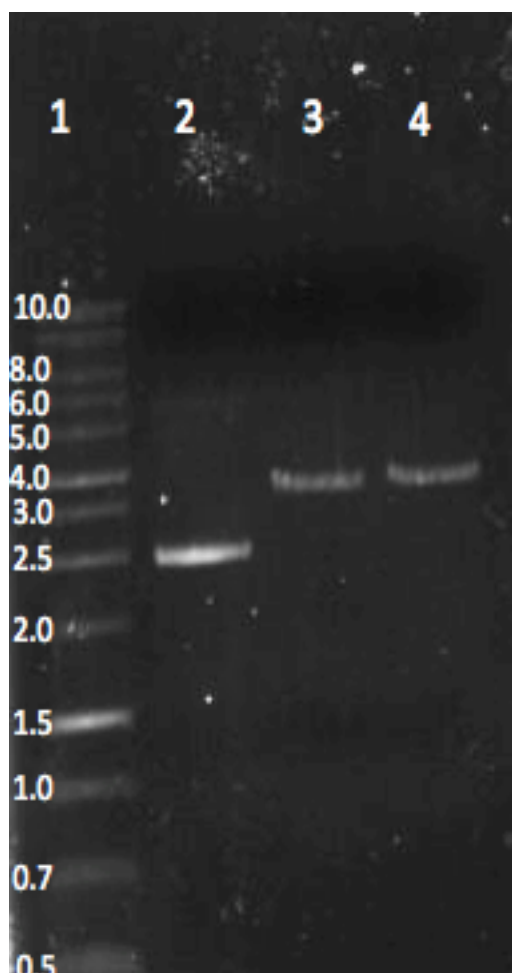
Blue, en el pozo 3 se encuentra el ADN genómico extraído de la muestra. En el pozo 4 se encuentra la digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con PstI por 30 minutos, en el pozo 5, la digestión parcial del ADN genómico de la muestra con PstI por 30 minutos, en el pozo 6, la digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con PstI por 60 minutos, en el pozo 7, la digestión parcial del ADN genómico de la muestra con PstI por 60 minutos, en el pozo 8, la digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con PstI por 90 minutos, en el pozo 9, la digestión parcial del ADN genómico de la muestra con PstI por 90 minutos, en el pozo 10, la digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con PstI por 120 minutos, en el pozo 11, la digestión parcial del ADN genómico de la muestra con PstI por 120 minutos, en el pozo 12, la digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con Hind III por 30 minutos, en el pozo 13, la digestión parcial del ADN genómico de la muestra con Hind III por 30 minutos, el pozo 14, digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con Hind III por 60 minutos, el pozo 15, digestión parcial del ADN genómico de la muestra con Hind III por 60 minutos, el pozo 16, digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con Hind III por 90 minutos, el pozo 17, digestión parcial del ADN genómico de la muestra con Hind III por 90 minutos, el pozo 18, digestión parcial del ADN genómico de *E.coli* XL1 Blue con Hind III por 120 minutos, el pozo 19, digestión parcial del ADN genómico de muestra con Hind III por 120 minutos, el pozo 20 se encuentra vacío.



También se extrajo plásmido pUC19 el cual fue digerido (linearizado) con las enzimas PstI y HindIII a manera de producir extremos cohesivos para la ligación. La visualización de esta digestión se muestra en la figura a continuación:

Figura 13. Plásmido pUC19 sin digerir y digerido con PstI y Hind III

Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización del plásmido pUC19 sin digerir y digerido con PstI y Hind III. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “1 kb DNA ladder” en kilobases (Promega, G5711), en el pozo 2 se encuentra pUC19 sin digerir, en el pozo 3 se encuentra pUC19 digerido con PstI, en el pozo 4 se encuentra pUC19 digerido con Hind III. Los pozos 5 al 8 se encuentran vacíos.



Luego se realizó la ligación de los fragmentos de la digestión al vector pUC19. Para esto se utilizó la digestión realizada por 120 minutos. Se realizó una primera prueba de la ligación utilizando la digestión de el ADN de la muestra con PstI, como se mencionó con anterioridad, se intentaron varias proporciones vector:inserto (ver sección Métodos). Luego de la transformación de la ligación y la incubación de las placas, se determinó observando el mayor número de clones, que la mejor proporción vector:inserto era 1:1. En este caso, no se logró la clonación del gen de resistencia al glifosato.

Se realizó una segunda prueba de la ligación, con proporción 1:1 vector:inserto, ligando el ADN genómico digerido por 120 minutos con las enzimas PstI y Hind III, al pUC19 digerido con las mismas enzimas. Se generó la biblioteca genómica, se realizó el conteo de las colonias blancas y con esto se calculó la cobertura del genoma para ambas enzimas, el cuadro a continuación muestra la cobertura del genoma:

Cuadro 7. Cobertura del genoma de la muestra en las bibliotecas genómicas generadas con las enzimas PstI y Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina utilizando la relación vector:inserto 1:1.

Biblioteca genómica	Cobertura del genoma
Biblioteca genómica generada con PstI	99%
Biblioteca genómica generada con Hind III	24%

^aVer Apéndice C

En este caso, la selección se realizó en tetraciclina, se encontraron dos clones resistentes a tetraciclina creciendo en las placas de tetraciclina 1.12 μ M, a las 72 horas de incubación. Las figuras a continuación muestran los clones, los cuales fueron nombrados Tet1 y Tet2:

Figura 14. Clon resistente a tetraciclina Tet1

Placa de medio LB y tetraciclina 1.12 μ M en donde se puede observar la colonia resistente a tetraciclina clonada, la cuál pertenece a la biblioteca genómica generada con la enzima PstI. El clon fue nombrado Tet1

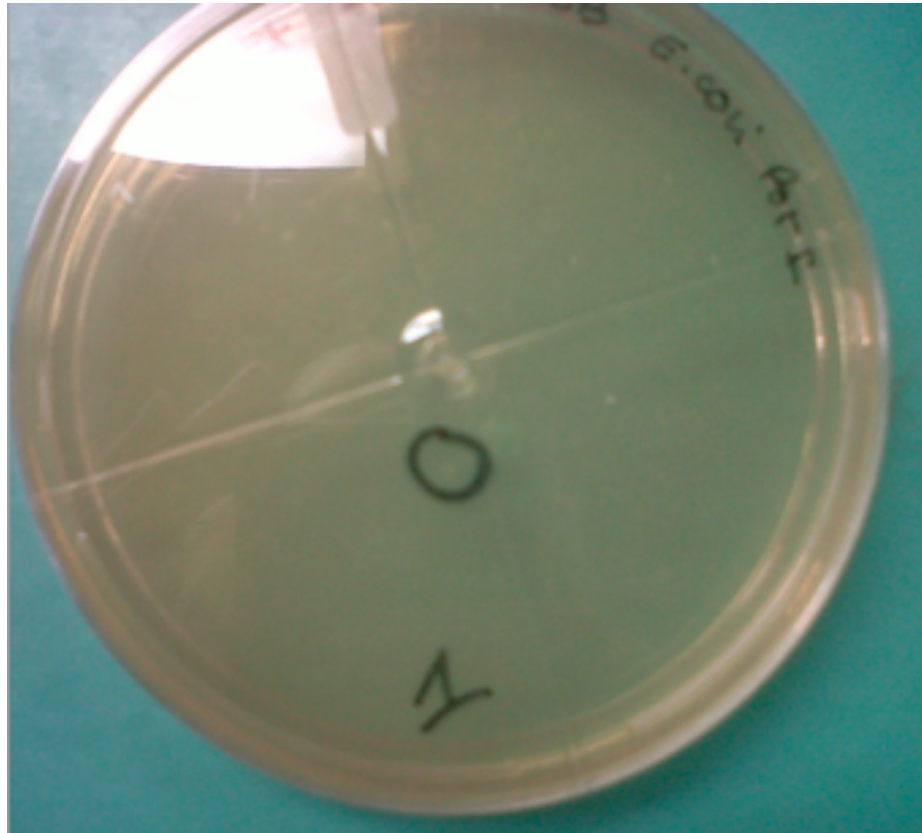
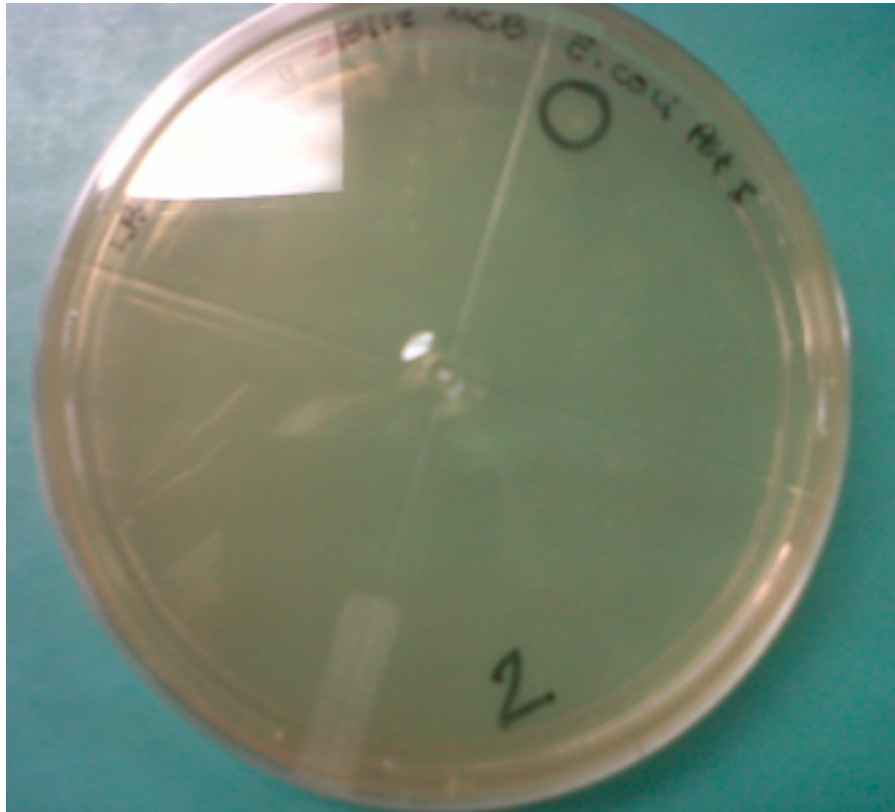


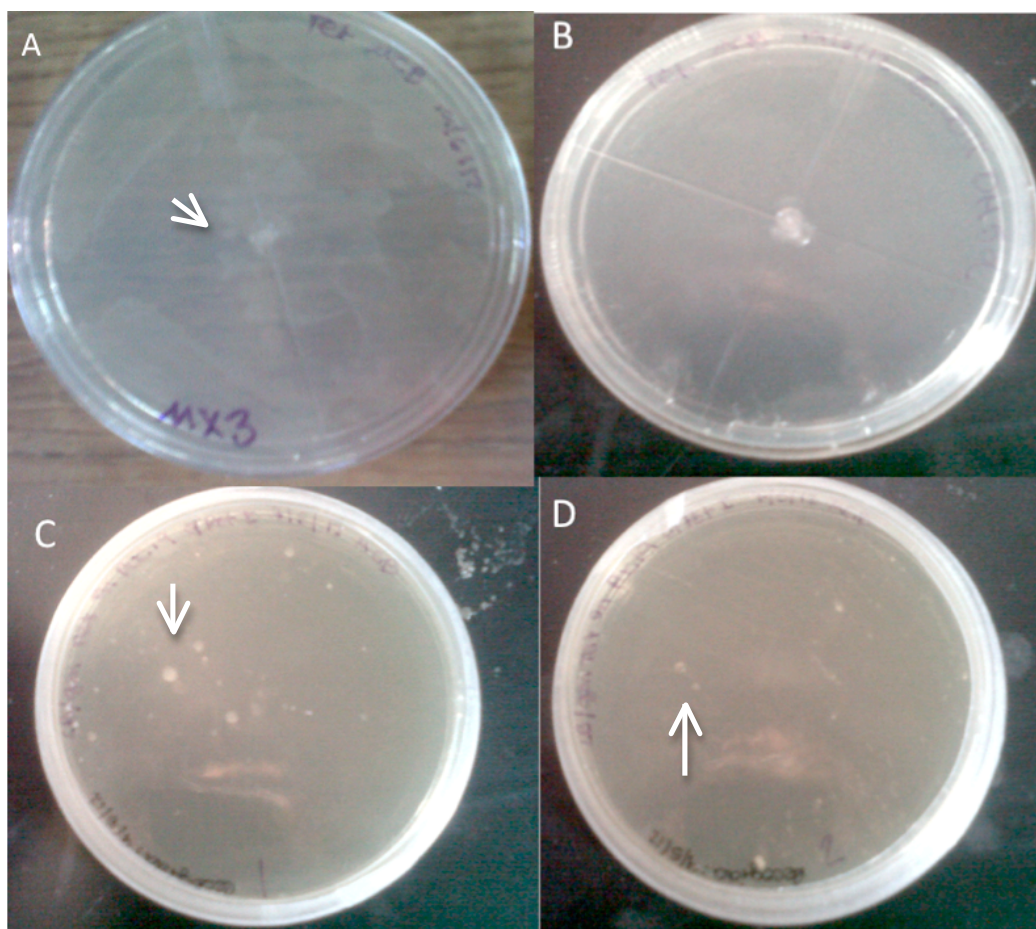
Figura 15. Clon resistente a tetraciclina Tet2

Placa de medio LB y tetraciclina 1.12 μ M en donde se puede observar la colonia resistente a tetraciclina clonada, la cuál pertenece a la biblioteca genómica generada con la enzima PstI. El clon fue nombrado Tet2.



Una vez obtenidos los clones, se realizó una re-siembra de los mismos a 50 μ g/mL en al cual se pudo observar crecimiento de los mismos a las 24 horas. A continuación se muestra una figura comparando el crecimiento de la muestra, *E.coli* DH5 alfa y los clones Tet1 y Tet2 en placas con tetraciclina:

Figura 16. Comparación de las diferentes cepas creciendo bajo selección con tetraciclina
 En la figura, A: muestra creciendo en placas con tetraciclina 1.2 μ M B: No crecimiento de *E.coli* DH5 α en placas con tetraciclina 1.2 μ M, C: Clon Tet1 creciendo en placas con tetraciclina 1.2 μ M, D: Clon Tet2 creciendo en placas con tetraciclina 1.2 μ M



Cuadro 8 Cobertura del genoma de la muestra en las bibliotecas genómicas generadas con la enzima PstI y Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato utilizando la relación vector:inserto 1:1.

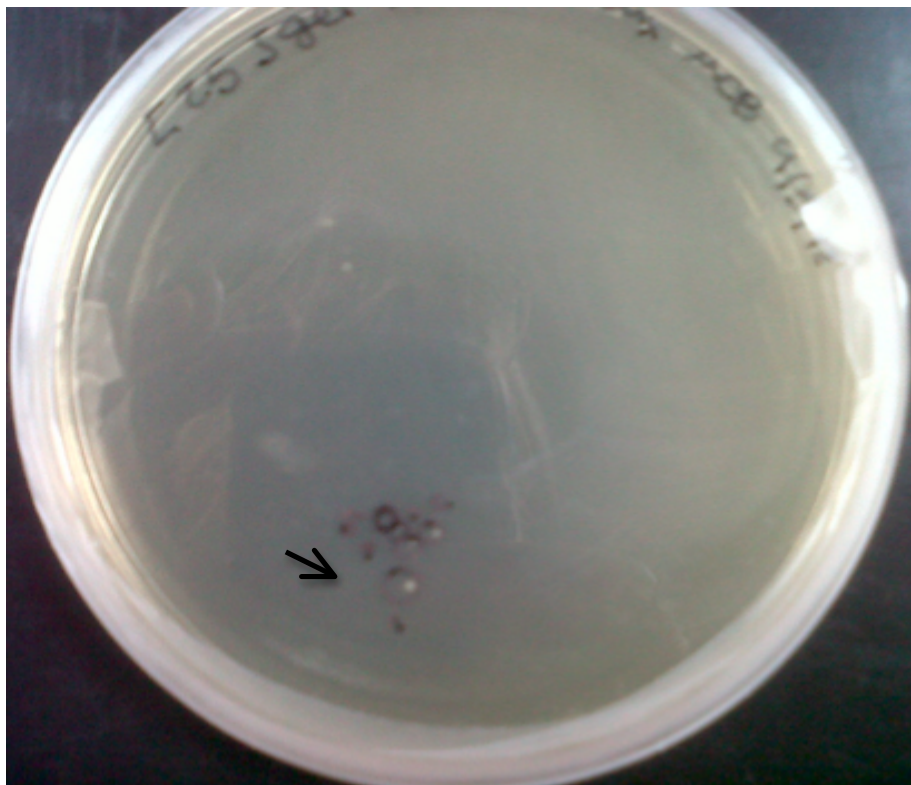
Biblioteca genómica	Cobertura del genoma
Biblioteca genómica generada con PstI	51.6%
Biblioteca genómica generada con Hind III	9%

[^]Ver Apéndice C

En este caso se encontraron cinco clones resistentes a glifosato creciendo en las placas de glifosato 25 mM, a las 72 horas de incubación. La figura a continuación muestra los clones, los cuales fueron nombrados Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo 4 y Glifo5:

Figura 17. Clones resistentes a glifosato Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo4, Glifo5.

Placa de medio con glifosato 25 mM en donde se pueden observar las colonias resistentes a glifosato clonadas, la cuales pertenecen a la biblioteca genómica de la muestra generada con la enzima PstI. Los clones fueron nombrados Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo4, Glifo5.



Una vez obtenidos los clones, se realizó una re-siembra de los mismos a 25 mM en la cual se pudo observar crecimiento únicamente de los clones Glifo1 y Glifo2 a las 24 horas. Los clones Glifo3, Glifo4 y Glifo 4 no mostraron ningún crecimiento a pesar que se realizaron varias siembras de los mismos, por lo que fueron descartados. Luego los clones Glifo1 y Glifo 2 se sembraron a 50 y 75 mM, se observó poco crecimiento de los mismos en las placas a las 24 horas. Como control se realizó una siembra de *E.coli* DH α en placas con glifosato 25 mM, se obtuvo muy poco crecimiento en las mismas a las 24 horas.

Se repitió la biblioteca genómica, a manera de intentar cubrir el genoma en mayor porcentaje (en colaboración con Claudia Paiz), a continuación el cuadro con los resultados:

Cuadro 9 Cobertura del genoma de la muestra en la biblioteca genómica generada con la enzima PstI utilizando la relación vector:inserto 1:1

Biblioteca genómica	Cobertura del genoma
Biblioteca genómica de la muestra generada con PstI	9.2%

En este caso se obtuvieron 486 colonias resistentes a 25 mM de glifosato. De estas colonias se seleccionaron 35, las cuales mostraron crecimiento a las 24 horas en 25 mM glifosato pero no resistencia a 75 y 100 mM glifosato (colaboración de Claudia Paiz). A continuación se muestra la figura de los clones:

Figura 18. Clones G1 a G25 resistentes a 25 mM glifosato.

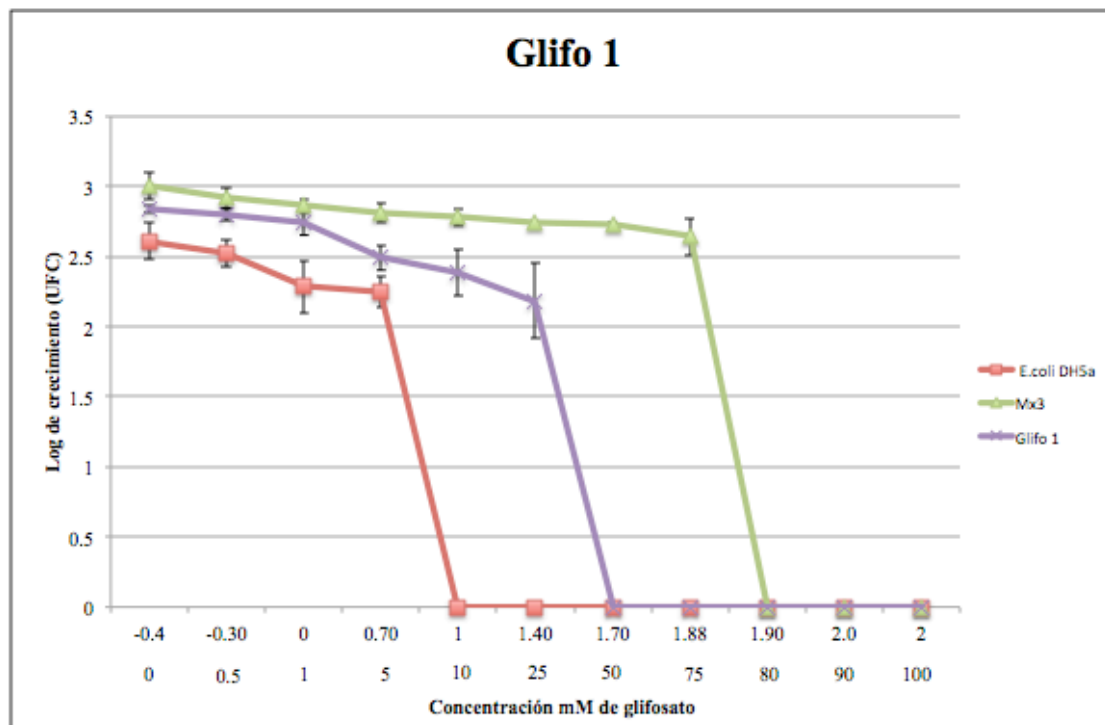
Los clones presentan crecimiento a 25 mM glifosato, estos fueron nombrados G1 a G25.



Para caracterizar el fenotipo de las colonias resistentes al glifosato clonadas (Glifo1, Glifo2) , se realizaron curvas bacterianas a diferentes concentraciones de glifosato. Como controles se utilizaron *E.coli* DH5 α y la muestra original Mx3 (*Serratia marcescens*). A continuación se presentan las curvas realizadas y el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las mismas por medio del método de Kaplan Meier:

Figura 19. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de Glifo1 en escala logarítmica comparado con los controles.

Control DH5 α (rojo), control Mx3 (verde) y Glifo 1 (morado). Los datos originales del conteo se muestran en el Anexo D.



Cuadro 10. MIC y valor p del clon Glifo 1 calculado por el método de Kaplan Meier.

Valor MIC Concentración mM glifosato	Valor p comparado con <i>E.coli</i> DH5 α	Valor p comparado con Mx3
50	0.0039	0.0079

También se obtuvo una gráfica de sobrevivencia acumulada, la cual se muestra a continuación:

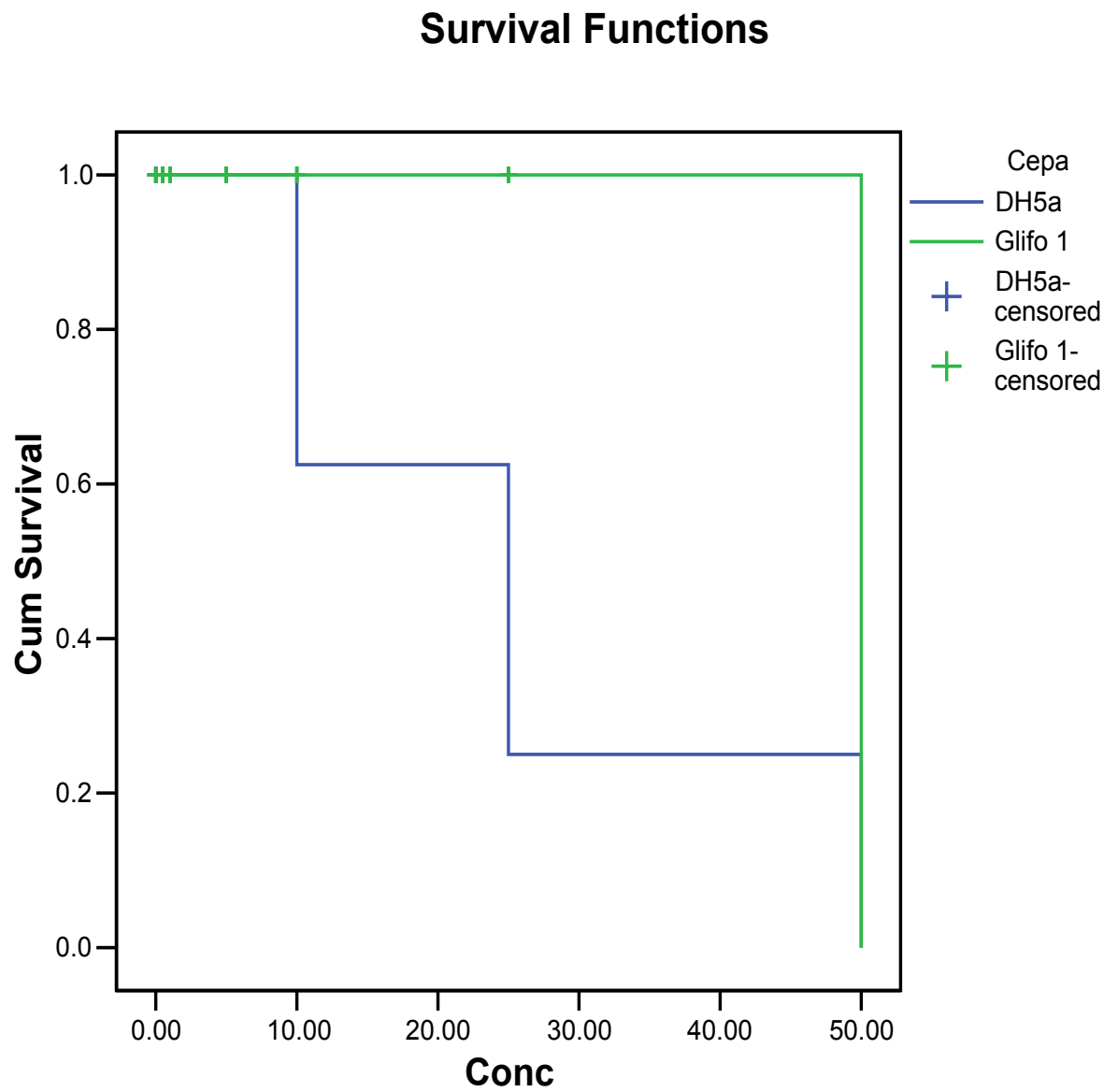
Figura 20. Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo 1 comparado con *E.coli* DH5a

Figura 21. Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo 1 comparado con Mx3.

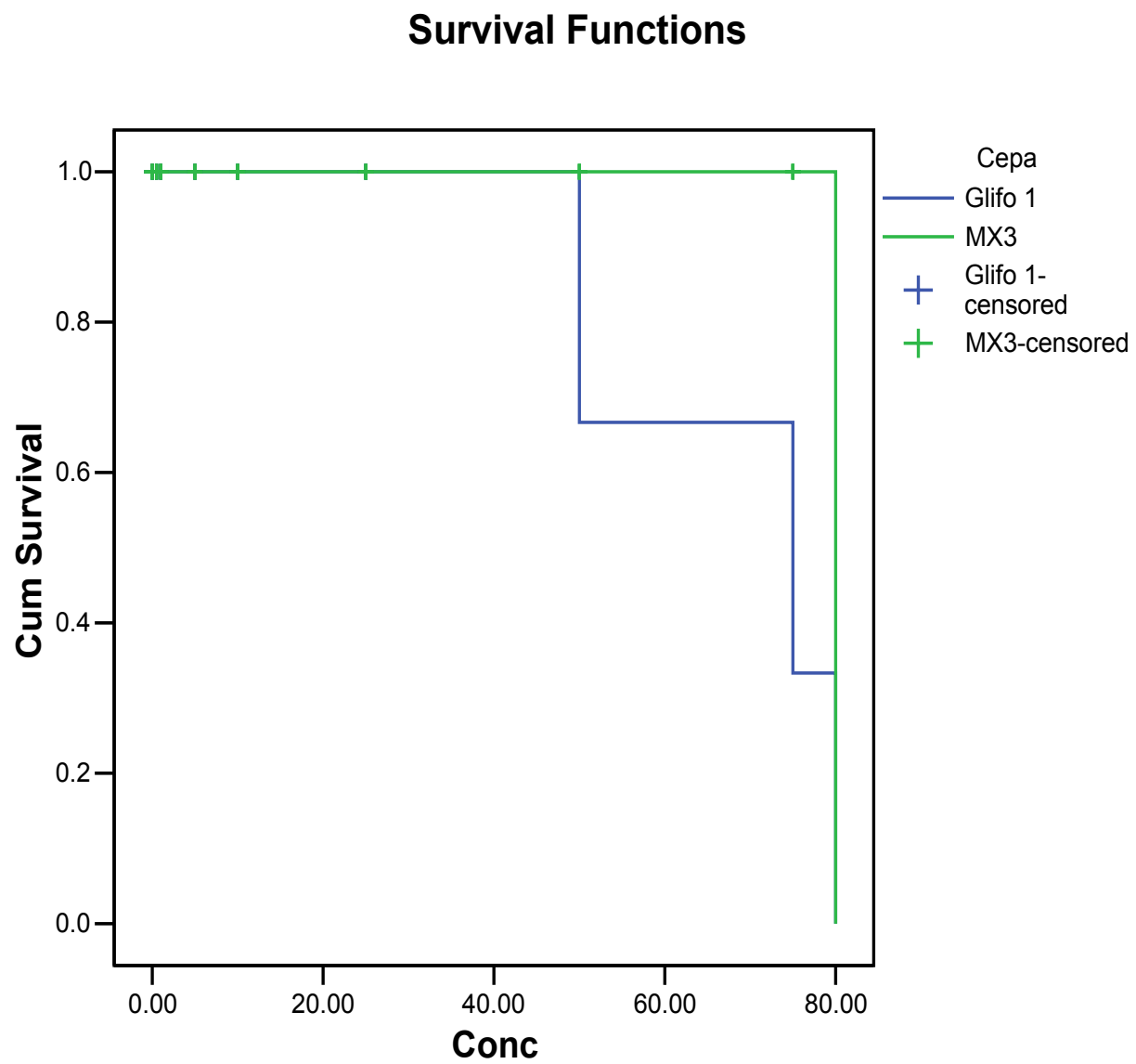
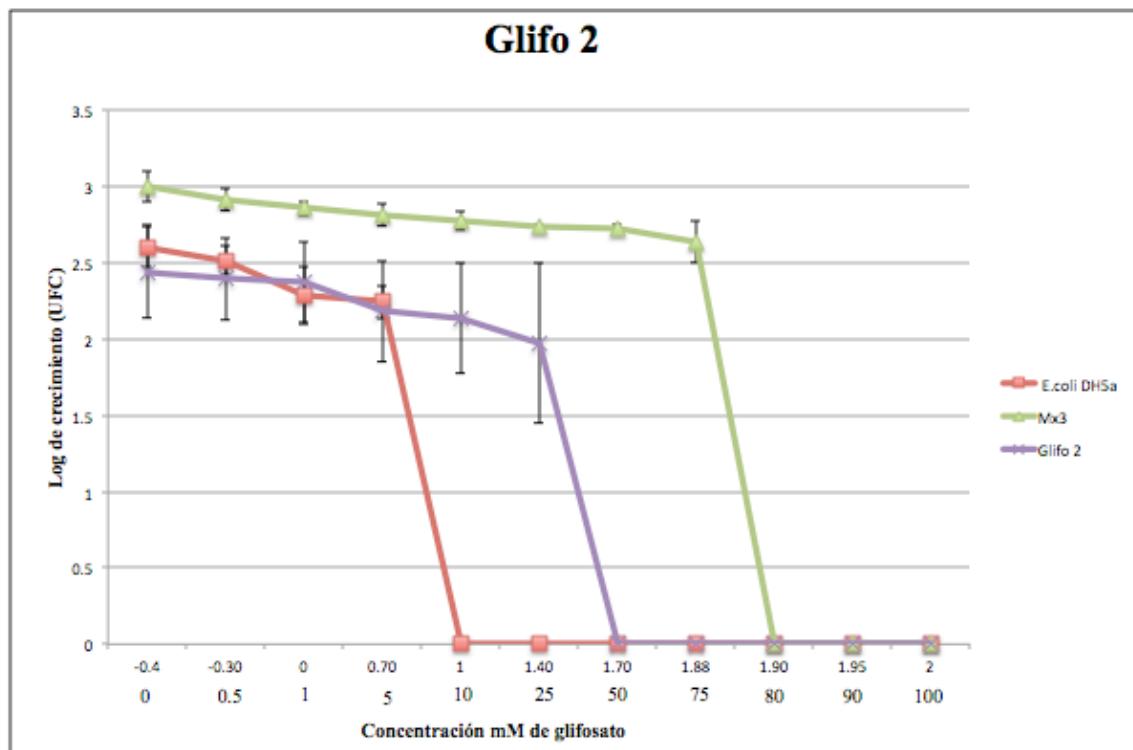


Figura 22. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de Glifo2 en escala logarítmica comparado con los controles.

Control DH5 α (rojo), control Mx3 (verde) y Glifo 2 (morado). Los datos originales del conteo se muestran en el Anexo D.



Cuadro 11. MIC y valor p del clon Glifo 2 calculado por el método de Kaplan Meier.

Valor MIC Concentración mM glifosato	Valor p comparado con <i>E.coli</i> DH5α	Valor p comparado con Mx3
50	0.0039	0.0079

También se obtuvo una gráfica de supervivencia acumulada, la cual se muestra a continuación:

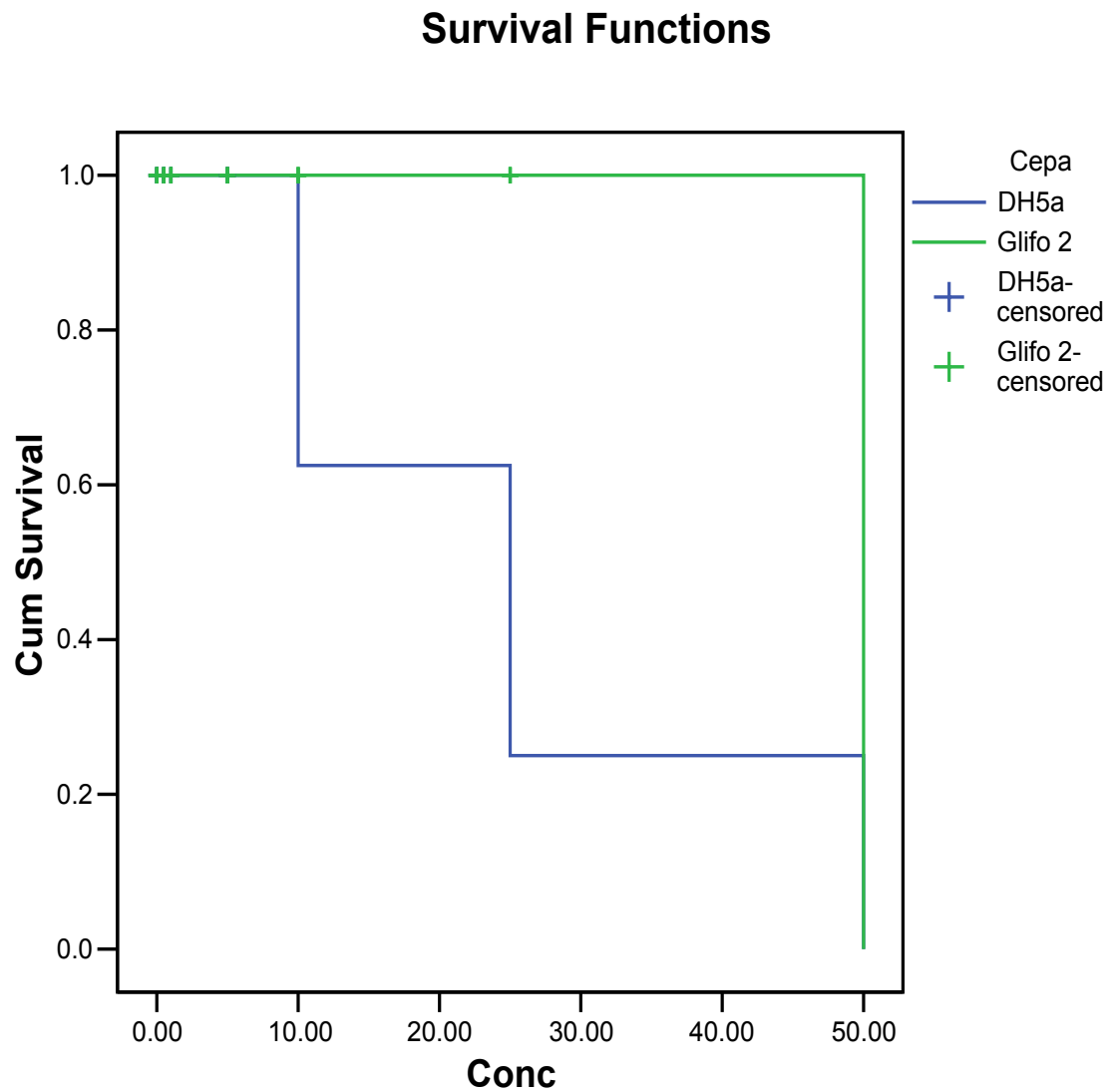
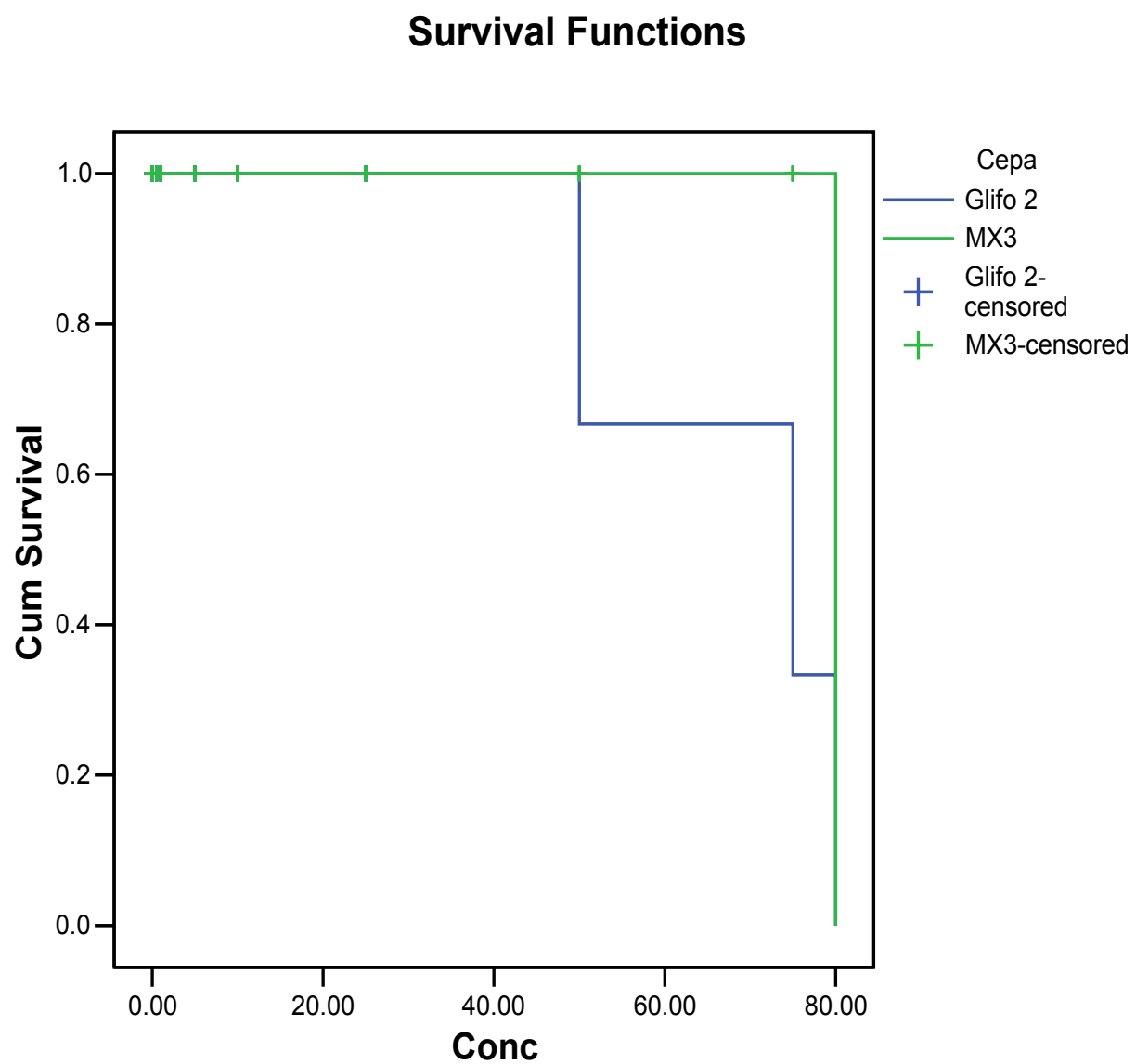
Figura 23. Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo 2 comparado con *E.coli* DH5a

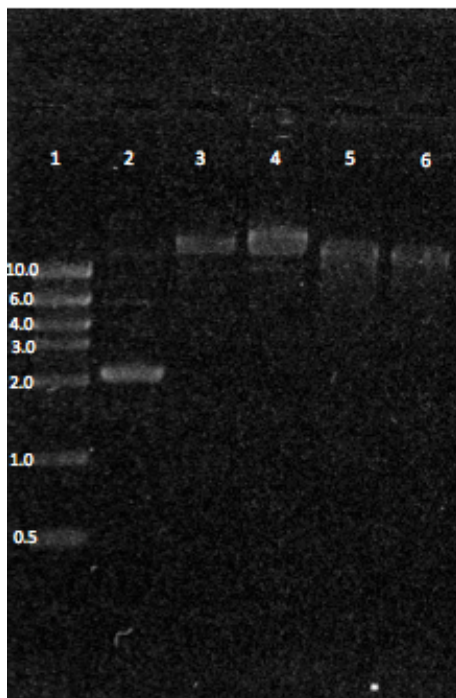
Figura 24. Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo 2 comparado con Mx3.



Se extrajo el plásmido con el inserto que confería resistencia, tanto para los clones con resistencia a tetraciclina como para los clones con resistencia al glifosato (ver sección de métodos). Para visualizar el tamaño de los plásmidos con inserto se realizó una electroforesis, la cual se muestra en la figura a continuación:

Figura 25. Plásmido pUC19 sin inserto y plásmido pUC19 con los insertos que confieren resistencia a tetraciclina y resistencia a glifosato

Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización del plásmido pUC19 sin inserto y con los insertos que confieren resistencia a tetraciclina y resistencia al glifosato extraídos de los clones. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S), en el pozo 2 se encuentra pUC19 sin inserto, en el pozo 3 se encuentra pUC19 con inserto que confiere resistencia a tetraciclina proveniente del clon Tet1, en el pozo 4 se encuentra pUC19 con inserto que confiere resistencia a tetraciclina proveniente del clon Tet2, en el pozo 5 se encuentra pUC19 con inserto que confiere resistencia a glifosato proveniente del clon Glifo1, en el pozo 6 se encuentra pUC19 con inserto que confiere resistencia a glifosato proveniente del clon Glifo2, los pozos 7 y 8 se encuentran vacíos.



Los insertos fueron secuenciados, la secuenciación generó ocho secuencias diferentes. Estas fueron ingresadas a BLAST para determinar su identidad. A continuación se muestra el cuadro con el análisis:

Cuadro 12. Análisis en BLAST de la secuencia de los insertos que confieren resistencia a tetraciclina y glifosato

Muestra	Primeros tres resultados de BLAST	Número de accesión	Valor E	Máxima identificación (%)
Tet1 M13F	Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111	CP002040.1	3e-11	80
	Aphidius ervi clone 68 microsatellite sequence	AF337022.1	3e-11	80
	Cloning vector pVZ324 complete sequence	AF100177.1	3e-11	80
Tet1 M13R	Serratia sp. AS13, complete genome. Nickel-transporting ATPase., Polyamine- transporting ATPase hypothetical protein	CP002775.1	0.0	86
	Serratia sp. AS12, complete genome. Nickel-transporting ATPase., Polyamine- transporting ATPase hypothetical protein	CP002774.1	0.0	86
	Serratia plymuthica AS9, complete genome. Nickel-transporting ATPase., Polyamine- transporting ATPase hypothetical protein	CP002773.1	0.0	86
Tet2 M13F	Serratia sp. AS13, complete genome. Electron transport complex protein rnfG	CP002775.1	0.0	88
	Serratia sp. AS12, complete genome. Electron transport complex protein rnfG	CP002774.1	0.0	88
	Serratia plymuthica AS9, complete genome. Electron transport complex protein rnfG	CP002773.1	0.0	88
Tet2 M13R	Serratia sp. AS13, complete genome. Nickel-transporting ATPase., Polyamine- transporting ATPase, hp.	CP002775.1	0.0	86

Continuación Cuadro 12.

Serratia sp. AS12, complete genome.				
	Nickel-transporting ATPase., Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein	CP002774.1	0.0	86
Serratia plymuthica AS9, complete genome.				
	Nickel-transporting ATPase., Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein	CP002773.1	0.0	86
Glifo1 M13F	No se encontraron similitudes significantes			
Glifo1 M13R	No se encontraron similitudes significantes			
Glifo2 M13F	No se encontraron similitudes significantes			
Glifo2 M13R	No se encontraron similitudes significantes			

*Ver Apéndice F

Con las secuencias se realizó el análisis de contigs, se obtuvo un contig, es decir una secuencia de consenso, el cual fue ingresado en BLAST, a continuación se encuentra el análisis del contig:

Cuadro 13. Análisis en BLAST de la secuencia de consenso

Muestra	Primeros tres resultados de BLAST	Número de accesión	Valor E	Máxima identificación (%)
Secuencia de consenso	Serratia sp. AS13, complete genome.			
	Nickel-transporting ATPase., Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein	CP002775.1	0.0	86
	Serratia sp. AS12, complete genome.			
	Nickel-transporting ATPase., Polyamine-transporting ATPase	CP002774.1	0.0	86

 hypothetical protein

Continuación Cuadro 13.

Serratia plymuthica AS9, complete genome. Nickel-transporting ATPase., Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein	CP002773.1	0.0	86
---	------------	-----	----

*Ver Apéndice F

Se intentó la secuenciación de los clones G1 a G6, al crecer estos clones, y Glifo1 y Glifo2 para poder realizar una segunda secuenciación y obtener mejores resultados, los clones no crecieron en medio líquido con glifosato 25 mM ni con medio líquido con ampicilina 50µg/mL. Se intentó extraer el plásmido de estos clones creciéndolos en caldo nutritivo, pero al intentar la extracción no se obtuvo ningún resultado.

B. Aislamiento del gen de resistencia al glifosato por el método de cebadores degenerados

Como se mencionó anteriormente (ver sección métodos), se diseñaron cebadores degenerados para la amplificación del gen de resistencia al glifosato, a continuación se muestra el cuadro con la secuencia de los cebadores diseñados:

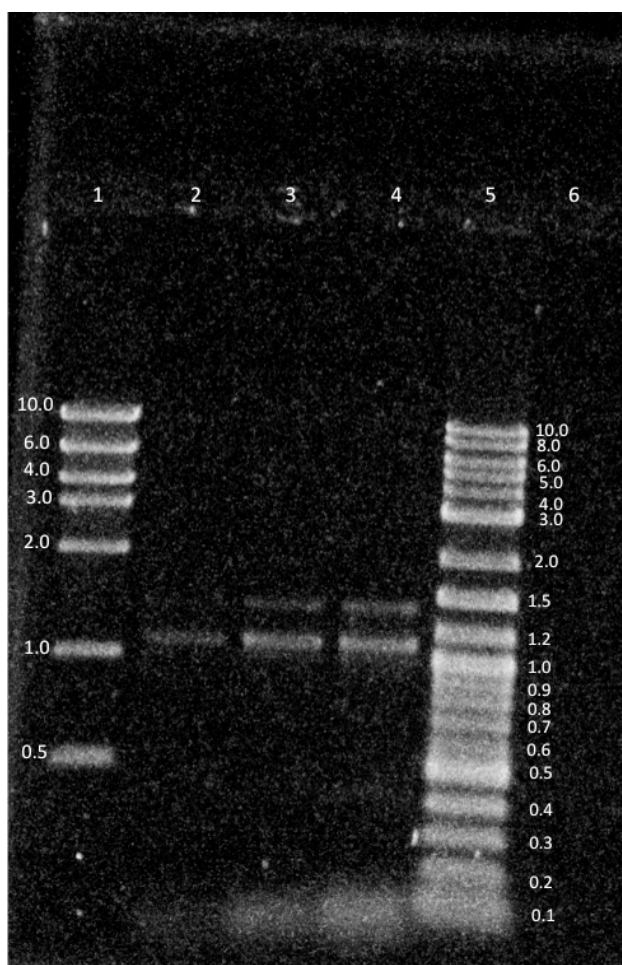
Cuadro 14. Secuencia de los cebadores degenerados diseñados para la amplificación del gen parcial de resistencia al glifosato.

Gen a amplificar	Tipo de cebador	Secuencia de 5' a 3'	Tamaño esperado
Gen de resistencia al glifosato	Cebador degenerado iniciador	CKAACCRHGMDYTDYTYCTGGC	~1200 bp
	Cebador degenerado reverso	GAHARMCGSACCAGCGAGAAACAC	~1200 bp

La visualización del producto de PCR optimizado se muestra en la figura a continuación:

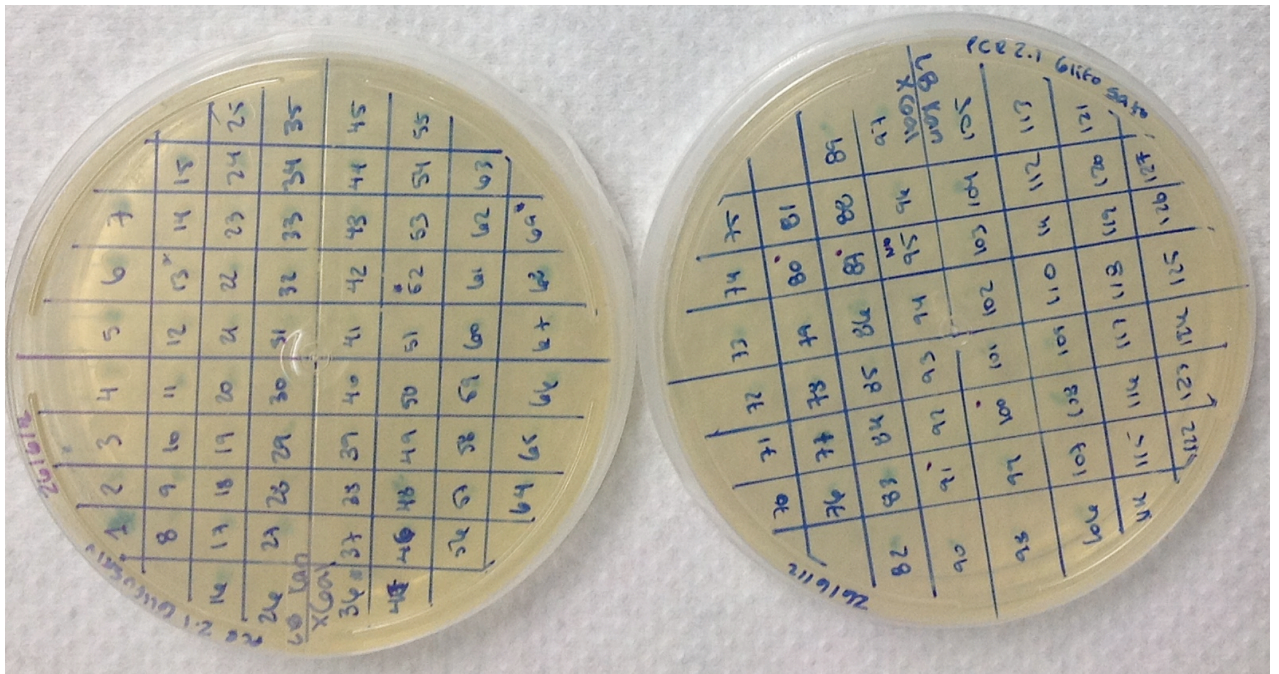
Figura 26. Producto de la PCR con cebadores degenerados destinados para amplificar el gen de resistencia al glifosato

Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización de los productos amplificados por los cebadores degenerados. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S), en el pozo 2 se encuentran 2 μ L del producto de PCR, en el pozo 3 se encuentran 5 μ L Del producto de PCR, en el pozo 4 se encuentran 8 μ L del producto de PCR, en el pozo 5 se encuentra el marcador molecular “Tridye 2-log DNA ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3270S), los pozos 6 al 8 se encuentran vacíos.



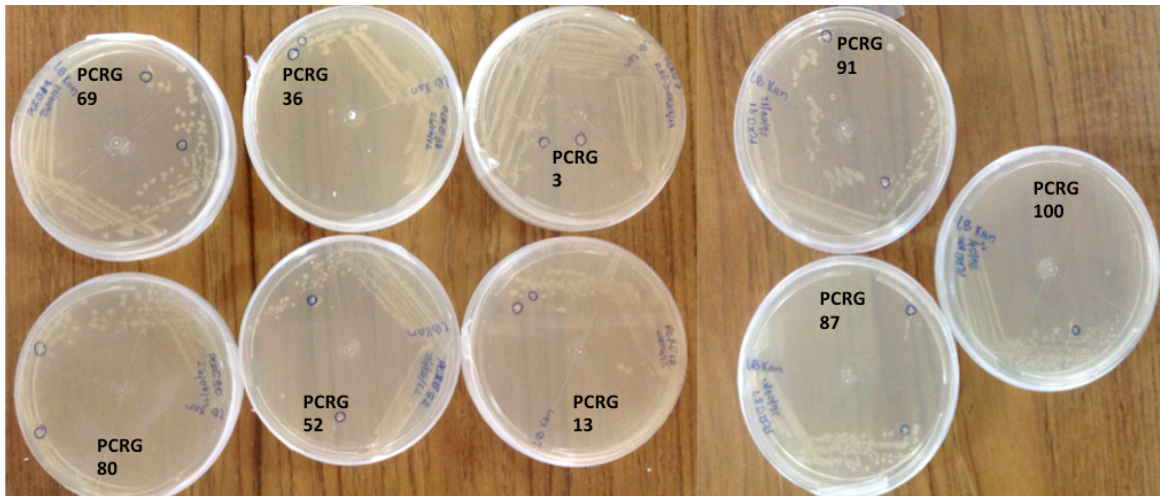
Como se mencionó anteriormente, el producto de PCR fue clonado en el vector pCR 2.1 y transformado a células *E.coli* DH5 α . Se obtuvieron 127 colonias con inserto, nombradas PCRG y su respectivo número. La figura de las colonias se muestra a continuación:

Figura 27. Clones PCRG con inserto



Únicamente 9 colonias fueron completamente blancas. A continuación se muestran la figura con esos clones, nombrados PCRG3, PCRG13, PCRG36, PCRG52, PCRG69, PCRG80, PCRG87, PCRG91, PCRG100, sembrados en medio LB con kanamicina:

Figura 28. Clones PCRG3, PCRG13, PCRG36, PCRG52, PCRG69, PCRG80, PCRG87, PCRG91, PCRG100



Se extrajo el plásmido de 9 de estas colonias y se visualizó por medio de electroforesis. La figura se muestra a continuación:

Figura 29. Plásmido con inserto de los clones PCR3, PCR13, PCR36, PCR52, PCR69, PCR80
Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización de los productos amplificados por los cebadores degenerados. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S), en el pozo 2 se encuentra el plásmido PCR3, pozo 3 plásmido PCR13, en el pozo 4 plásmido PCR36, en el pozo 5 se encuentra el plásmido PCR52, en el pozo 6 plásmido PCR69, PCR80, en el pozo 8 el marcado molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S) .

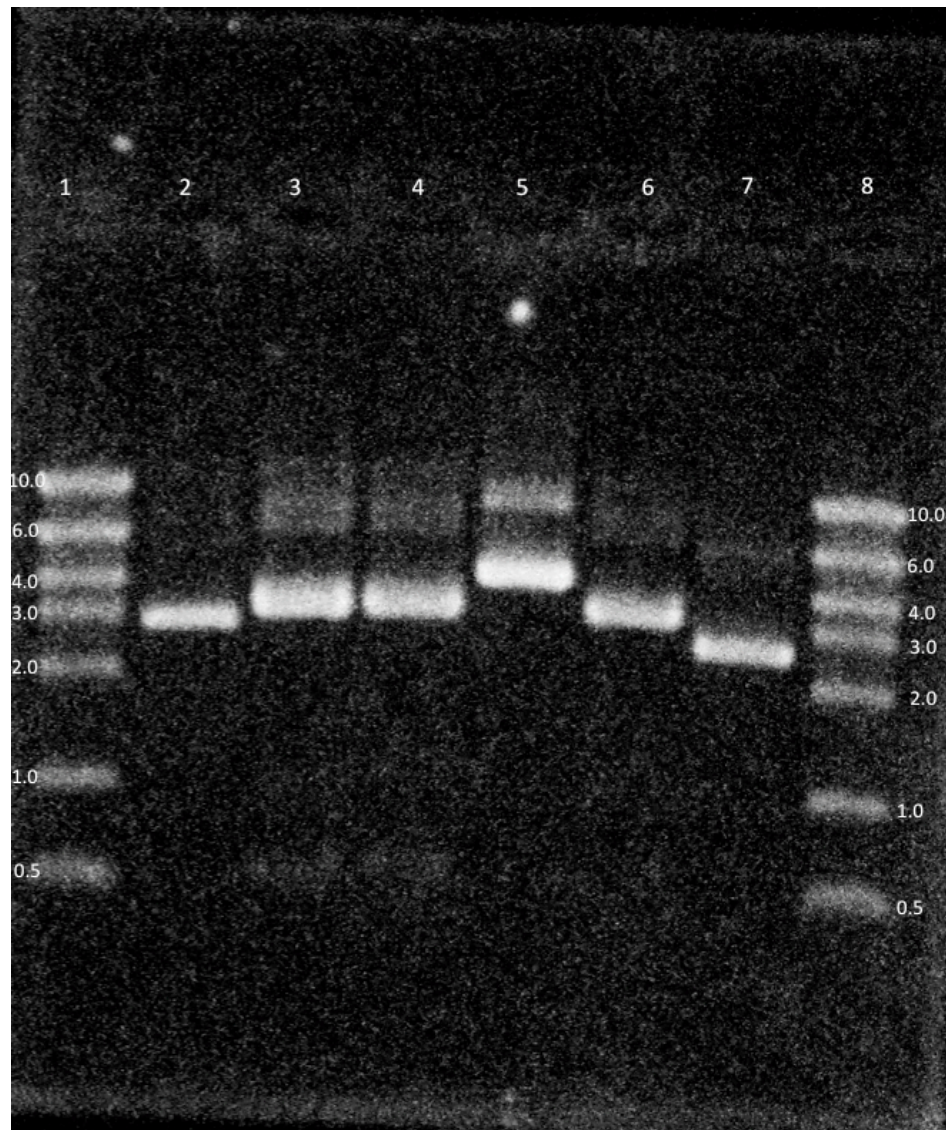
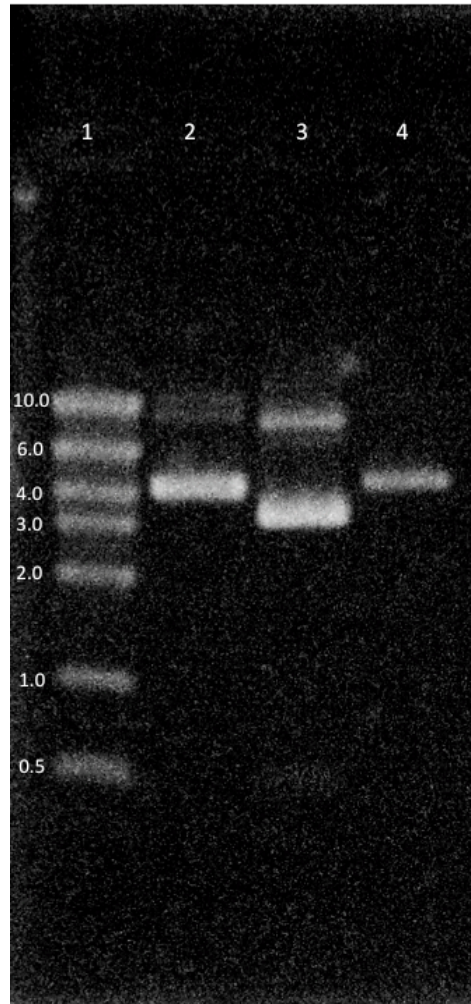


Figura 30. Plásmido con inserto de los clones PCR87, PCR91, PCR100

Gel de agarosa al 0.8% en TBE para la visualización de los productos amplificados por los cebadores degenerados. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S), en el pozo 2 se encuentra el plásmido PCR87, pozo 3 plásmido PCR91, el el pozo 4 plásmido PCR100



Los clones fueron secuenciados, la secuenciación generó 18 secuencias diferentes. Estas fueron ingresadas a BLAST para determinar su identidad. A continuación se muestra el cuadro con el análisis:

Cuadro 15. Análisis en BLAST de la secuencia de los insertos

Muestra	Primeros tres resultados en BLAST	Número de accesión	Valor E	Máxima identificación (%)
PCRG3 M13F	Reporter vector pGL3-3'UTR, complete sequence	JN542721.1	0.0	99
	Expression vector pGEMe-phiC31int-p(A)90 DNA, complete sequence	AB713998.1	0.0	99
	Expression vector pTD1-phiC31Int2 DNA, complete sequence	AB713997.1	0.0	99
PCRG3 M13R	No se encontraron similitudes significativas			
	No se encontraron similitudes significativas			
	No se encontraron similitudes significativas			
PCRG13 M13F	Himar1-delivery and mutagenesis vector pHBurk5, complete sequence	EU919404.1	0.0	100
	Himar1-delivery and mutagenesis vector pHBurk3, complete sequence	EU919403.1	0.0	100
	Cloning vector pHc04, complete sequence	FJ389161.1	0.0	99
PCRG13 M13R	Cloning vector phis-5GFP5', complete sequence	JX156633.1	0.0	99
	Cloning vector phis-5GFP, complete sequence	JX156632.1	0.0	99
	Cloning vector pamGFP5', complete sequence	JX156629.1	0.0	99
PCRG36 M13F	Himar1-delivery and mutagenesis vector pHBurk5, complete sequence	EU919404.1	0.0	100
	Himar1-delivery and mutagenesis vector pHBurk3, complete sequence	EU919403.1	0.0	100
	Cloning vector pHc04, complete sequence	FJ389161.1	0.0	99
PCRG36 M13R	Cloning vector phis-5GFP5', complete sequence	JX156633.1	0.0	99
	Cloning vector phis-5GFP, complete sequence	JX156632.1	0.0	99
	Cloning vector pamGFP5', complete sequence	JX156629.1	0.0	99
PCRG52 M13F	Serratia sp. AS13, complete genome	CP002775.1	0.0	85
	Serratia sp. AS12, complete genome	CP002774.1	0.0	85
	Serratia plymuthica AS9, complete genome	CP002773.1	0.0	85
PCRG52 M13R	Serratia sp. AS13, complete genome	CP002775.1	0.0	85
	Serratia sp. AS12, complete genome	CP002774.1	0.0	85
	Serratia plymuthica AS9, complete genome	CP002773.1	0.0	85

Continuación Cuadro 15.

Muestra	Primeros tres resultados en BLAST	Número de accesión	Valor E	Máxima identificación (%)
PCRG69	Himar1-delivery and mutagenesis vector	EU919404.1	0.0	100
M13F	pHBurk5, complete sequence			
	Himar1-delivery and mutagenesis vector	EU919403.1	0.0	100
	pHBurk3, complete sequence			
	Cloning vector pHc04, complete sequence	FJ389161.1	0.0	99
PCRG69	Cloning vector phis-5GFP5', complete sequence	JX156633.1	0.0	99
M13R	Cloning vector phis-5GFP, complete sequence	JX156632.1	0.0	99
	Cloning vector pamGFP5', complete sequence	JX156629.1	0.0	99
PCRG80	No se encontraron similitudes significativas			
M13F	No se encontraron similitudes significativas			
	No se encontraron similitudes significativas			
PCRG80	Cloning vector phis-5GFP5', complete sequence	JX156633.1	0.0	99
M13R	Cloning vector phis-5GFP, complete sequence	JX156632.1	0.0	99
	Cloning vector pamGFP5', complete sequence	JX156629.1	0.0	99
PCRG87	Serratia sp. AS13, complete genome	CP002775.1	0.0	85
M13F	Serratia sp. AS12, complete genome	CP002774.1	0.0	85
	Serratia plymuthica AS9, complete genome	CP002773.1	0.0	85
PCRG87	Serratia sp. AS13, complete genome	CP002775.1	0.0	85
M13R	Serratia sp. AS12, complete genome	CP002774.1	0.0	85
	Serratia plymuthica AS9, complete genome	CP002773.1	0.0	85
PCRG91	Himar1-delivery and mutagenesis vector	EU919404.1	0.0	100
M13F	pHBurk5, complete sequence			
	Himar1-delivery and mutagenesis vector	EU919403.1	0.0	100
	pHBurk3, complete sequence			
	Cloning vector pHc04, complete sequence	FJ389161.1	0.0	99
PCRG91	Cloning vector phis-5GFP5', complete sequence	JX156633.1	0.0	99
M13R	Cloning vector phis-5GFP, complete sequence	JX156632.1	0.0	99
	Cloning vector pamGFP5', complete sequence	JX156629.1	0.0	99
PCRG10	Serratia sp. AS13, complete genome	CP002775.1	0.0	85
0	Serratia sp. AS12, complete genome	CP002774.1	0.0	85
M13F	Serratia plymuthica AS9, complete genome	CP002773.1	0.0	85

Continuación Cuadro 15.

PCRG10	<i>Serratia</i> sp. AS13, complete genome	CP002775.1	0.0	85
0	<i>Serratia</i> sp. AS12, complete genome	CP002774.1	0.0	85
M13R	<i>Serratia plymuthica</i> AS9, complete genome	CP002773.1	0.0	85

Como se puede observar en el cuadro, los clones PCRG52, PCRG87 y PCRG100 pertenecen a una *Serratia* sp. Es decir, los cebadores degenerados sí amplifican parte de la enzima EPSPS de *Serratia* sp. Se buscó en el genoma de *Serratia* sp. AS13 la secuencia amplificada secuenciada tanto por el cebador M13F y el M13R. A continuación se muestra la figura de lo secuenciado por ambos cebadores:

Figura 31. Gen EPSPS amplificado parcialmente por los cebadores degenerados diseñados, secuenciado con el cebador M13F

Serratia sp. AS13 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_017573.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

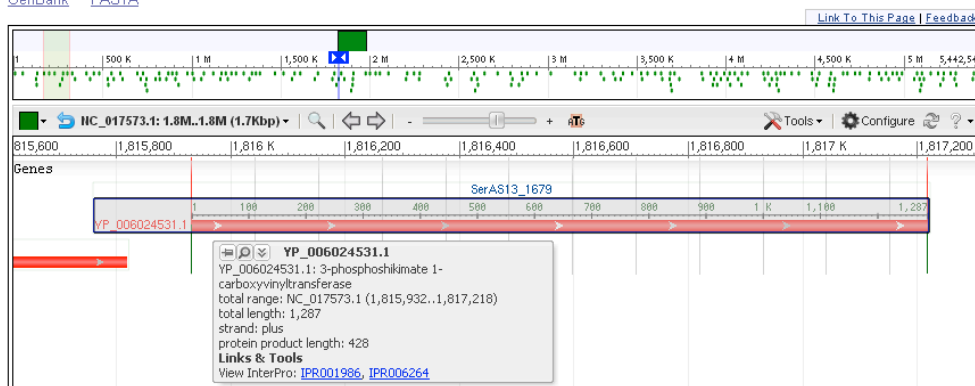
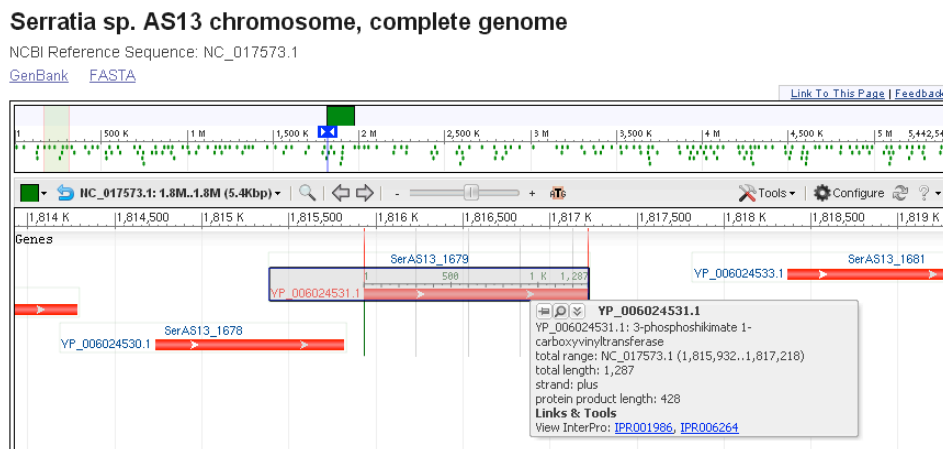


Figura 32. Gen EPSPS amplificado parcialmente por los cebadores degenerados diseñados, secuenciado con el cebador M13R



Se realizó el mismo procedimiento con *Serratia* sp. AS12 y AS9. Con la secuencia de estos clones, se llevó a cabo un contig, el cual se utilizó para determinar en qué lugar de la enzima EPSPS se habían unido los cebadores, a continuación se muestran las figuras del contig y del lugar en el cual se unen los cebadores diseñados en relación al contig y a *Serratia* sp:

Figura 33. Secuencia del contig de las enzimas EPSPS de *Serratia* sp. AS13, AS12 y AS9

```

NNNNNNNNNNNNNNNTNNGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATA
TCTGCAGAAATTCGGCTTCGAACCGCGCNCCTGTTCTGGCGGCGCTGGCGAAAGGCACGACCCGGCTGACC
AACCTGCTGGACAGCGACGACGTGCGTCATATGCTGAACGCGCTGCAGGCGTTGGGCGTGAACATATCAGC
TTTCCGCCGATCGCACCGTGTGCGAAGTGACCGGCGTGGCCGGGCGCTGGTGGCCGGCCAGCCGCTGGA
ACTGTTCTCGGCAACGCCGGGACGGCGATGCGCCATTGGCGGCGGCGCTGTGCCTCGGTGAAGCGGAC
GTGGTGTGACCGGCGAACC GCGCATGAAAGAGCGCCGATCGGCCATTTGGTGGACGCGTTGCGCCAGG
GCGGGGCGCAGATTGATTACCTCGAGCAGACCGATTACCCGCCGATTCGCCTGCGCGGGCTTCTGGG
CGGCGAGGTCACCGTTGACGGCAGCGTCTCCAGCCAGTTCCTGACCGCGTTGCTGATGACCGCGCCGCTG
GCGCCGACGATACGCAGATCCACATCAAGGGCGAGCTGGTTTCCAAGCCGTACATCGACATCACGCTGC
ATCTGATGCGCACCTTCGGCGTATCGGTGAGCCACGACAACCTACCGGGTGTCCATATCCAGGGGCGTCA
GACGTATATCGCGCCGGGCGATTACCTGGTTGAGGGCGATGCTTCTTCGCCTTACTTCTGCGGGCG
GCGGTATCAAGGGCGGCACCGTGC GCGTGACCGGCATCGGCCGCAAAAAGCGTGCAGGGCGACACCAAGT
TTGCCGACGTGCTGGAGAAAATGGGCGCGCGCATTACCTGGGGCGACGATTCATCGAATGCAGCCGCGG
TGAATGCGCGGCATCGACATGGACATGAACCACATTCGGACGCGGCGATGACCATCGCCACCGCAGCG
CTGTTCCGCCGAGGGGCGGACCACCATTCGCAATATCTACAACCTGGCGGGTAAAGGAGACCGACCGTCTGG
CGGCGATGGCCACCGAGCTGCGTAAAGTGGGGGCGGAAGTGGACGAAGGCGAAGACAACATCCACGTCCT
GCCGACCGCAAACCTGCAGTTTCCGACATTAGCACCTACAACGATACCGTATGGCCATGTGCTTCTCG
CTGATCCGGNTNTCAAGCCGAATTCCAGCACACTGGCGGGCGTTACTAGNGGANCCGAGCTCGANNNNNN
  
```

Figura 34. Lugar en el cual se unen los cebadores degenerados en relación al contig y a la secuencia de *Serratia* sp.

```

CONTIG      --NNNNNNNNNNNNNNNTNNGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCA
Serratia    CATGGTGGATTCCCTGACGTTACAACCGGTCGCCCTGGTCAATGGC-----ACCGTCA
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      GTGTGATGGATATCTGCAGAATTTCGGCTTCGAACCGCGCNCCTGTTCCCTGGCGGCGCTGGC
Serratia    ACTTACCCGG---CTCCAAGAGC--GTATCCAATCGTGTCTGTGTGCTGGCTGCGCTGGC
PrimerF     -----
PrimerR     -----
                    * * * * * * * * * *

CONTIG      GAAAGGCACGACCCGGCTGACCAACCTGCTGGACAGCGACGACGTGCGTCATATGCTGAA
Serratia    GGAGGGAACGACCACGTTGACCAACCTGCTGGACAGCGACGACGTGCGCCATATGCTGAA
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      CCGCGCTGCAGGCGTTGGGCGTGAACCTATCAGCTTCCGCGGATCGCACCGTGTGCGAAGT
Serratia    TGCGCTGCAGGCGTTGGGCGTGAAGTATCAGCTGTCCGACGATCGCACCACTTGTATCGT
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      GACCGGCGTGGCCGGGCGCTGGTGGCCGGCCAGCCGCTGGAACGTTCCTCGGCAACGC
Serratia    CGAGGGCGTTGCCGGCCGCTGCTGACCCGCGAGCCGCTTGAGCTGTTCCCTCGGCAATGC
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      CGGGACGGCGATGCGCCCATTTGGCGGCGGCGCTGTGCCTCGGTGAAGGCGACGTGGTGT
Serratia    CGGTACCGCGATGCGCCCATTTGGCGGCGGCGTGTGTCTGGGTAGCGGCGATGTGGTGT
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      GACCGGCGAACC CGCATGAAAGAGCGCCGATCGGCCATTTGGTGGACGCGTTGCGCCA
Serratia    GACCGGTGAACCACGCATGAAAGAGCGGCCTATCGGCCATCTGGTGGATGCTCTGCGCCA
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      GGGCGGGCGCAGATTGATTACCTCGAGCAGACCGATTACCCGCGGATTCGCTGCGCGG
Serratia    GGGCGGCGCGCAAATTGATTACCTGGAACAGACCGATTATCCGCCATTCGCGCTGCGCGG
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      CGGCTTCTGGGCGGCGAGGTACCGTTGACGGCAGGCTCTCCAGCCAGTTCCTGACCGC
Serratia    CGGTTTTACGGCGGTGACGTGACCGTCGACGGCAGCGTTTTCCAGCCAGTTCCTGACCGC
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      GTTGCTGATGACCGCGCGCTGGCGCCGAGGATACGCAGATCCACATCAAGGGCGAGCT
Serratia    GTTGCTGATGACTGCGCCACTGGCTGAGCAGGACACGAATATCCATATCAAGGGTGAAC
PrimerF     -----
PrimerR     -----

CONTIG      GGTTCCTAAACCGTACATCGACATCACGCTGCATCTGATGCGCACCTTCGGCGTATCGGT
Serratia    GGTTCCTAAACCGTACATCGACATCACGCTGCATCTGATGCGCACCTTCGGCGTAGAGGT
PrimerF     -----
PrimerR     -----

```

```

CONTIG          GAGCCACGACAACACTACCGGGTGTTCATATCCAGGGGCGTCAGACGTATATCGCGCCGGG
Serratia       CAGCCACGACAACACTACCGCGTGTTCATATTC AAGGTCGCCAAAACCTATCGCTCACCAGG
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          CGATTACCTGGTTGAGGGCGATGCTTCTCCGCTCTTACTTCTGGCGGGCGGGCTAT
Serratia       GGATTACCTGGTAGAAGGGCGATGCATCCTCCGCTTCTTATTTCTGGCGGGCGGGCGAT
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          CAAGGGCGGCACCGTGGCGGTGACCGGCATCGGCCGAAAAGCGTGCAGGGGACACCAA
Serratia       TAAAGGTGGCACCGTACGCGTGACCGGCATCGGCAAGAAAAGCGTTCAGGGCGACACCAA
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          GTTTGCCGACGTGCTGGAGAAAATGGGCGCGGCATTACCTGGGGCGACGATTTTCATCGA
Serratia       GTTTGCCGACGTGTTGGAGAAAATGGGCGCGGCATTACCTGGGGCGATGATTTTATCGA
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          ATGCAGCCGCGGTGAACTGCGCGGCATCGACATGGACATGAACCACATTCCGGACGCGGC
Serratia       ATGCAGCCGCGGTGAGTTGCGCGGCATCGATATGGATATGAACCATATTCCGGACGCGGC
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          GATGACCATCGCCACCGCAGCGCTGTTTCGCCGAGGGGCGACCACCATTTCGCAATATCTA
Serratia       GATGACCATTGCCACTGCAGCCCTGTTTGCCGAAGGGCCGACCACCATCCGCAATATCTA
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          CAACTGGCGGGTAAAGGAGACCGACCGTCTGGCGGCATGGCCACCGAGCTGCGTAAAGT
Serratia       TAATTGGCGGGTGAAGGAGACCGATCGTTTGCCGCCATGGCGACTGAATTGCGCAAAGT
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          GGGGGCGGAAGTGGACGAAGGCGAAGACAACATCCACGTCTGCCGACCGCCAAACTGCA
Serratia       AGGCGCTGAAGTGGATGAAGGTGAGGACTATATTCACGTGGTGC CGCCGCGCGAAGCTGAA
PrimerF       -----
PrimerR       -----

CONTIG          GTTTGCCGACATTAGCACCTACAACGATCACCGTATGGCCATGTGCTTCTCGCTGATCCG
Serratia       GTTTGCCGATATCGGTACCTACAACGATCACCGTATGGCGATGTGCTTCTCGCTGGTGGC
PrimerF       -----
PrimerR       -----GTGTTGTGCTCCTSCG
                          **  **  *****  *

CONTIG          GNTNTCAAG----CCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGNGGANCCGAGCTCGA
Serratia       GGTGTCCGATACCCCGGTGACCATCCTCGATCCGAAATGCACCGCCAAAAC TTTCCCGGA
PrimerF       -----
PrimerR       KYTDTC-----
                          *  **

CONTIG          NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-----
Serratia       CTATTTTGAGCAGTTGGCGCGCATCAGCCAATTGGCGTAACC
PrimerF       -----
PrimerR       -----

```

*En la figura primerF y primerR se refieren a cebador iniciador y cebador reverso, respectivamente, por sus nombres en inglés

IV. DISCUSIÓN

A. Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico se realizó con el kit (ver sección Métodos). En los primeros intentos de esta extracción el kit no producía los resultados esperados (ver Cuadro 3). La calidad del ADN era muy mala y las concentraciones muy bajas como para poder realizar la digestión del mismo. Es por esto que se intentó la extracción de ADN genómico con el protocolo de Trizol. En este caso, la cantidad de células utilizadas al inicio del procedimiento no deben exceder la cantidad de mL de Trizol utilizados (Invitrogen, Trizol Reagent, 15596-026), es por esto que se midió la cantidad de células con espectrofotometría al inicio de cada procedimiento con Trizol. Los resultados de calidad y cantidad de ADN con el protocolo con Trizol tampoco fueron los esperados (ver Cuadro 4) y es por eso que, luego de varias modificaciones del mismo, se realizó otro tipo de procedimiento. Este procedimiento consistió en la extracción de ADN genómico por medio de la separación de fases utilizando Cloroforma:alcohol isoamílico. En este caso también se midió el OD a 600 nm para determinar la cantidad de bacterias a utilizar al inicio de cada procedimiento. Como se puede observar en el Cuadro 5, los resultados de calidad y cantidad de ADN tampoco fueron los esperados, aún probando varias modificaciones.

Luego de probar varios métodos, se realizó una inspección del espectrofotómetro en el cual se realizaron las mediciones de la cantidad de células inicial para cada procedimiento, las mediciones variaban varios decimales entre cada una y es por esto que los procedimientos no producían resultados esperados. En el caso del kit, como el mismo funciona con columnas, se cree que la cantidad de ADN y de restos celulares saturaba la membrana de sílica de la columna por la cual se intentaba eluir y purificar el ADN. Se intentó extraer ADN con el kit utilizando una menor cantidad de células bacterianas al inicio del procedimiento, con esto se obtuvieron mejores resultados (ver Cuadro 6). Como se observa en la Figura 11, el ADN genómico extraído es de buena calidad, tiene una

buena integridad y se encuentra a la concentración deseada para poder seguir con el protocolo de clonación génica.

B. Extracción del plásmido pUC19.

Se logró extraer el plásmido pUC19 utilizando el kit de extracción mencionado con anterioridad (ver sección Métodos). Este plásmido posee el gen *lac z* el cual confiere una enzima betagalactosidasa (Figura 8), la cuál es responsable de la hidrolización del sustrato X-gal, lo cuál resulta en coloración azul. Además el plásmido posee un gen de resistencia a ampicilina, y un sitio de múltiple clonamiento con sitios de corte de enzimas de restricción, el cual interrumpe el gen de la betagalactosidasa. Todos estos elementos fueron importantes para la selección y tamizaje de los clones, la cuál será discutida más adelante, y es por esto que era imprescindible su buena extracción.

C. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y digestión del plásmido con enzimas de restricción.

En el caso de la digestión de ADN genómico, se realizó una digestión parcial. Esto para producir muchos fragmentos de diferentes tamaños, que se sobrepusieran entre sí, de esta manera asegurando que se representara el genoma completo del organismo en distintos fragmentos de ADN. En especial se buscaban tamaños de 4 a 2 kb, ya que son los tamaños de los genes de resistencia a tetraciclina y de resistencia al glifosato, respectivamente. Una digestión completa podría haber producido fragmentos de un solo tamaño determinado o producir fragmentos específicos. Como no se sabía la identidad del gen, se buscó variabilidad en los fragmentos, por lo mismo fue necesaria la digestión parcial.

En la Figura 12, se puede observar que la enzima que produjo mejores resultados fue Pst I. Esto debido a que, los cortes de ADN producidos por esta enzima generan mayor cantidad de fragmentos del tamaño esperado. Como se observa en la figura, el ADN no se encuentra concentrado en tamaños mayores, como es el caso de Hind III. La enzima Hind III corta fragmentos del tamaño esperados, pero también deja fragmentos de muy

gran tamaño, que se observan en las bandas de 10 y 6 kb. Estos fragmentos grandes dificultan la clonación, ya que por su gran tamaño es menos probable que se unan al vector utilizado, pUC19 (Nicholl 2008). Es por esto que, desde un principio, se esperaba que Pst I generara mejores resultados en la clonación genética que Hind III.

Como se puede observar, también en la Figura 12, el mejor tiempo para la digestión parcial fue 120 minutos de incubación a 37° C. Es en este tiempo en donde, una vez más, se observa una menor cantidad de ADN en tamaños de 10kb y 6 kb, las bandas en este tiempo de incubación, para ambas enzimas, son más tenues o inexistentes. Es por esto que fue el ADN predilecto para el resto de procedimientos en la clonación.

En cuanto a la digestión del plásmido pUC19 con Pst I y Hind III, en la Figura 13 se puede observar que se digirió de manera adecuada, esto se debe a que las bandas se encuentran en un mayor tamaño que la banda del plásmido sin digerir, lo que indica que la linearización del mismo fue llevada a cabo de manera correcta. Los plásmidos circulares corren a una mayor velocidad en la electroforesis que los plásmidos linearizados, es por esto que el plásmido intacto se puede visualizar en el gel, en bandas de menor tamaño que el plásmido linearizado (Nicholl 2008)

D. Bibliotecas genómicas.

En este caso, el tamizaje fue realizado con Xgal y ampicilina. Se utilizó Xgal a manera de sustrato de la enzima betagalactosidasa contenida en el plásmido. Como se mencionó anteriormente, la enzima betagalactosidasa hidroliza Xgal como sustrato, produciendo una coloración azul. En el caso de las colonias que poseen inserto en el sitio de múltiple clonamiento, el inserto interrumpe el gen de la betagalactosidasa, lo cuál resulta en la no-hidrólisis del sustrato Xgal y en colonias blancas. Es por esto que en los tamizajes se contaron únicamente las colonias blancas, por lo tanto, las colonias que contenían inserto (Grooms 2009).

La selección se realizó a manera de aislar únicamente los fragmentos que conferían resistencia o resistencia. Es por esto que las bibliotecas genómicas de la muestra fueron inoculadas en placas con glifosato y en tetraciclina. De esta manera se aseguraba que únicamente crecieran colonias con el inserto que confería resistencia y/o resistencia.

Como se mencionó anteriormente, se llevó a cabo una primera prueba de biblioteca genómica utilizando ADN digerido con Pst I. Se intentaron varias proporciones vector:inserto para la ligación, a manera de determinar cuál de ellas era la mejor para la clonación. Se intentaron las proporciones 1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:5. A simple vista se pudo observar que en la proporción 1:1 se encontraba una mayor cantidad de colonias blancas, con respecto a las demás proporciones. Es por esto que fue la proporción utilizada para el resto de bibliotecas genómicas generadas. En esta primera prueba, la biblioteca genómica fue inoculada en placas con 50 mM glifosato, a manera de selección. No se encontró ningún clon en ellas y es por esto que se decidió cambiar la concentración de glifosato en la selección a 25 mM. Las bacterias inoculadas en estas placas vienen de sufrir un procedimiento de choque térmico, debido a la transformación. Estas bacterias se encuentran débiles y puede ser que esto afecte su crecimiento, es por esto que se quiso que crecieran en una menor concentración de glifosato. De igual manera, el punto de corte para determinar si una bacteria es o no resistente al glifosato es su crecimiento en 25 mM (Yi-Cheng *et al* 2005), el cambio de concentración de glifosato a una menor concentración no representaba ningún problema en la selección del rasgo.

La siguiente biblioteca genómica fue generada con PstI y Hind III. Como se puede observar en el Cuadro 7, se obtuvo una mayor cobertura del genoma (99%) utilizando la enzima Pst I que utilizando la enzima Hind III (24%). Habían más colonias blancas en la biblioteca genómica PstI que en la biblioteca genómica Hind III (Figuras 38, 39 y 40). Se encontraron 2 clones resistentes a tetraciclina nombrados Tet1 y Tet2. (Figuras 14 y 15) Ambos clones, pertenecen a la biblioteca genómica PstI, lo cual era de esperarse ya que con esta biblioteca genómica se logró una mayor cobertura del genoma, por lo tanto existía una mayor probabilidad de encontrar clones con inserto de resistencia.

Una vez más, se una generó utilizando las enzimas PstI y Hind III en proporción vector:inserto 1:1. En este caso, como se puede observar en el cuadro 8, se obtuvo una mayor cobertura del genoma utilizando la enzima PstI (51.6%) que con la enzima Hind III (9%). Se encontró una mayor cantidad de colonias blancas en la biblioteca PstI que en la biblioteca Hind III (Figuras 41, 42 y 43). Se encontraron cinco clones resistentes a 25 mM glifosato, los cuales fueron nombrados Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo4 y Glifo5. En la Figura 17 se pueden observar las colonias resistentes a glifosato. Estos clones pertenecen a la biblioteca genómica Pst I, esto era de esperarse ya que en esta biblioteca genómica se realizó una mayor cobertura del genoma. La cobertura del genoma por PstI no es la esperada, ya que el 51.6% de cobertura es bastante bajo para lograr la clonación del elemento/s que confiere/n resistencia. Sin embargo, se encontraron clones resistentes al glifosato, lo que podría significar que la enzima es apta para el clonamiento de este elemento en específico y que se necesita optimizar el procedimiento de clonación para realizar una mayor cobertura del genoma y encontrar una mayor cantidad de clones.

El patrón de corte de las enzimas Hind III y PstI es diferente, a continuación se muestra la figura de ambos patrones de corte:

Figura 35. Sitio de corte de las enzimas PstI y Hind III



(Fuente: New England Biolabs 2011)

El genoma de *Serratia marcescens* tiene un contenido de CG del 60% (NCBI), como se puede observar en la figura, PstI tiene en su secuencia de corte un mayor contenido de C y G que Hind III, por lo que era de esperarse que, en *Serratia*, PstI tuviera más sitios de corte, produjera mayor cantidad de fragmentos y fuera más probable la clonación de

algún elemento de resistencia a tetraciclina o glifosato ya que se buscan fragmentos de tamaño pequeño.

Se repitió una vez más la biblioteca genómica de la muestra utilizando la enzima PstI y en proporción vector:inserto 1:1. En este caso se obtuvo una cobertura del genoma menor, como se muestra en el Cuadro 9, pero una mayor cantidad de clones. Esto podría significar que se necesita una mayor cobertura del genoma para clonar todos los elementos que confieren resistencia, probablemente se está clonando únicamente uno de los elementos.

La variación en la cobertura del genoma de una siembra a otra se puede deber a errores sistemáticos. Se realizaron extracciones de ADN separadas, digestiones ligaciones, la transformación, los medios de cultivo y los cultivos bacterianos se realizaron por separado, gracias a esto se pierde eficiencia en el procedimiento y en la clonación del elemento de interés.

E. Clones Tet1 y Tet2 con inserto que confiere resistencia a tetraciclina.

A manera de determinar si realmente se había logrado clonar el gen de resistencia a tetraciclina y caracterizar el fenotipo, los clones Tet1 y Tet2 fueron re-sembrados en placas con tetraciclina 1.2 μ M (misma concentración que se utilizó para la selección). Debido a que los clones aparecieron en la placa a las 72 horas de la siembra, se podía pensar que éstas bacterias podrían ser bacterias creciendo encima de células muertas y no bacterias con resistencia. El crecimiento de los clones Tet1 y Tet2 a las 24 horas de incubación determinó que sí se había logrado clonar el elemento que confería resistencia a tetraciclina. Como se muestra en la Figura 16, las células *E.coli* DH5 α no crecen en placas con tetraciclina, esto asegura que el inserto es el que confiere resistencia al antibiótico. Para asegurar esto, se realizaron más análisis los cuales serán discutidos en las secciones próximas.

F. Clones Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo4 y Glifo5. Caracterización de los fenotipos realizando curvas de crecimiento bacteriano y análisis de MIC.

Los clones Glifo1, Glifo2, Glifo3, Glifo4 y Glifo5 aparecieron en las placas 25 mM glifosato a las 72 horas de incubación. A manera de determinar y caracterizar el fenotipo de estos clones resistentes al glifosato y determinar que no eran bacterias creciendo sobre células muertas, se realizó una re-siembra de los mismos en placas 25 mM de glifosato. En esta re-siembra únicamente crecieron los clones Glifo1 y Glifo 2, ambos a las 24 horas de incubación. Los demás clones (Glifo3 al 5) pertenecían a colonias bacterianas muy pequeñas y muy cercanas a los clones Glifo1 y Glifo2 que sí mostraron resistencia en la re-siembra. Podría ser que los clones Glifo 3 al 5 fueran colonias satélites y no realmente clones resistentes al glifosato. El glifosato entra a la célula bacteriana en donde el mismo se une a la enzima EPSPS en su sitio activo o pasa a ser metabolizado por las enzimas glifosato oxidasa, glifosato oxidorreductasa o la C-P liasa. También puede ser convertido en N-acetilglifosato por medio de la enzima glifosato acetiltransferasa (Pollegioni *et al* 2011). En cualquiera de los casos, el glifosato debe ingresar a la célula, el consumo del mismo hace que el glifosato se remueva del medio, dando paso a que colonias satélites, que no poseen resistencia al glifosato, puedan crecer en el área en donde el glifosato ya no se encuentra presente en la placa, la cual es alrededor de las colonias resistentes. Esto explicaría la presencia de estas colonias (Glifo3 al 5) y la proximidad de las mismas a los clones que sí mostraron resistencia (Glifo1 y 2).

Siguiendo con la caracterización del fenotipo, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano a once diferentes concentraciones de glifosato. Como controles se utilizaron la muestra original Mx3 (*Serratia marcescens*) y *E.coli*DH5 α . Las bacterias *E.coli*DH5 α se utilizaron como control debido a que éstas, por no estar transformadas y ser una *E.coli* no presentan ninguna resistencia al glifosato. Se utilizó como control Mx3 para comparar los nuevos clones resistentes al glifosato con la muestra original que ya poseía resistencia al glifosato (75 mM), de esta manera se podía determinar si se había logrado clonar un elemento solo o el elemento completo que confería resistencia al glifosato.

En la Figura 19 se puede observar las curvas de crecimiento logarítmicas del clon Glifo1 comparado con los controles. Como se observa en la figura, el clon Glifo1 únicamente logró crecer a 25 mM glifosato, contrario a la Mx3 que creció a 75 mM (como era lo esperado). *E.coli* DH5 α logró crecer únicamente a 10 mM glifosato. Es decir, la MIC para Glifo1 es de 50 mM glifosato. En el Cuadro 10, se puede observar el valor p calculado para Glifo1 vs *E.coli* DH5 α y vs Mx3. Como se mencionó anteriormente, el valor p se utiliza para determinar si dos muestras se encuentran relacionadas o no. El valor p para *E.coli* DH5 α es 0.0039, esto es menor a 0.05, lo cual indica que *E.coli* DH5 α y Glifo1 no están relacionados. Esto era de esperarse, ya que *E.coli* DH5 α es una bacteria que no es resistente al glifosato y Glifo1 sí mostró resistencia. En cuanto a Mx3, el valor p con relación a Glifo1 fue de 0.0079. Este valor también es menor a 0.05, lo cual muestra que Mx3 mantiene un comportamiento diferente a Glifo1. En la Figura 20 se puede observar el análisis de sobrevivencia acumulada de Glifo1 vs *E.coli* DH5 α . En la figura se muestra cómo *E.coli* DH5 α deja de crecer o sobrevivir a 10 mM glifosato, contrario a Glifo1, el cual sobrevive hasta 25 mM glifosato, en 50 mM glifosato se ve el punto de corte en donde Glifo1 deja de sobrevivir. Un vez más, esto era de esperarse ya que *E.coli* DH5 α no debería de mostrar resistencia al glifosato, contrario a Glifo 1. En la Figura 21 se puede observar el análisis de sobrevivencia acumulada de Glifo1 vs Mx3. En la figura se muestra cómo Glifo1 deja de sobrevivir a 50 mM mientras que Mx3 deja de sobrevivir hasta 80 mM. Esto no es lo esperado, ya que se esperaba que Glifo1 se comportara de igual manera que Mx3, ya que se esperaba haber clonado el elemento que confería resistencia al glifosato.

En la Figura 22 se puede observar las curvas de crecimientos logarítmicas del clon Glifo2 comparado con los controles. Como se observa en la figura, *E.coli* DH5 α creció únicamente hasta 10 mM glifosato, lo cual era de esperarse ya que éste no posee ninguna resistencia al glifosato. Mx3 logró crecimiento hasta 75 mM, lo cual también era de esperarse ya que es la resistencia que posee esta muestra. El clon Glifo2 únicamente creció hasta 25 mM, es decir, su MIC es 50 mM, como se muestra en el Cuadro 11. También el Cuadro 11, se puede observar los valores p de Glifo2 contra *E.coli* DH5 α y Mx3. El valor p con respecto a *E.coli* DH5 α es de 0.0039, el cual es menor que 0.05, con

lo que se determina que ambas muestras no se encuentran relacionadas. El valor p con respecto a Mx3 es de 0.0079, menor a 0,05, con lo cuál se demuestra una vez más que Mx3 y Glifo2 no se encuentran relacionadas entre sí. En la Figura 23, se puede observar el análisis de sobrevivencia acumulada de *E.coli* DH5 α con respecto a Glifo2. Como se observa en la figura, *E.coli* DH5 α deja de sobrevivir a 10 mM glifosato contrario a Glifo2, el cuál sobrevive hasta 25 mM glifosato. En la Figura 24, se observa el análisis de sobrevivencia acumulada de Glifo2 contra Mx3. Se puede observar que Glifo2 deja de sobrevivir a 50 mM, mientras que Mx3 sobrevive hasta 75 mM, es decir no hay sobrevivencia a 80 mM. Una vez más, esto no era lo esperado ya que se esperaba haber clonado el elemento que confería resistencia al glifosato, por lo tanto Glifo2 debería de comportarse como Mx3.

En la Figura 22 se puede observar que la variabilidad en los conteos para realizar la curva de crecimiento es bastante alta, es decir las barras de error son bastante altas para el clon Glifo 2. Esto puede deberse a la inestabilidad del plásmido en la bacteria. Esta inestabilidad podría afectar el crecimiento de la bacteria lo cual se ve reflejado en los conteos de colonias para hacer las curvas. También podría deberse a errores técnicos o sistemáticos de conteo de placas, ya que estos se hacen al ojo o errores sistemáticos de siembra.

Como se mencionó anteriormente, existen varias formas en las cuales una bacteria puede ser resistente al glifosato. Puede ser por medio de la expresión de una forma insensible de la enzima EPSPS hacia el glifosato o por medio de la detoxificación del glifosato en la molécula. La forma insensible de la enzima EPSPS al gifosato se da debido a mutaciones en la enzima original . La detoxificación del glifosato en la célula podría suceder de varias maneras, metabolizando el glifosato o expulsándolo de la célula por extrusión. El metabolismo del glifosato puede ser utilizando la enzima C-P liasa, la cuál rompe un enlace carbono del glifosato dando como productos fosfato y sarcosina (Pollegioni *et al* 2011). Otro metabolismo es el rompimiento oxidativo del enlace carbono-nitrógeno por la enzima glifosato oxidorreductasa, produciendo AMPA y glioxilato. Ambas rutas metabólicas requieren para funcionar un número de genes que

aún es desconocido y se encuentran presentes en bacterias Gram positivas y Gram negativas del suelo (Pollegioni *et al* 2011). Los resultados variados dentro de Mx3 y Glifo1 y Glifo2 podrían explicarse gracias a estos mecanismos metabólicos. Puede ser que Mx3 posea una resistencia metabólica o basada en extrusión, la cuál podría ser multigénica, en lugar de una resistencia unigénica (como sería la mutación de la enzima EPSPS), en ambos casos (Glifo1 y Glifo2) podría ser que únicamente se clonó alguno de los elementos que confieren resistencia al glifosato por vía de detoxificación. Esto explicaría el descenso de la resistencia de los clones de 75 mM (que deberían de haber tenido si se hubieran clonado todos los elementos) a 25 mM de glifosato. También se sabe que ciertas mutaciones de la enzima EPSPS no son favorables para la resistencia al glifosato, disminuyen la resistencia al mismo y también la afinidad de la enzima al sustrato PEP (ver sección Antecedentes) (Pollegioni *et al* 2011). Una pequeña mutación en la enzima puede alterar su comportamiento y comprometer su resistencia al glifosato (Pollegioni *et al* 2011). Podría ser que en el clonamiento se hayan dejado fuera ciertos fragmentos de la enzima claves para su funcionamiento y que el inserto que confiere resistencia a Glifo1 y Glifo2 sea un inserto incompleto que confiere resistencia únicamente a 25 mM, es decir, un elemento incompleto que compromete la resistencia al glifosato que se debería de tener si se clonara el elemento entero que confiere la resistencia a 75 mM.

G. Plásmidos Tet1, Tet2, Glifo1 y Glifo2.

Para poder realizar la secuenciación de los insertos, se extrajo los plásmidos con inserto que conferirían resistencia de Tet1, Tet2, Glifo1 y Glifo2. En la Figura 21, se puede observar la electroforesis de los plásmidos mencionados. Los plásmidos Tet1 y Tet2 tienen un aumento de tamaño de 6 kb, con respecto al plásmido pUC19 sin inserto. Este tamaño es un poco mayor al esperado, ya que el gen de resistencia a tetraciclina es de 4 kb, puede ser que se haya clonado el gen entero con otros elementos extras. Los plásmidos Glifo1 y Glifo2 tienen un aumento de tamaño de 4 kb con respecto a puC19 sin inserto. Ambos insertos poseen un tamaño mayor al esperado, 2 kb, por lo que es necesario la secuenciación de los mismos para determinar con exactitud qué es lo clonado.

En la clonación se buscaba clonar fragmentos de tamaño del gen de interés, pero que los plásmidos posean un inserto de mayor tamaño que el esperado puede ser provechoso. Se podrían haber clonado muchos elementos y dentro de estos estar el gen de interés. De esta manera se puede subclonar el elemento que confiere la resistencia que se está deseando clonar.

H. Secuenciación de los insertos.

Se intentó clonar el gen de resistencia a tetraciclina de la muestra debido a que éste es el gen de resistencia a antibióticos más común que aparece en la naturaleza bacteriana. Además, como se mencionó anteriormente, el tamizaje de la muestra en diferentes antibióticos demostró que la muestra poseía algún elemento que confería resistencia a tetraciclina. Es decir, la clonación de la resistencia a tetraciclina se utilizó como un control en la clonación de genes bacterianos por el método de biblioteca genómica. Como se observa en el Cuadro 12, el resultado de los insertos que confieren resistencia a tetraciclina indican que se logró clonar un transportador de ATPasa, es decir un transportador del tipo ABC. Esto indicado por el cebador M13R. También como se observa en el Cuadro 12, el cebador M13 secuenció un transportador de electrones. Se utilizó la secuencia de consenso que aparece en el Cuadro 13 para determinar si las secuencias de M13F y M13R se alineaban. Con esta secuencia de consenso se obtuvo que lo clonado fue el transportador de tipo ABC. Como se mencionó en la sección de antecedentes, la resistencia al antibiótico tetraciclina puede darse por medio de transportadores, protección del ribosoma o modificación enzimática de la tetraciclina (Collard 1999). En este caso, la resistencia parece provenir de un transportador, el cual logró ser clonado por el método de biblioteca genómica. Este tipo de transportadores los utiliza la célula para la eliminación de toxinas o productos que pueden ser dañinos para la misma y funcionan en base de hidrólisis de ATP.

Debido a que no se podía llegar a un consenso de lo clonado se tomaron las secuencias y por medio de NCBI se determinó su lugar en el genoma de *Serratia* sp. A continuación

se muestran las figuras de dónde se encuentran el transportador de electrones y el transportador ATPasa secuenciados por los cebadores M13F y M13R, respectivamente:

Figura 36. Lugar en el genoma de *Serratia* sp. en donde se encuentra el gen del transportador de electrones clonado, secuenciado con el cebador M13F

Serratia sp. AS13 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_017573.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

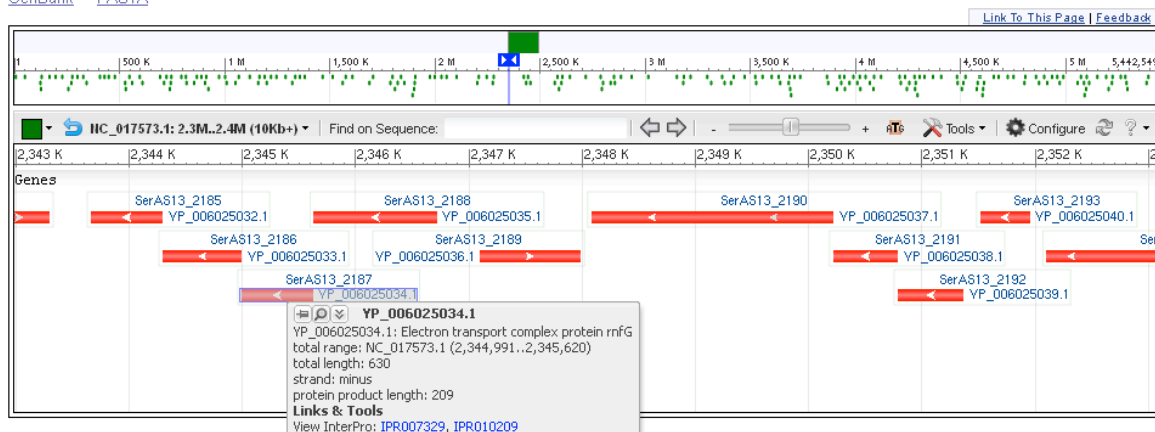
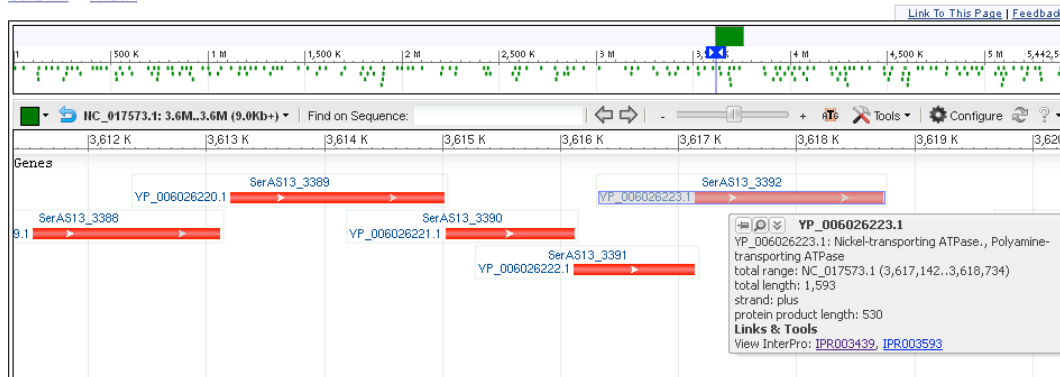


Figura 37. Lugar en el genoma de *Serratia* sp. en donde se encuentra el gen del transportador ATPasa clonado, secuenciado con el cebador M13R

Serratia sp. AS13 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_017573.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



Como se observa en las figuras anteriores, la secuencia resultante de los cebadores M13F y M13R va en el sentido contrario de cómo debería ser. Es decir, los fragmentos secuenciados se encuentran insertados en el plásmido de 3' a 5'. Además, si se toman los genes de 6 kb antes del gen secuenciado con M13F y 6kb después del gen secuenciado

con M13R, las secuencias no concordan y no existe un punto de encuentro en los genes. Se buscaron estas secuencias en el genoma de *Serratia* sp. AS13 y a continuación se muestra el cuadro con los genes mencionados:

Cuadro 16. Genes 6kb antes y 6 kb después de las secuencias dadas por los cebadores M13F y M13R

Gen de referencia	Gen encontrado	Ubicación en el genoma (kb)
Transportador de electrones, genes 6kb antes en el genoma	Regulador transcripcional de la familia AraC	2, 345
	Complejo de proteínas mFE transportadoras de electrones	2, 344
	Complejo de proteínas mFG transportadoras de electrones	2, 345
	Endonucleasa III	2, 343
	Xilan 1,4-beta-xilosidasa	2, 342
	Azúcar (Glucosido-Pentosido-Hexuronido)	2, 340
Transportador del tipo ATPasa, 6 kb después en el genoma	Proteína hipotética	3, 618
	Familia Bcr/CflA de resistencia a multidroga	3, 619
	Pseudoridina sintasa RSU	3, 620
	Subunidad res de la proteína de restricción tipo III	3, 621

Como se observa en el cuadro, no existe un punto de encuentro entre lo secuenciado con el cebador delantero y el reverso. Lo más probable entonces, es que haya sucedido concatenación. Gracias a los extremos cohesivos que se producen por las enzimas de restricción, se podrían haber unido dos fragmentos diferentes y formado concatenación. Además, como se mencionó anteriormente, ambos se unieron en sentido contrario 3' a 5' lo cual hace difícil la determinación de qué fue exactamente lo clonado y cuál es el

elemento que confiere la resistencia a tetraciclina. Por la lista de genes que se observa en el cuadro 16, se cree que la resistencia proviene de la proteína que pertenece a la familia Bcr/CFIA de resistencia a multidrogas.

Para determinar exactamente qué es lo que confiere la resistencia, se podría digerir el plásmido para poder observar realmente cuántos insertos posee. En caso de que hubieran dos insertos, estos se podrían extraer y clonar, secuenciar y luego subclonar el gen que se cree que confiere la resistencia, empezando con el mejor candidato, el cual es la proteína de la familia Bcr/CFIA de resistencia a multidrogas mencionada anteriormente.

Para poder concluir si se ha validado o no el método de clonación por biblioteca genómica de este gen y de esta resistencia en particular, es necesario este subclonamiento y la confirmación por medio de secuenciación.

Las secuencias de Glifo1 y Glifo2 no tienen similitudes significantes con ninguna secuencia. Esto se debe a que las secuencias son cortas (~250 pb) y probablemente se unen a muchas secuencias en la base de datos, con lo que no se puede determinar una homología a algo en específico. Los resultados de la secuenciación de Glifo 1 y Glifo 2 no permiten la identificación de los insertos. Como se mencionó anteriormente, se intentó una segunda secuenciación y no se logró extraer el plásmido, tanto de Glifo1 y 2, como de G1 a G6. Esto puede deberse a que el inserto en el plásmido contiene regiones de ADN tóxicas o inestables, las cuales son eliminadas por los sistemas de delección y reparación de ADN de la bacteria. También podría ser que el inserto posea algún tipo de toxicidad a la bacteria y es por esto que cuando se intenta crecer el plásmido en medio con glifosato o ampicilina la bacteria muere (Stratagene 2008).

Si se observan las colonias en las bibliotecas genómicas, se pueden observar colonias blancas con un punto azul en medio. Esto indica que en ellas existen bacterias que poseen una mutación, las cuales han perdido el inserto y es por esto que poseen coloración azul. Este fenotipo, es un fenotipo de pérdida de inserto, lo cual podría explicar la toxicidad del mismo.

Cabe mencionar que todos los aislamientos de los clones se realizaron en placas con glifosato y no ampicilina. Gracias a esto se podría haber perdido el plásmido y es por esto que no se logró la extracción del mismo una segunda vez.

El herbicida glifosato utilizado (marca Roundup) en todos los medios para el crecimiento bacteriano posee un surfactante llamado polioxietil amina y componentes inertes denominados seboaminas etoxiladas (Monsanto 1999). Estos componentes podrían tener efecto en la selección de los insertos de resistencia al glifosato. Podría ser que se esté seleccionando un rasgo de resistencia hacia estos componentes y no hacia el glifosato en sí. Es por esto que se debería de utilizar la sal pura en la preparación de los medios, para eliminar la posibilidad de resistencia hacia los componentes no deseados.

Para poder dar una conclusión de la identidad del gen de resistencia a glifosato, se debe repetir la secuenciación de los insertos o realizar de nuevo la clonación.

I. Cebadores degenerados para la amplificación del gen de resistencia a glifosato.

En el Cuadro 16, se muestra la secuencia de los cebadores degenerados diseñados para la amplificación del gen de resistencia a glifosato. Se realizaron varias pruebas con los cebadores degenerados a manera de optimizar la PCR. En la Figura 26, se puede observar el fragmento amplificado por los cebadores degenerados, éste posee un tamaño de aprox. 1-1.2 kb. Es el tamaño esperado, ya que los cebadores deberían de amplificar un fragmento de aprox. 1200 bp sin embargo, el gen de resistencia al glifosato es de aprox. 2 kb, con lo que estos cebadores no amplifican lo suficiente como para poder clonar el gen entero. Se realizó la clonación del fragmento y se obtuvieron 127 colonias con inserto, como se puede observar en la Figura 27. Sin embargo, estas colonias no eran completamente blancas, tenían una pequeña colonia azul creciendo encima. Esto se debe a que el inserto es muy pequeño, generalmente 500 bp o menor y existe interrupción del gen lacZ pero no en su totalidad (Invitrogen, K2000-01, EEUU). Se tomaron únicamente las colonias blancas y se re-sembraron en Xgal y kanamicina, también en 25 mM

glifosato. Como se puede observar en la Figura 28, únicamente se obtuvieron nueve colonias totalmente blancas con inserto, las cuales fueron aisladas en medio con kanamicina. Ninguna colonia creció a 25 mM glifosato (figura 53), lo cual era de esperarse, ya que como se mencionó con anterioridad, el producto de PCR es muy pequeño y no cubre en su totalidad el gen de resistencia a glifosato. Se extrajo el plásmido de las colonias PCRG3, PCRG13, PCRG36, PCRG52, PCRG69 y PCRG80. Al observar los plásmidos se puede determinar que el tamaño de los mismos está entre 2 y 4 kb, corroborando una vez más que el inserto es muy pequeño para contener el gen de resistencia a glifosato completo.

Como se mencionó anteriormente, gracias a la secuenciación se determinó que los clones PCRG52, PCGR87 y PCRG100 sí poseen insertos que su secuencia pertenece a parte de una enzima EPSPS de *Serratia* sp. Con la secuencia de consenso en la Figura 33 y la alineación de los cebadores degenerados en la Figura 34, se comprobó que los cebadores degenerados sí amplificaron parte de esta enzima y que sí son funcionales para la muestra que se está utilizando.

Para realizar la clonación por este método, se deben utilizar las secuencias obtenidas por medio de estos cebadores, ir hacia fuera de los genes a manera de extender la secuencia para poder tomar toda la secuencia de la enzima, realizar la alineación de estas secuencias y diseñar cebadores para la enzima EPSPS entera de *Serratia* sp. a manera de poder amplificarla completa y así clonarla.

J. Limitantes de la investigación.

Como limitantes de esta investigación, se puede mencionar que la cepa utilizada es una *Serratia marscecens* proveniente del campo. Esto limita la investigación en que esta cepa no se comporta como las cepas modelo (como una *E.coli* por ejemplo, ya caracterizada y comercializada para su uso en el laboratorio). Con esto, se asume que la cepa seguirá ciertos modelos, como en las curvas de crecimiento, los cuales podría no seguir con

precisión ya que esta cepa de campo vive en condiciones diferentes a las controladas de laboratorio.

A sí mismo, por ser una cepa de campo, no se sabe con exactitud la secuencia de los genes que le confieren resistencia a tetraciclina y a glifosato. Esto limita varios aspectos de la metodología. Entre estos se puede mencionar la posibilidad de diseñar cebadores específicos para la amplificación de estos genes y poder realizar la clonación en una menor cantidad de tiempo y de manera más eficiente. Tampoco se sabe si las resistencias provienen de la acción de un solo gen o de varios. Esto es contraproducente para el método elegido en la investigación, ya que si las resistencias fueran conferidas por varios genes, los métodos elegidos no serían los más adecuados para la clonación de los elementos que confieren resistencia.

Por último, cabe mencionar que la secuenciación de insertos no siempre es de buena calidad y puede proporcionar secuencias que no dan mucha información sobre los genes que se quieren estudiar, con lo que se dificulta la identificación de los insertos y por lo tanto continuar con la investigación.

V. CONCLUSIONES

- A. Se logró la clonación de un elemento que confiere resistencia a tetraciclina utilizando el método de biblioteca genómica. La enzima a utilizar para realizar dicha clonación es PstI, y la mejor proporción vector:inserto es 1:1, ya que con esto se logra la clonación y una cobertura del genoma del 99%. Los clones Tet1 y Tet2 lograron crecimiento a las 24 horas en placas con tetraciclina 1.2 μ M, lo que demuestra que son resistentes a tetraciclina y poseen un inserto de 6 kb en donde probablemente se encuentre un elemento que confiere resistencia a tetraciclina. Para asegurar esto se debe subclonar y el gen candidato es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas resistentes a multidroga.
- B. Se logró la clonación parcial del gen o genes de resistencia al glifosato utilizando el método de biblioteca genómica. La enzima a utilizar para realizar dicha clonación es PstI, ya que con la misma se logra una clonación parcial y una parcial cobertura del genoma. Sin embargo, es necesario optimizar el protocolo de dicha clonación. Los clones Glifo1 y Glifo2 lograron crecimiento a las 24 horas en placas con 25 mM glifosato, lo que demuestra que son parcialmente resistentes al glifosato. Contrario a éstas, los clones Glifo3, Glifo4 y Glifo5 no eran clones resistentes al glifosato, probablemente eran colonias satélites. Los clones Glifo1 y Glifo2 poseen un inserto de 4 kb en donde probablemente se encuentre el elemento que confiere resistencia parcial al glifosato.
- C. Se llevó a cabo una caracterización fenotípica y análisis estadístico de la resistencia de Glifo1 y Glifo 2 a glifosato. Los clones aislados pertenecen a un grupo distinto que *E.coli* DH5 α y que Mx3, según el análisis estadístico Kaplan Meier, lo que indica una clonación parcial de el o los elementos que confieren resistencia. La clonación parcial del rasgo de resistencia a glifosato en Glifo1 y Glifo2, podría deberse a que la resistencia no es unigénica, sino que ésta se encuentra en rutas metabólicas multigénicas.

- D. La secuenciación de los fragmentos clonados para Glifo1 y Glifo2 no permitió la identificación del elemento que confiere resistencia parcial a glifosato. Se intentó una segunda secuenciación pero no se logró el crecimiento de los clones. Se cree que esto podría deberse a delección del inserto porque podría ser tóxico, pérdida del plásmido por no realizar los cultivos con antibiótico o algún efecto del surfactante y/o componentes inertes del glifosato que tengan efecto en la selección bacteriana.
- E. No se logró validar el protocolo de clonación por PCR para resistencia a glifosato, los cebadores degenerados diseñados para clonar la resistencia a glifosato amplifican un fragmento de un poco más de 1 kb, lo cual no será suficiente para la clonación del elemento completo en un solo paso de PCR.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda determinar que el equipo a utilizar funcione correctamente antes de iniciar el procedimiento de clonación, para evitar percances como el sucedido en la extracción de ADN genómico de esta investigación.
- B. Se recomienda intentar la clonación del gen de resistencia al glifosato con otras enzimas de restricción ya que éstas podrían dar mejores resultados que las utilizadas en esta investigación. Podría haber alguna enzima que clone el elemento completo que confiere resistencia a glifosato.
- C. Intentar la clonación del gen de resistencia al glifosato con otras proporciones vector inserto utilizando la enzima PstI a manera de intentar realizar una mayor cobertura del genoma en la clonación.
- D. Repetir la secuenciación de los insertos, a manera de poder concluir con estas secuencias qué es exactamente lo clonado.
- E. Utilizar el compuesto puro o sal pura de glifosato en las preparaciones de medios para eliminar la posibilidad de efectos que puedan tener el surfactante y/o compuestos inertes en la selección bacteriana.
- F. Utilizar un kit de extracción de plásmido diferente para los plásmidos Glifo1, Glifo2, G1 a G6. Debe ser un kit que permita la extracción de plásmidos de gran tamaño, a manera de eliminar la posibilidad de problemas con el kit de extracción para una segunda secuenciación de los plásmidos.
- G. Optimizar los cebadores degenerados para propiciar la amplificación completa del gen y proveer una alternativa más sencilla para su clonación.

- H. Optimizar el método de clonación del gen de resistencia al glifosato utilizando cebadores degenerados ya que éste podría ser un método mucho más simple para la clonación de dicho gen.

VII. LITERATURA CITADA

- Alberts, Bruce; *et al.* 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed. Nueva York, Garland Science.
- Alberts, Bruce; *et al.* 2004. *Molecular Biology of the Cell*. 5^a ed. Nueva York, Garland Science
- Bakken, R Lars. 1985. << Separation and purification of Bacteria from Soil>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(6): 1482-1487.
- Becker, Wayne; *et al.* 2007. *El mundo de la célula*. 6^a ed. Madrid, Pearson.
- Cardona, Hugo. 2006. << Importancia relativa del sector agrícola nacional>>. *Centro de Información Agrosocioeconómica (CIAGROS)*. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Chan, Y W. 1990. <<Biostatistics 203. Survival analysis>>. *Singapore Med J*. 45(6): 249-256
- Chaoyang, Lin; *et al.* 2008. <<A Built-In Strategy for Containment of Transgenic Plants: Creation of Selectively Terminable Transgenic Rice>>. *PLoS ONE*. 3(3): 1-6.
- Collard, Jean Marc. 1999. *Tetracycline resistance*. Service of Biosafety and Biotechnology. Bélgica.
http://www.antibioresistance.be/Tetracycline/Menu_Tet.html. Consultado: Julio 2012

Cortazar, Adriana; E. Silva. 2004. *Métodos físico-químicos en biotecnología. PCR*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 40 págs.

Dardón, Elena. Mayo 2011. Entrevista. Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, C.A. E-mail: e_fresse@yahoo.com. Tel: 46181894

Dill, Stephen. 2005. << Glyphosate-resistant crops: history, status and future >>. *Pest Management Science*. 61: 219-224.

Duke, Stephen y S. Powles. 2008. << Glyphosate: a once-in-a-century herbicide >>. *Pest Management Science*. 64: 319-325.

Expression Technologies. 2003. *Toxic protein cloning and expression*.

<http://www.exptec.com/Expression%20Technologies/Toxic%20protein%20cloning%20and%20expression.htm> Consultado: Julio 2012

Fitzgibbon, Joseph y H. Braymer. 1990. <<Cloning of a Gene from *Pseudomas* sp. Strain PG2982 Conferring Increased Glyphosate Resistance>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(11): 3382-3288.

Grooms, Kelly. *Selecting The Right Colony: The Answer Is There in Blue and White*.

<http://promega.wordpress.com/2009/05/28/selecting-the-right-colony-the-answer-is-there-in-blue-and-white/> Consultado: Mayo 2012

Higgins, Christopher. 2001. <<ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview>>. *Res. Microbiol.* 152: 205-210.

James, Clive. 2011. <<Situación mundial de cultivos biotecnológicos/MG en 2011>>. *International Service for the Acquisition of Agro-Biotech Applications (ISAAA)*. USA.

Jin, D; *et al.* 2008. <<Isolation and Characterization of a New Glyphosate-Resistant Strain from Extremely Polluted Environment>>. *Wei Sheng Bao*. 48(6): 824-828

Luria, S. y Delbruk, M. 1943 <<Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance>>. *Genetics*. 28: 491-511

Mahon, Connie; *et al.* 2007. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3^a ed. Missouri, Saunders.

Monsanto Technology, LLC. 2005. *Glyphosate tolerant plants*. Estados Unidos. Registro de patentes de Estados Unidos. 36 págs.

Monsanto. 1999. *Datos de seguridad de materiales. Herbicida Roundup*. http://cms.fideck.com/userfiles/duwest.com/webmaster/file/descargas_esp/agricola/Roundup+35.6+SL.pdf Consultado: Julio 2012

National Center for Biotechnology Information (NCBI).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>. Consultado: Junio 2012

National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Serratia marcescens genome*.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=serratia%20marcescens>. Consultado: Octubre 2012

New England Biolabs. *Hind III*.

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0140.asp>. Consultado: Octubre 2012.

New England Biolabs. *PstI*.

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0140.asp>. Consultado: Octubre 2012

New England Biolabs. *T4 DNA Ligase*.

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0202.asp>. Consultado: Mayo 2012.

New England Biolabs. *Cleavage close to the end of DNA fragments*.

http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/cleavage_olignucleotides.asp#.T9Z_GY593ZY Consultado: Mayo 2012

Nicoll, Desmond. 2008. *An introduction to genetic engineering*. 3^a ed. Nueva York: Cambridge. 327 págs.

Nogrady, N; *et al.* 2005. <<Chloramphenicol resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from human and animal sources in Hungary>>. *Vet Med.* 50 (4):164-170

Pollegioni, Loredano; *et al.* 2011. << Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering>>. *FEBS Journal.* 278: 2753-2764

Pommerville, J. 2007. *Alcama's fundamentals of Microbiology*. 8^a ed. Boston, Jones and Barlett

Rees, Douglas; *et al.* 2009. <<ABC transporters: The power to change>>. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10 (3): 218-227

- Rodicio, María del Rosario y M. Mendoza. 2004. << Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16s: fundamento, metodología y aplicaciones>>. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(4): 238-245.
- Richter, Karin. 2011. *Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes al herbicida Glifosato en muestras de suelo*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, Guatemala. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FODECYT). 109 págs.
- Roe, Benjamin. 2001. *Bacterial transformation and transfection*. Manual de laboratorio University of Oklahoma. 220 págs.
- Sambrook, Joseph; *et al.* 2001. *Molecular Cloning*. 3^a ed. Nueva York, Cold Spring Harbor
- Schweizer, Herbert. 2008. <<Bacterial genetics: past achievements, present state of the field and future challenges >>. *BioTechniques*. 43: 633-641.
- Stein, Monica. Mayo 2012. Entrevista. Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, C.A. E-mail: mstein@gmail.com. Tel: 52084423
- Stein Monica, 2010. Curso de Biología Molecular. Universidad del Valle de Guatemala.
- Stein Monica, 2010. Curso de Ingeniería Genética. Universidad del Valle de Guatemala.
- Steubing, Patricia. 1993. *Isolation From An Unkonwn Bacteria From Soil*. Manual de laboratorio University of Nevada. 113 pags.

- Tzifira, Tzvi y V. Citovsky. 2008. << Glyphosate: a once-in-a-century herbicide >>. *Pest Management Science*. 64: 319-325.
- Todar, Kenneth. 2008. *Textbook of bacteriology*. 2ª ed. Wisconsin, Maddinson.
- Yi-Cheng, Sun; *et al.* 2005. << Novel AroA with High Tolerance to Glyphosate, Encoded by a Gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 Isolated from an Extremely Polluted Environment in China>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4771-4776.
- Yi, Y; *et al.* 2007. << Cloning, Expression and Functional Characterization of the *Dunaliella salina* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate Synthase Gene in *Escherichia coli*>>. *Journal of Microbiology*. 45(2): 153-157.
- Yong-Sheng, Tian; *et al.* 2010. << Isolation from *Ochrobactrum anthropi* of a Novel Class II 5-Enopyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase with High Tolerance to Glyphosate>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 6001-6005.
- Zamundio, Teodora. 2005. *Replicación de pTi recombinante en Agrobacterium tumefaciens*. Recuperado de: <http://www.biotech.bioetica.org/clase2-10.htm>
Noviembre 2011.

VIII. APÉNDICE

A. Cuantificación del ADN digerido por PstI y Hind III luego de la purificación del mismo

Cuadro 17. Cuantificación de ADN digerido por las enzimas Pst I y Hind III luego de la purificación del mismo

Muestra y enzima con la que fue cortado el ADN	260	280	320	Concentracion (µg/mL)	Pureza	Promedio (ng/µL)
ADN Mx con Pst I 30 min	0.72	0.83	0.784	362.3	0.863853	
	46	88	6		124	
Segunda lectura	0.97	0.90	0.743	486.2	1.072697	
	24	65	7		187	
Promedio						424.25
ADN Mx con Pst I 60 minutos	0.83	0.81	0.738	415.55	1.025416	
	11	05	7		41	
Segunda lectura	0.97	0.75	0.829	486.2	1.287265	
	24	54	5		025	
Tercera lectura	0.88	0.78	0.837	441.1	1.119827	
	22	78	1		367	
Promedio						447.6166667
ADN Mx con Pst I 90 minutos	1.00	1.01	1.011	503.6	0.987838	
	72	96	5		368	
Segunda lectura	0.83	0.71	0.824	415.55	1.159296	
	11	69	5		973	
Tercera lectura	0.91	0.88	0.800	455.15	1.034079	
	03	03	5		291	
Promedio						458.1
ADN Mx con Pst I 120 minutos	0.94	0.89	0.897	470.1	1.051795	
	02	39			503	
Segunda lectura	0.91	0.84	0.876	455.15	1.075115	
	03	67	3		153	
Tercera lectura	0.85	0.93	0.993	427.95	0.913934	
	59	65	8		864	
Promedio						451.0666667

Continuación Cuadro 17.

Muestra y enzima con la que fue cortado el ADN	260	280	320	Concentracion (µg/mL)	Pureza	Promedio (ng/µL)
pUC19 con Pst I	1.11	0.81	0.011	556.95	1.363903	
	39	67	99		514	
Segunda lectura	0.81	1.24	0.223	406.45	0.654245	
	29	25	3		473	
Promedio						481.7
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Pst I 30 minutos	0.63	0.96	-	318.4	0.656562	
	68	99	0.005		532	
			3			
Segunda lectura	0.81	0.70	0.277	406.45	1.156001	
	29	32	1		138	
Promedio						362.425
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Pst I 60 minutos	0.03	0.04	-	17.4	0.764835	
	48	55	0.073		165	
			6			
Segunda lectura	0	0	0	0	#DIV/0!	0
Promedio						17.4
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Pst I 90 minutos	0.63	0.56	0.196	318.4	1.130079	
	68	35	4		858	
Segunda lectura	0.51	0.73	0.26	255.95	0.693161	
	19	85			814	
Promedio						287.175
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Pst I 120 minutos	0.26	0.19	0.078	134.4	1.351432	
	88	89	6		881	
Segunda lectura	0.26	0.22	0.088	134.4	1.181538	
	88	75	4		462	
Promedio						134.4
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Hind III 30 minutos	0.11	0.15	0.018	56.95	0.724094	
	39	73	5		088	
Segunda lectura	0.15	0.17	0.131	79.85	0.904815	
	97	65	5		864	
Promedio						68.4
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Hind III 60 minutos	0	0	0	0	#DIV/0!	
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Hind III 90 minutos	0.33	0.27	0.219	167.9	1.233651	
	58	22	8		727	
Segunda lectura	0.41	0.1	0.151	207.5	3.810835	

Continuación Cuadro 17.

Muestra y enzima con la que fue cortado el ADN	260	280	320	Concentracion (µg/mL)	Pureza	Promedio (ng/µL)
Promedio						187.7
ADN <i>E.coli</i> XL1 Blue con Hind III 120 minutos	0.26 88	0.21 93	0.202 3	134.4	1.225718 194	
Segunda lectura	0.26 88	0.40 67	0.040 58	134.4	0.660929 432	
Promedio						134.4
PUC 19 con Hind III	0.81 29	0.45 39	0.046 8	406.45	1.790923 111	
PUC 19 con Hind III	0.81 29	0.95 16	0.185	406.45	0.854245 481	
Promedio						406.45
ADN Mx con Hind III 30 minutos	2.27 92	1.98 15	2.427 2	1139.6	1.150239 717	
Segunda lectura	2.04 18	2.04 23	2.116	1020.9	0.999755 178	
Promedio						1080.25
ADN Mx con Hind III 60 minutos	2.27 94	2.12 68	2.432 4	1139.7	1.071750 987	
Segunda lectura	2.32 02	2.17 91	2.432 4	1160.1	1.064751 503	0
Promedio						1149.9
ADN Mx con Hind III 90 minutos	2.05 3	2.19 07	2.037 9	1026.5	0.937143 379	
Segunda lectura	2.24 14	2.22 77	2.342 4	1120.7	1.006149 841	
Promedio						1073.6
ADN Mx con Hind III 120 minutos	2.01 95	2.08 91	2.034 5	1009.75	0.966684 218	
Segunda lectura	1.92 26	2.08 43	2.258 1	961.3	0.922419 997	
Promedio						985.525

B. Bibliotecas genómicas

Figura 38. Biblioteca genómica generada con PstI para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina

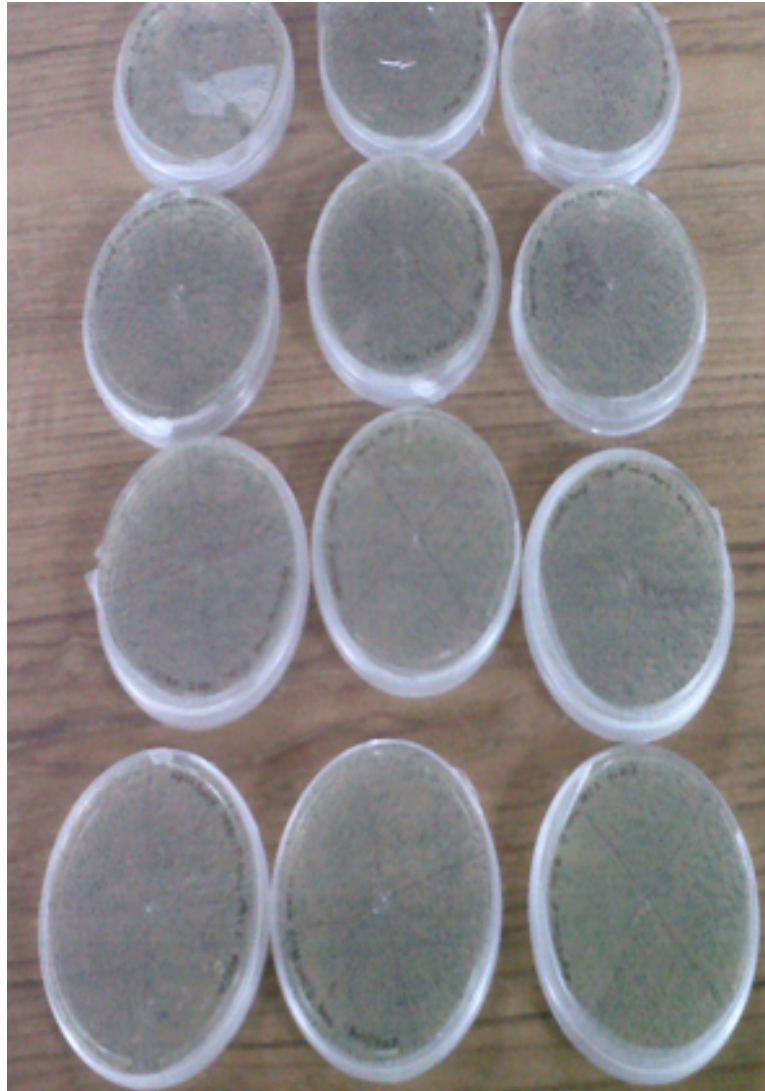


Figura 39. Biblioteca genómica generada con Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a tetraciclina



Figura 40. Comparación de la Biblioteca genómica generada con PstI y la generada con Hind III para el aislamiento del gen de tetraciclina

En la figura se muestra arriba una fotografía de placas con algunas de las colonias que poseen la biblioteca genómica generada con PstI, abajo se encuentra la biblioteca genómica generada con Hind III. A simple vista se puede notar que hay más colonias en la biblioteca Pst I que en la Hind III.

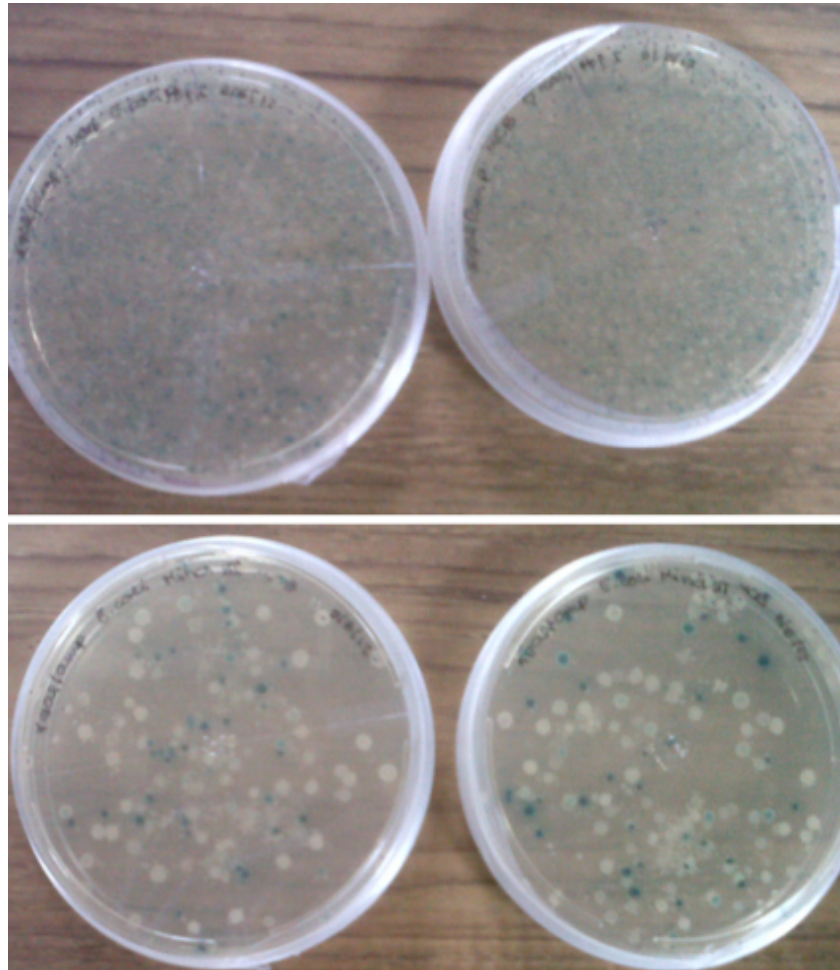


Figura 41. Biblioteca genómica generada con PstI para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato

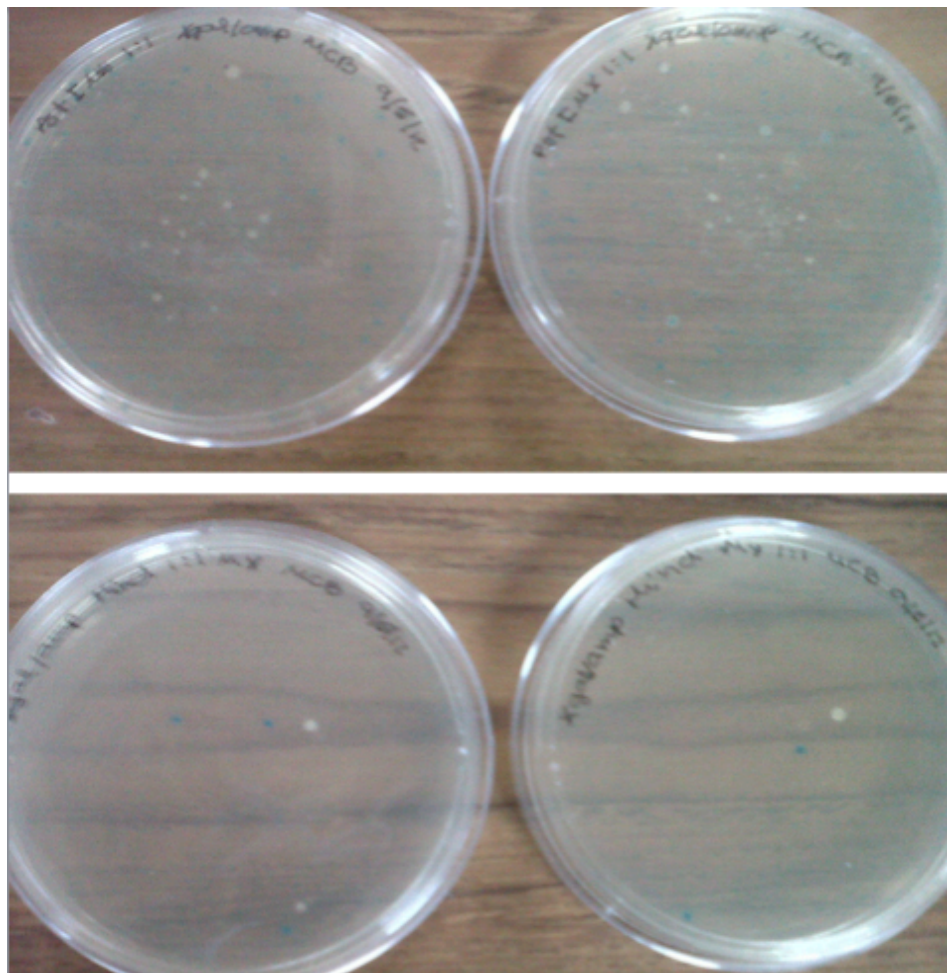


Figura 42. Biblioteca genómica generada con Hind III para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato



Figura 43. Comparación de la Biblioteca genómica generada con PstI y la generada con HindIII para el aislamiento del gen de resistencia a glifosato

En la figura se muestra arriba una fotografía de placas con algunas de las colonias que poseen la biblioteca genómica generada con PstI, abajo se encuentra la biblioteca genómica de la muestra generada con Hind III. A simple vista se puede notar que hay más colonias en la biblioteca Pst I que en la Hind III.



Cuadro 18. Conteo de colonias de la biblioteca genómica y porcentaje de cobertura de genoma

Biblioteca genómica	Número de colonias con inserto (blancas)	Tamaño del genoma del organismo (bp)	Tamaño del gen que se desea clonar (bp)	Porcentaje de cobertura del genoma (%)
PstI para aislar el gen de resistencia a tetraciclina	10, 369	4×10^6	4×10^3	99
Hind III para aislar el gen de resistencia a tetraciclina	1, 408	4×10^6	4×10^3	24
PstI para aislar el gen de resistencia a glifosato	1, 651	5×10^6	2×10^3	51.6
Hind III para aislar el gen de resistencia a glifosato	6	5×10^6	42×10^3	9

D. Curvas de crecimiento bacteriano

Cuadro19. Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de *E.coli* DH5a

Muestra	<i>E.coli</i> DH5a				
	Concentración glifosato	1	2	3	Promedio
0	490	477	285	417.3333333	114.7882108
0.5	305	422	280	335.6666667	75.8045733
1	221	118	271	203.3333333	78.01495583
5	134	183	222	179.6666667	44.09459528
10	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Cuadro 20. Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de Mx 3

Muestra	Mx3				
	Concentración glifosato	1	2	3	Promedio
0	858	905	1296	1019.666667	240.4627483
0.5	686	872	957	838.3333333	138.6013468
1	647	733	800	726.6666667	76.69637106
5	580	610	786	658.6666667	111.2894125
10	553	556	707	605.3333333	88.05869255
25	550	546	561	552.3333333	7.767453465
50	536	515	561	537.3333333	23.02896727
75	517	304	528	449.6666667	126.2708729
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Cuadro 21. Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de Glifo1

Muestra	Glifo1			Promedio	Desviación estándar
	1	2	3		
0	717	645	704	688.6666667	38.37099599
0.5	690	624	567	627	61.55485359
1	677	552	449	559.3333333	114.1767635
5	312	251	374	312.3333333	61.5006775
10	318	156	286	253.3333333	85.79821288
25	284	83	152	173	102.1322672
50	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Cuadro 22. Conteo bacteriano, promedio y desviación estándar de Glifo2

Muestra	Glifo 2			Promedio	Desviación estándar
	1	2	3		
0	455	378	125	319.3333333	172.645108
0.5	371	347	122	280	137.3571986
1	332	343	118	264.3333333	126.8476777
5	312	171	68	183.6666667	122.4921766
10	296	154	57	169	120.2039933
25	231	150	24	135	104.3120319
50	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 44. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de Glifo1 y Glifo 2 en escala logarítmica comparado con los controles

E.coli DH5 α (rojo), Mx3 (verde), Glifo 1 (morado), Glifo 2 (azul)

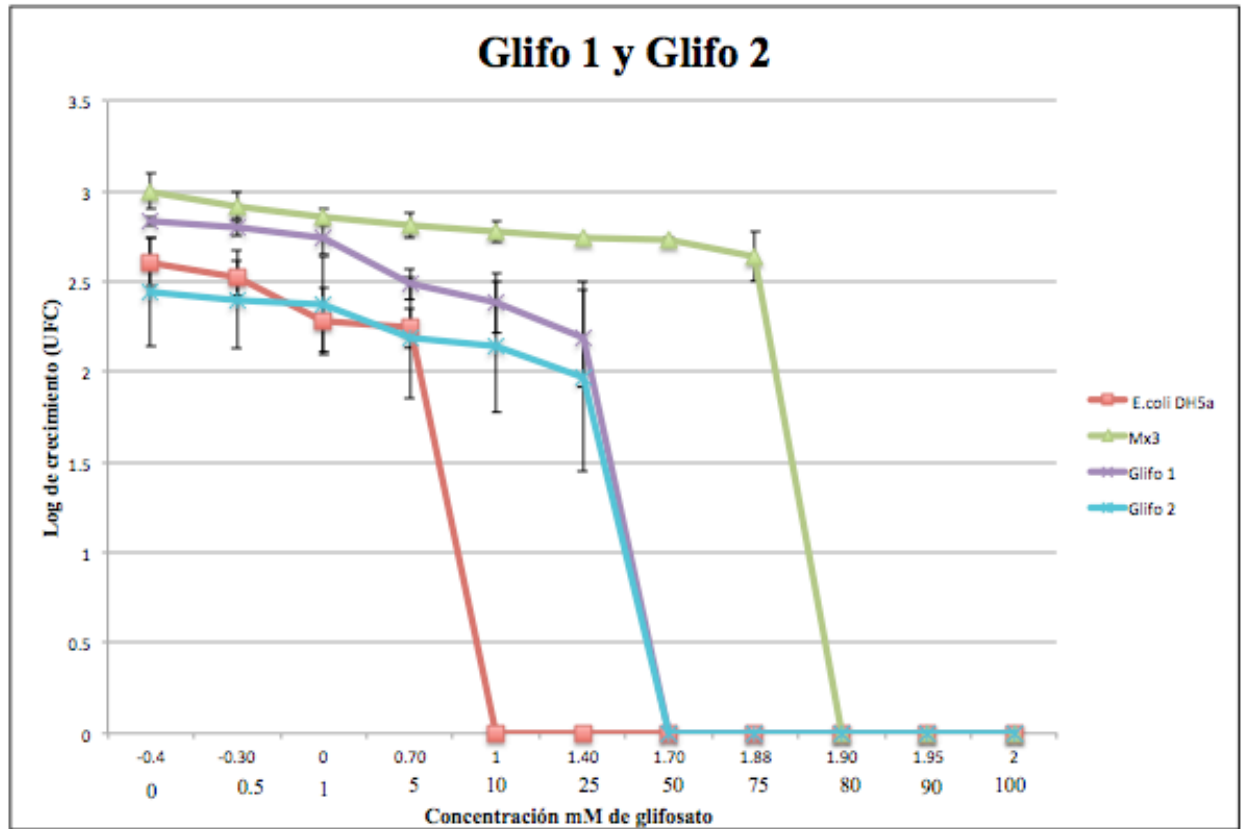


Figura 45. Gráfica de la función de supervivencia acumulada de Glifo 1 y Glifo 2 comparado con *E.coli* DH5 α y Mx3.

Glifo 1 no se puede apreciar en la figura debido a que Glifo 2 se encuentra sobreponiéndolo.

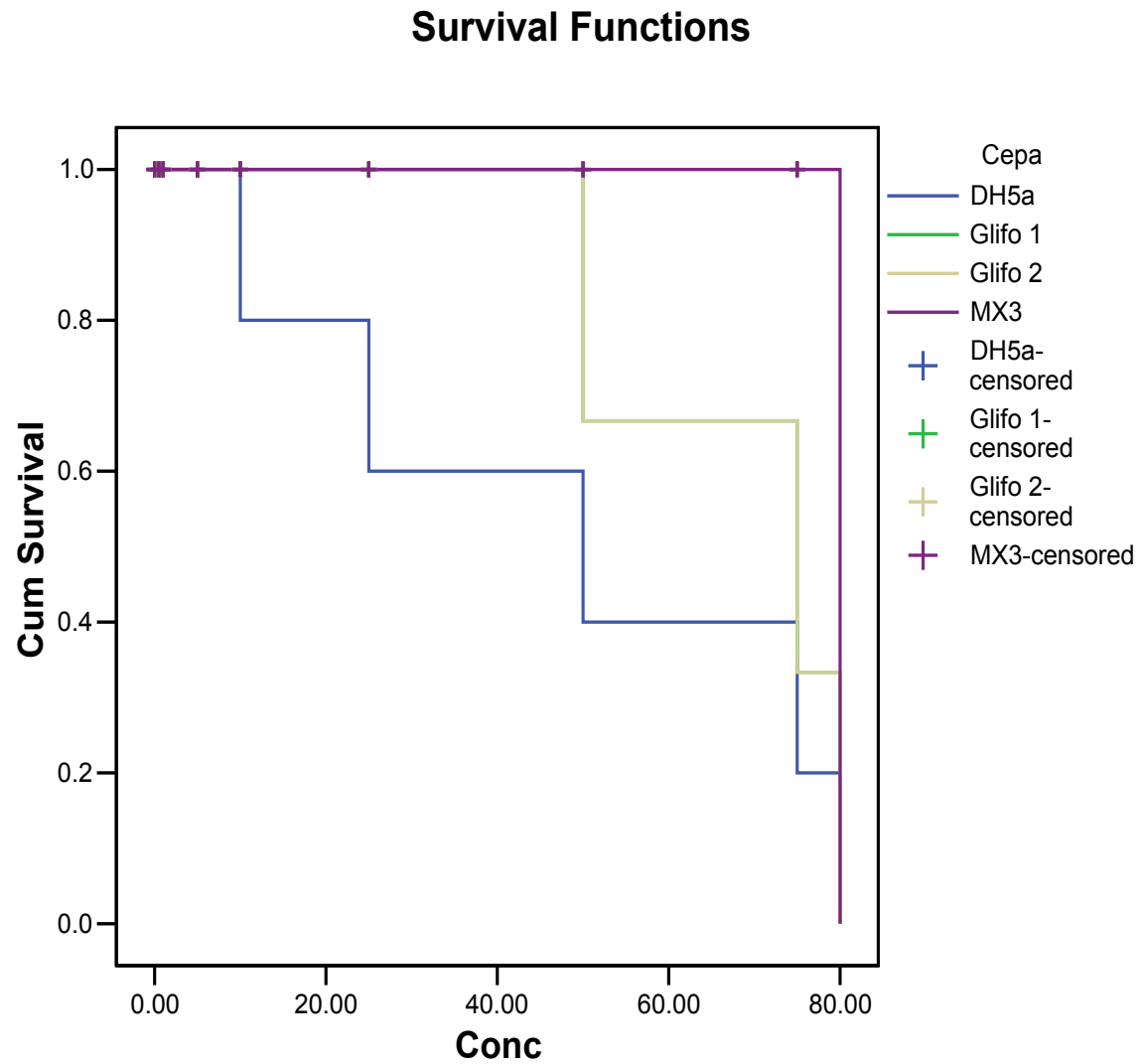


Figura 46. Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo 1 comparado con *E.coli* DH5 α y Mx3.

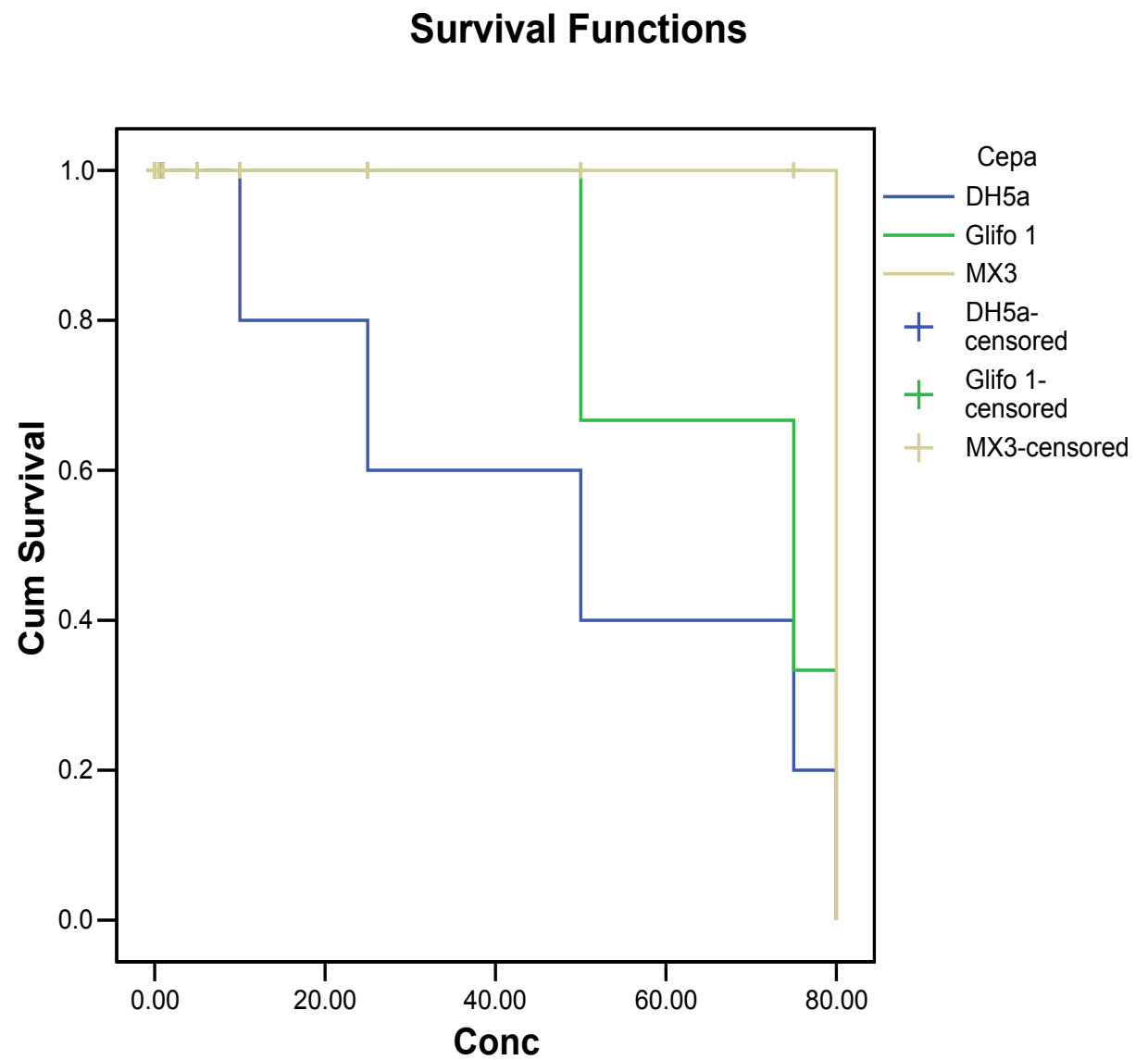
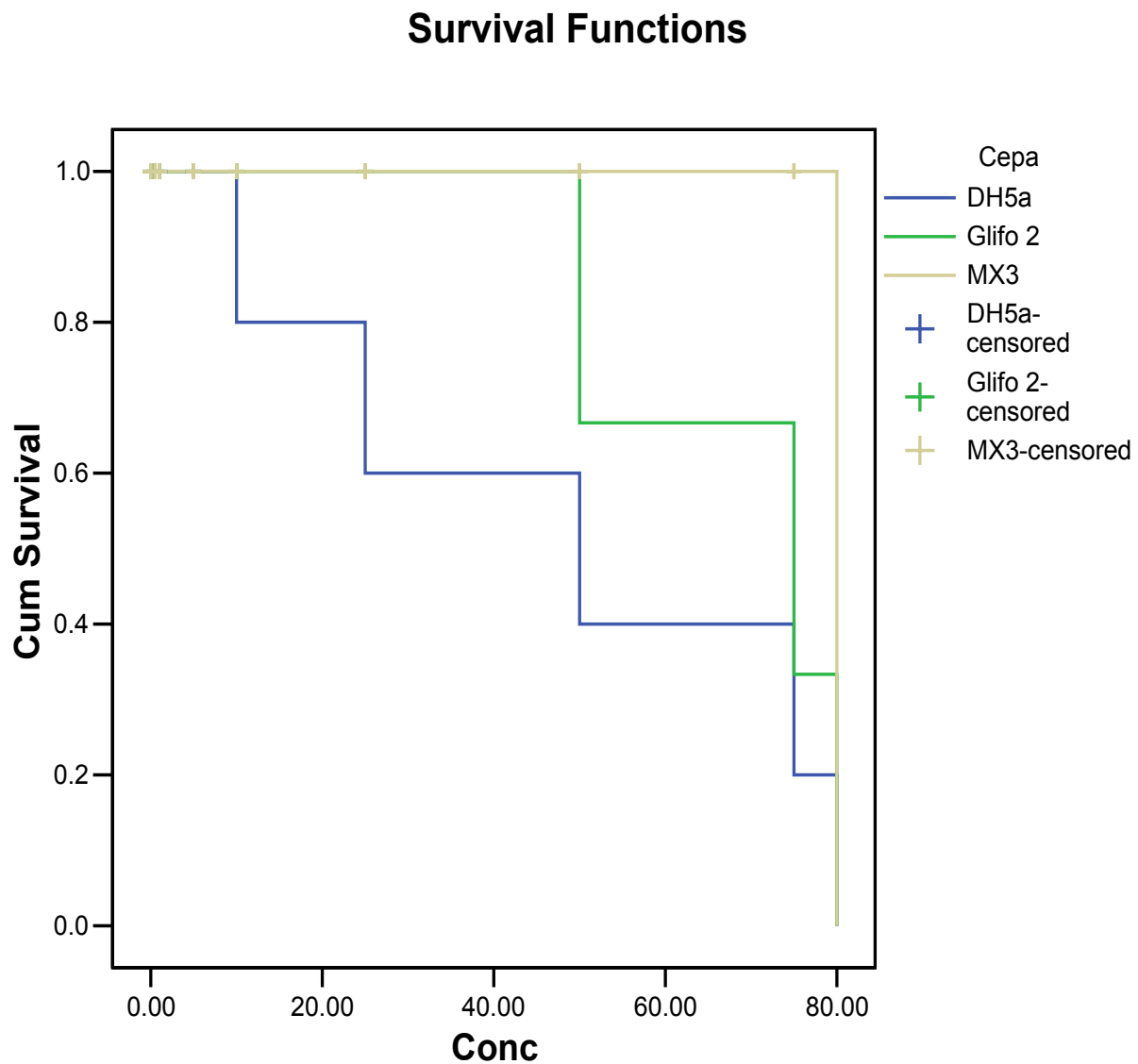


Figura 47. Gráfica de la función de sobrevivencia acumulada de Glifo 2 comparado con *E.coli* DH5a y Mx3

E. Cuantificación de los plásmidos con inserto

Cuadro 23. Cuantificación del plásmido pUC19 con inserto, extraído de los clones Tet1, Tet2, Glifo1 y Glifo2

Muestra	260	280	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza
Tet1	0.6668	0.0934	333.4	7.139186296
Duplicado	0.2109	0.2031	105.45	1.038404727
Promedio			219.425	
Tet2	0.2109	0.0402	105.45	5.246268657
Duplicado	0.2688	0.0369	134.4	7.284552846
Promedio			119.925	
Glifo1	0.2109	0.0951	105.45	2.217665615
Duplicado	0.415	0.7276	207.5	0.570368334
Promedio			156.475	
Glifo 2	0.3358	0.0424	167.9	7.919811321
Duplicado	0.519	0.4128	259.5	1.257267442
Promedio			213.7	

F. Secuenciación de pUC19 con inserto

Secuencia del inserto Tet1 con cebador M13 F

GNNNNNNNNNNNNNNNTTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG
ACCTGCAGCAGCGGACGGACAAAGGTGTAAGCCATAAAGTGACCGGCGAC
CAGCAGAAACGTCAGCAGCAGCCCGGTCAGCAGCCGGCGATTCTGTGCGTT
GCGCGGTGAACGACCGCCAGCCGATCGCCTGCGTGACCGGCAGCGGCGGC
AGCACGCACACCAGCAGGAGCAGGGTCAGCGCCGCCAGAACGGCGACCGC
CAGAAACGCCATGCGCCAGCCCAGCGCTTCGCCGAGGAATACCCCGAGCG
GCACGCCGAACACCGAGGCCGCCGCTACGCCGCCGAAGATGATGGACAGT
GCCAATCCGACGGAGGCCGGCGGCACCAGGCGTTCCGCCAGCCCGCCGGC
GATGGCCCAGATAACCGCCGATGCAAAAGCCCAGCAGGATGCGCGCAGCGA
ACAGCAGCGCCAGGGAGGTGGCGGGCGGCCAGCAGGTTAGCGGCGATC
AGCAGCAGCAGAAAGCCCGCCAGCAGGTTGCGGGCGGTCCGTGCGCCGGGC
ACCCAGCACACCAGCGGGGCGAACAGCGCGGCCAACAGGGCCGGCAGGG
AAATCAGCAGCCCGGCGCGGCCGATAGATGCGTTCAGGGTGCTGACGATC
GGGGTCAGCAGCCCGACGGGCAGCATTTCTGCGGTGACGACGGTAAAGGT
GGACAGGCCGACCGCGAAGGTCGCCAGCCACGCTTTTGGCGCCGCCGTCGG
CGTGTAAGGCACTCATAATGACTCTCCCAACAGATGAAGAACCCAGTGT
ATCCGCGCCAAAATGGCTGATAAACTGGCCTGAATGCGCAACATTGGGGA
CAAATCGTGGCTAATTTACCGCCTATGCCGTTGGATAACCTGACCGACCT
GCTGGTATTCATTCGCGTCGCCGACGCCTGCAGGACTGATAACCGATCAT
TGATTGCGGCCGATTNAAGGAGTCGTGGAACGTGCAACAGAACCCGAACC
TTCATCTCGGTTTGATTTTCATTCTGGGGCCTGCTGTCCATGCTGATGC
CGCTGNNATCGACATGTACCTGCCAGCATGNCNGNATCGCCGCCANTT
TGCGTCNANTNNNAGCNNGCANATGANGCTCANNNNCNATNTGCNNNNN
NNNNNNGGCANNTNNNCNNGGNGATNNCNGNANGCATCNGNNNNNNNN
NNNNNCNGNGGNNNNCTNANCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CNNNNNNNNNN

Secuencia del inserto Tet1 con cebador M13 R

NNNNNNNNNNNGCATGCCTGCAGGTGGTGCCTCGCTGTGCCACCAGGTG
ATTGTGCTGCGACAGGGAGAAGTGGTTGAGCAGGGAGACTGCCGGGCGAT
TTTCGCGGCGCCCGCAGCCGACTATACCCGACAACCTGTTGCAGTTGGCGG
ATTAGCGGCGAATTCAGAAGGGGTATTGCGCGCTGAGCGGTTCCGGCGATC
GCGGCGCCGACGTTTTTCAGGCGGCACATCGTCGCGCTCTCATCGCTGCG
CTGCACGAACAGGCAAGGTTCCCCTTCCCATTTCGACGATCGCGCAGTCGA
CCTGAATCTCCTGCAACGACAGATTAAGCTGTTGCATCACCTGCCAGGCC
TCGGCCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCAGCCCAATCAGGTTGTTATCCTC
GTCTATTCCGTTAAACGGAATCGGTTTCGACCTTTACGCCGGTGAAACCGG
ATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAGTTGGATA
CTCTCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAAAGGTGAAACACTTTTACCTGAC
AGGGTTACTAAGTTATAGCCGTTGACTCCCGACTCTGCCGCGCACAAATG
TTATTTAAATGTAAATTTTGCCGCAAGCCATTAACCTGACCCCGTGCTTG
CCGATGCCGTGCCATTTTTTTGGCGCGCCGTGCGGTGTTATTTACGGCAT
TTTGCGACTCAGCTCGCATTTTTTGCGTTATATGTAACCCTTTCCCGCAGC
GATCTCAACTCTTTTTTCTTGCAATGCGACTACTTTTTTCGTCGCCATATT
TTTACATTGAAGAAACATTTACCCGTCGCGTTAGCGCACCGTCTCCTCCGC
TAATGCCTTGATTTACATCACCCCTAATGCAAACCGCCCGCACCGACCCG
CCGGCAAACGCCGCGCATAACCGGAGGATATCGGGCAGCTCAGCGACGGT
ATTTTTTAACAAAAGCACACAGAAGGTAAACGCCAATTGATTAGCNC
ATATGTTTGGCAACAAAATTTTCATTGCCGGTTGCACCGCAAACCTGGCAA
GGCGCAACCCTGTGACGGCTCGGGGCAACCTCNCNCCCGAACCTGGANANG
TCNGGCTGCNCGATCGCGCGNNNNTGGCGNACAGATAGAACAACNNNNNC
ANGCTNCNAGCNNNTCNAGGNGACATCNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNN
ANNNNNGNNNNACANNNNNNANNNNNANNNANNNNNNNNNNAGGNNNNNNN
GNNNNNNNNCCNNNNNNNGNNAANN

Secuencia del inserto Tet2 con cebador M13 F

GNNNNNNNGNNNNNNNTTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGA
CCTGCAGCAGGTGTATGGCCTGATAGGCCGGCACCGTGCGCGGCCCCAGC
TGATAATCGAGGCTGATGGTCAGGCCAGTTTGGGGTTGAACTCCGCGAC
CGTCGATTGCAGCGCCGCCAGCAGACCCGGTTCGGTCAACTGCAGCGCCG
CCTGATGCGCGATGGTGGTTTTTCGTCAGGGCGTAGACCACGGCGGTGAGG
CCGGTGGTGACCGCCGCAAACACCGCCAGCGTGGTGCCGTGCTTTCTCAT
GGAATTCAGCATGGCGGCTCCTTAGCGATGGCCGTACACGCGCGGCTGCG
TGTAGTGGTCGATTAACGGGACGGTGTGTTGGCGAGCAGCACGGCAAAG
GCCACGCCGTCAGGGTAGCCGCCATAAACGCGGATCAGCCAGACCAGCAC
GCCGATCAGCGCGCCGTAGATTAACGGCCCTTCGGCGTGGTGGAGGCGC
TGACCGGGTCGGTGGCGATAAAGAACGCGCCCAGCATGCTGGCGCCGGAG
AACAGGTGGATCAGCGGCGAAGCCTGATGCGCCGGATCGAGCCACCAGGC
CAGACCGGAGCAGAAGGCGATGGCGGCCAACATGCTGAAGGGGATCTGCC
AGTGGATCAGGCGGCGCGCCAGCATAAACAGGCCGCGGCCAGAAAGCCG
AGGTTGACCCACTGCCAGCCGATGCCC GCCAGCGCGCCGCCGAACAGCGG
CTGCTGCAACACTTGTTCAACGCTGTGGCCGCTGCGCAAACCGGTTTTGA
AGCCGTCGAGCGGTGTAGCCTGGCTGATGCCGTCAACGCCCATCTGCAAT
TCGTGCAGCGTCGCGCCCTGAGCGGTATGGCCGCTGAAAATGGCCAGCAG
CGTGTCGTGGAANCGACAGCGCGGTGGCGCGCAGCTCATCCGGCGGCAAC
CAGCTGGTCATCTGCACCGGGAAGGAGATCAGCAGCACCACGTAACCGAC
CATCGCCGATTGAACGGGNNCTGCCAAGGCCGCGGTACAGCTGTTTGG
CGATGACGATGGCGAAGAANNTGCCGATGACGATCATCCACCACGGGGCC
AGCGGNNGCAGGCTGATGCCNAGCANCAGCNNNGNCAGNANGGNGNANTT
GTCNNNGCNNTGNNNCNGCAGCTNGNNNANNNGAGATCNNNNNCNCNNNN
GNNANNNGACNANTCNCCNCNGNNNCNCNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNN
NAANNNGTNNCNGNNNNNNNCNNNNNNNGNNNAGNNNNN

Secuencia del inserto Tet2 con cebador M13 R

GGNNNNNNNNNNNANGNCTGCNNGGTGGTGCCTTCGCTGTGCCACCAGGTG
ATTGTGCTGCGACAGGGAGAAGTGGTTGAGCAGGGAGACTGCCGGGCGAT
TTTCGCGGGCGCCCGCAGCCGACTATACCCGACAACCTGTTGCAGTTGGCGG
ATTAGCGGCGAATTCAGAAGGGGTATTGCGCGCTGAGCGGTTCCGGCGATC
GCGGCGCCGACGTTTTTCAGGCGGCACATCGTCGCGCTCTCATCGCTGCG
CTGCACGAACAGGCAAGGTTCCCCTTCCCATTCGACGATCGCGCAGTCGA
CCTGAATCTCCTGCAACGACAGATTAAGCTGTTGCATCACCTGCCAGGCC
TCGGCCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCAGCCCAATCAGGTTGTTATCCTC
GTCTATTCCGTTAAACGGAATCGGTTGACCTTTACGCCGGTGAAACCGG
ATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAGTTGGATA
CTCTCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAAAGGTGAAACACTTTTACCTGAC
AGGGTTACTAAGTTATAGCCGTTGACTCCCGACTCTGCCGCGCACAAATG
TTATTTAAATGTAAATTTTGCCGCAAGCCATTAACCTGACCCCGTGCTTG
CCGATGCCGTGCCATTTTTTTGGCGCGCCGTGCGGTGTTATTTACGGCAT
TTTGCGACTCAGCTCGCATTTTTTGCGTTATATGTAACCCTTTCCCGCAGC
GATCTCAACTCTTTTTTCTTGCAATGCGACTACTTTTTTCGTCGCCATATT
TTTACATTGAAGAAACATTTACCCGTCGCGTTAGCGCACCGTCTCCTCCGC
TAATGCCTTGATTTACATCACCCCTAATGCAAACCGCCCGCACCGACCCG
CCGGCAAACGCCGCGCATAACCGGAGGATATCGGGCAGCTCAGCGACGGT
ATTTTTTAACAAAAGCACACAGAAGGGTAAACGCCCAATTGATTAGCAG
GCATATGTTTGGCAACAAAATTTTCATTGCCGGTTGCACCGCANCTGGCA
GGCGCAACCCTGTGACGGCTCGGGGCACCTCGCCCCGAACCTNNNAACGT
CNGGNTGCNCGATCGNNCNNNNNTGNGTANAGAATAGAACNACNCCNCA
ATGCTGCNNANCNNNTCNGGNNNCATNNNNNANNNNNNNNNNNCNGNCCA
TNNNNNGNCCNNNNNNCAGNNGNNNNGCNNANNNNNNNNNNNNNNNNNAN
NNNGNCCNNNNCCNNNTNNN

Secuencia del inserto Glifo1 con cebador M13 F

NNNNNNNNNNNCNNNNNNNCCCCANGAANAGNANAGTNTCGGNNNNNNNT
TTAANTANGNCNGNAGAANNGTATTTTGAANAAGGCNAAGAGGATGTATA
GACCCTCAAGCTCATGANAAGGNCCNGTNCNGATTANNTATTGTCTACGC
GATTTCCCCNAGATACCAGTTAACAATTACGATCTATTGTCTGCGNTTTT
TTTGCCTGACACTACTTATTTATGCGGGTTCTCGGGACACGCTCGAAANG
GCCCCCTGGATNAACATAAGATTNGCCGTTACATGACGAANATCTCTTTG
TTATTGTTCTATTGAA

Secuencia del inserto Glifo1 con cebador M13 R

TNNNNNNNNNNNNNGNNNNNTNTCTCNNNNNNNNNCCNNANNANGNNNANA
ANANNNTNTNNNNCNTTNTNCCANNNNNNNNGGNNNTNNNATNNNNANNA
AANGTGTATTTCTTCGTCNNTANGGGAAGGAGTTCTNAAATTAAGTAAT
TTTGATGGCNATGTTNTACCCATATTTTTTTGATTTACGAGTTAGTATTC
CCCCCTCTACACNCTGATAACCTGTACNGTNNGGTTTTTTTTTNACTTTT
NCTATANCACAATNNNTCTN

Secuencia del inserto Glifo2 con cebador M13 F

NNNNNNNNNNNGNNNNNNNTNNNNNNNNNGNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNTANNNTNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNTTNNNNN
NNNNNNNGCNNTNTNNNCCTNGATCTTNTGTTAGNNNNNNNNNNGGGNNNG
TTNTNNGGGGNGAAGTANNNGNNNNNNNNNN

Secuencia del inserto Glifo2 con cebador M13 R

NNNCNNNNNNNNNN
NNNNNCNNNNNNNNNNNNNAGAAGNNCNNNNNNNNNTNNANNNNNNGAANNNNN
NNGGNCNNNCNNNNNNNNNNNNNNNACNNAAGCGGAGCCNGAAAGGAAGAA
GGAGNGNGATCTGGCTGAGGCCGAAAAGGTGGTGGNCGGTTCAANTNNNA
NATANGGNTNTNCTCNCNCTTTCAANNAA


Contig (secuencia de consenso) de las secuencias de los insertos Tet1, Tet2, Glifo1 y Glifo 2

GGNNNNNNNNNGCATGCCTGCAGGTGGTGC GTTCGCTGTGCCACCAGGTGAT
TGTGCTGCGACAGGGAGAAGTGGTTGAGCAGGGAGACTGCCGGGCGATTTTC
GCGGCGCCCGCAGCCGACTATACCCGACA ACTGTTGCAGTTGGCGGATTAGC
GGCGAATTCAGAAGGGGTATTGCGCGCTGAGCGGTTTCGGCGATCGCGGCGCC
GACGTTTTTCAGGCGGCACATCGTCGCGCTCTCATCGCTGCGCTGCACGAACA
GGCAAGGTTCCCCTTCCCATTTCGACGATCGCGCAGTCGACCTGAATCTCCTGC
AACGACAGATTAAGCTGTTGCATCACCTGCCAGGCCTCGGCCCTTCATGGCT
GAGCAGCTTCAGCCCAATCAGGTTGTTATCCTCGTCTATTCCGTTAAACGGAA
TCGGTTCGACCTTTACGCCGGTGAAACCGGATAGCCAACGATAACTTTGCGGC
AAGCGATGCACTACCGAAAGTTGGATACTCTCCACATGAAATCCCTAGTTTGA
AAAGGTGAAACACTTTTACCTGACAGGGTTACTAAGTTATAGCCGTTGACTCC
CGACTCTGCCGCGCACAAATGTTATTTAAATGTAAATTTTGCCGCAAGCCATT
AACCTGACCCCGTGCTTGCCGATGCCGTGCCATTTTTTTGGCGCGCCGTGCGGT
GTTATTTACGGCATTTTGCGACTCAGCTCGCATTTTTTGCGTTATATGTAACCC
TTCCCGCAGCGATCTCAACTCTTTTTTCTTGCAATGCGACTACTTTTTTCGTGCG
CCATATTTTTTACATTGAAGAAACATTTACCCGTCGCGTTAGCGCACCCGTCCT
CCGCTAATGCCTTGATTTACATCACCCCTAATGCAAACCGCCCGCACCCGACCC
GCCGGCAAAAACGCCGCGCATAACCGGAGGATATCGGGCAGCTCAGCGACGGT
ATTTTTTAACAAAAGCACACAGAAGGTAAACGCCCAATTGATTAGCGGCAT
ATGTTTGGCAACAAAATTTTCATTGCCGTTGCACCGCAA ACTGGCAGGCGCA
ACCCTGTGACGGCTCGGGGCACCTCGCCCCGAACCTGGAAACGTCNNGGCTGC
NCGATCGCGCNNNNTGGCANACAATAGAACAACNNCNCNCATGCTGCNNANC
NNNTCNNGGNNNCATNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNCNNANNNNNNNNNNACNNN
NNNCANNGNNNNANNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNN
GNNAANNNCCTNGATCTTNTGTTAGNNNNNNNNNGGGNNNGTTNTNNGGG
GNGAAGTANNNGNNNNNNNNN


```

Query 1089      CACCACGGGGCCAGCGGNGGCAGGCTGATGCCNAGCANCAGC 1130
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346396  CACCAGGGGGCCAGCGGCGGCAAGCTGATGCCGAGCAGCAGC 2346437

```

>gb|CP002774.1|  Serratia sp. AS12, complete genome
Length=5443009

Features in this part of subject sequence:

[Electron transport complex protein rnfG](#)
[Electron transport complex protein rnfD](#)

Score = 1101 bits (596), Expect = 0.0
Identities = 825/942 (88%), Gaps = 3/942 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 190      CTGCAGCGCCGCTGATGCGCGATGGTGGTTTT-CGTCAGGGCGTAGACCACGGCGGTGA 248
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345598  CTGCAGTTCCGCTGATGAGCGATGGT-TTTCTGCGTCAGACTGTGCACCACGGCGGTCA 2345656

Query 249      GGCCGGTGGTGACCGCCGAAACACCGCCAGCGTGGTGCCGTGCTTTCTCATGGAATFCA 308
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345657  GGCCGGTCGTCACTGCCGCGAACACCGCAAGCGTGGTGCCATGCTTTCTCATGGAATTTA 2345716

Query 309      GCATGGCGGCTCCTTAGCGATGGCCGTACACGCGCGGCTGCGTGTAGTGGTCGATTAACG 368
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345717  GCATCATGGCTCCTTAGCGATGGCCGTACACGCGGGTTCGCTGTAGTGGTCGATCAGCG 2345776

Query 369      GGACGGTGTATGTTGGCGAGCAGCACGGCAAAGGCCACGCCGTAGGGTAGCCGCCATAAA 428
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345777  GCACGGTAATATTGGCCAGCAACACGGCGAAGGCCACGCCATCTGGATAGCCGCCATAAA 2345836

Query 429      CGCGGATCAGCCAGACCAGCAGCCGATCAGCGCGCCGTAGATTAACGGCCCTTCGGCG 488
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345837  CGCGGATCAGCCATACCAGCAGCCAAATCAGAGCGCCGTAAATCAGGCGGCCCTTCGGCG 2345896

Query 489      TGGTGGAGGCGCTGACCGGGTGGTGGCGATAAAGAACGCGCCAGCATGCTGGCGCCGG 548
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345897  TGGTGGAGGCGCTGACCGGGTGGTGGCGATAAAGAACGCGCCAGCATGCTGGCGCCGG 2345956

Query 549      AGAACAGGTGGATCAGCGGCGAAGCCTGATGCGCCGGATCGAGCCACCAGGCCAGACCGG 608
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2345957  AGAACAGGTGGATCAGTGGCGATGCCCTGATGCGCGGGATCAAACACCAGGCCAGGCCGG 2346016

Query 609      AGCAGAAGGCGATGGCGGCCAACATGCTGAAGGGGATCTGCCAGTGGATCAGGCGGCGG 668
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346017  AGCAGAAGGCGATGGTGCAGCATGCTGAACGGGATCTGCCAGTGAATCAGGCGGCGG 2346076

Query 669      CCAGCATAAACAGGCCCGCCGGCCAGAAAGCCGAGGTTGACCCACTGCCAGCCGATGCCCG 728
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346077  CCAGCATAAACAGACCGCCTGCCAGGAAGCCGAGGTTAATCCATTGCCAACCAATGCCGG 2346136

Query 729      CCAGCGCGCCGCGAACAGCGGCTGCTGCAACACTTGTTCACGCTGTGGCCGCTGCGCA 788
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346137  CAAGCGTGC CGCGAACAGCGGTTGTTGCAGCATCTGCTCGACGCTATGACCGCTGCGCA 2346196

Query 789      AACCGGTTTTGAAGCCGTCGAGCGGTGTAGCCTGGCTGATGCCGTCAACGCCCATCTGCA 848
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346197  GGCCGGTTTTGAAACCGTCCAACGGCGTAGCCTGGCTGATGCCGTCAACGCCCATTTGCA 2346256

Query 849      ATTCGTGCAGCGTCGCGCCCTGAGCGGTATGGCCGCTGAAAATGGCCAGCAGCGTGTCTG 908
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346257  GTTCGTGAATAGTGGCCCCCTGTGCGGTATGGCCGCTGAAAATAGCCAGCAGGGTATCCT 2346316

Query 909      GGAANCAGACAGCGGTTGGCGCGCAGTTCATCCGGCGGCAACCAGCTGGTCACTGCACC 968
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346317  GGAA-CGACAGCGGTTGGCGCGCAGTTCATCCGGCGGCAACCAGCTGGTCACTGCACC 2346375

Query 969      GGAAGGAGATCAGCAGCACCAGTAACCGACCATCGCCGGATTGAACGGGNNCTGCCCA 1028
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2346376  GGAAGGCGATCAGCAGCACCAGTAACCGACCATGGCCGGATTGAACGGGTTTTGCCCC 2346435

```




```

Query 969      GGGAAAGGAGATCAGCAGCACCACGTAACCGACCATCGCCGGATTGAACGGGNNCTGCCCA 1028
                |||
Sbjct 2346387   GGGAAAGGCGATCAGCAGCACCACGTAACCGACCATGGCCGGATTGAACGGGTTTTGCCCC 2346446

Query 1029     AGGCCGCCGTACAGCTGTTTGGCGATGACGATGGCGAAGAANNTGCCGATGACGATCATC 1088
                |||
Sbjct 2346447   AGGCCGCCGTAAAGCTGTTTGGCGATAACGATGGCAAAGAAGGTGCCGATAACAATCATC 2346506

Query 1089     CACCACGGGGCCAGCGGNGGCAGGCTGATGCCNAGCANCAGC 1130
                |||
Sbjct 2346507   CACCAGGGGGCCAGCGCGGCAAGCTGATGCCGAGCAGCAGC 2346548
    
```

Alineaciones de la secuencia Tet1 M13R y Tet2, M13R

>gb|CP002775.1|  Serratia sp. AS13, complete genome
 Length=5442549

Features in this part of subject sequence:

[Nickel-transporting ATPase.](#), [Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein](#)

Score = 854 bits (462), Expect = 0.0
 Identities = 691/804 (86%), Gaps = 5/804 (1%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 19      TGCAGGTGGTGCCTTCGCTGTGCCACCAGGTGATTGTGCTGCGACAGGGAGAAGTGGTTG 78
                |||
Sbjct 3618598   TGCAGGTGGTGCCTCACTGTGCCATCAGGTGATCGTACTGCGCCAAGGGGAAGTGGTTG 3618657

Query 79      AGCAGGGAGACTGCCGGGCGATTTTCGCGGCGCCGAGCCGACTATACCCGACAACGTG 138
                |||
Sbjct 3618658   AACAGGGCGATTGCCAGACGATCTTCAACTCGCCTGCGCCGCTTATACGCAGCAGCTGT 3618717

Query 139     TGCAGTTGGCGGATTAGCGGCGAATTCAGAAGGGGTATTGCGCGCTGAGCGGTTCCGGCGA 198
                |||
Sbjct 3618718   TACAGCTGGCCGATTAGCGGCGGGGTAGAAAAGGGTATTGCGCGCTCAGTGGCTCGGCGA 3618777

Query 199     TCGCGGCGCCGACGTTTTTCAGGCGGCACATCGTTCGCGCTCTCATCGCTGCGCTGCACGA 258
                |||
Sbjct 3618778   TGGCGGCGCCAACGTTTTTTAACCGGCATAAAGGTAGCGCTTTCATCGCTGCGGTGCACAA 3618837

Query 259     ACAGGCAAGGTTCCCTTCCCATTCGACGATCGCGCAGTTCGACCTGAATCTCCTGCAACG 318
                |||
Sbjct 3618838   ACAGGCAAGCTTCCCTTCCCACTCCACGATGGCGCAATCGACCTGAATCTCCTGCAAAAG 3618897

Query 319     ACAGATTAAGCTGTTGCATCACCTGCCAGGCCTCGGCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCA 378
                |||
Sbjct 3618898   ACAGCTTAAGCTGTTGCATAACCTGCCAGGCTCCGCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCA 3618957

Query 379     GCCCAATCAGGTTGTTATCCTCGTCTATTCGGTTAAACGGAATCGGTTTCGACCTTTACGC 438
                |||
Sbjct 3618958   AGCCAATCAGGTTGTTATCTTCGTCTATCCCGCTAAGCGGAATCGGTTCAACCTTGATGC 3619017

Query 439     CGGTGAAACCGGATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAAGTTGGA 498
                |||
Sbjct 3619018   CGGTAAAACCTGATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAAGTTGGA 3619077

Query 499     TACTCTCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAGGGTGAACA-CTTTTACCTGACA-GGGTT 556
                |||
Sbjct 3619078   TACTATCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAGGAGTGAACA-GTGAACAGTTTTTTACCTGACAGGGGTA 3619136

Query 557     ACTAAGTTATAGCCGTTGACTCCCGACTCTGCCGCGCACAAATGTTATTTAAATGTAAAT 616
                |||
Sbjct 3619137   ACTAAGTTATAGCCGTTGAGAACCAGCTCTGCTGAGCACATATGTTATTTAAATGTAAAA 3619196

Query 617     TTTGCCGCAAGCCATTAACCTGACCCGCTGCTTGCCGATGCCGTTCCATTTTTTGGCGCG 676
                |||
Sbjct 3619197   TATGTCACAACCTATTAACCGACCCCTGCGCTGCTGATATCGTG-C-TGTTTTGGTACG 3619254
    
```


```

Query 677      CCGTGCGGTGTTATTTACGGCATTTTGCAGCTCAGCTCGCATTTTTGCGTTATATGTAA 736
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619255  CCGCGCGGTGTCATTTACGGCATTTTGCAGCTCAGCTCGCATTTTTGCGTTATATGTAA 3619314

Query 737      CCCTTTCCCGCAGCGATCTCAACTCTTTTTCTTGAATGCGACTACTTTTTTCGTCGCCA 796
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619315  CCCTTTCCCGCCACGATCTCAACTCTTTTTCTTGAATGCGGTTACTTTTTCACTCTTCA 3619374

Query 797      TATTTTTACATTGAAGAAACATTT 820
              ||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619375  TAATTTTACATTGCAGAAACATTT 3619398

```

>gb|CP002774.1|  Serratia sp. AS12, complete genome
Length=5443009

Features in this part of subject sequence:

[Nickel-transporting ATPase.](#), [Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein](#)

Score = 854 bits (462), Expect = 0.0
Identities = 691/804 (86%), Gaps = 5/804 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 19      TGCAGGTGGTGCCTTCGCTGTGCCACCAGGTGATTGTGCTGCGACAGGGAGAAGTGGTTG 78
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619029  TGCAGGTGGTGCCTCACTGTGCCATCAGGTGATCGTACTGCGCCAAGGGGAAGTGGTTG 3619088

Query 79      AGCAGGGAGACTGCCGGCGATTTTCGCGCGCCCCGAGCCGACTATACCCGACAACCTGT 138
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619089  AACAGGGCGATTGCCAGACGATCTTCAACTCGCCTGCCGCCGCTTATACGCAGCAGCTGT 3619148

Query 139     TGCAGTTGGCGGATTAGCGCGAATTCAGAAGGGGTATTGCGCGCTGAGCGGTTCCGGCGA 198
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619149  TACAGCTGGCCGATTAGCGGGGGTACAGAAAGGGTATTGCGCGCTCAGTGGCTCCGGCGA 3619208

Query 199     TCGCGGCGCCGACGTTTTTCAGCGGCACATCGTTCGCGCTCTCATCGCTGCGCTGCACGA 258
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619209  TGGCGGCGCCAACGTTTTTTAACC GGCAATAAGGTAGCGCTTTCATCGCTGCGGTGCACAA 3619268

Query 259     ACAGGCAAGGTTCCCTTCCCAATTCGACGATCGCGCAGTTCGACCTGAATCTCCTGCAACG 318
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619269  ACAGGCAAGCTTCCCTTCCCACTCCACGATGGCGCAATCGACCTGAATCTCCTGCAAAAG 3619328

Query 319     ACAGATTAAGCTGTTGCATCACCTGCCAGGCCTCGGCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCA 378
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619329  ACAGCTTAAGCTGTTGCATAAACCAGGCTCCGCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCA 3619388

Query 379     GCCCAATCAGGTTGTTATCCTCGTCTATTCCGTTAAACGGAATCGGTTTCGACCTTTACGC 438
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619389  AGCCAATCAGGTTGTTATCTTCGTCTATCCCGCTAAGCGGAATCGGTTCAACCTTGATGC 3619448

Query 439     CGGTGAAAACCGGATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAAGTTGGA 498
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619449  CGGTAAAACCTGATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAAGTTGGA 3619508

Query 499     TACTCTCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAAAGGTGAAAACA-CTTTTACCTGACA-GGGTT 556
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619509  TACTATCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAAAA-GTGAAAACAGTTTTTACCTGACAGGGGTA 3619567

Query 557     ACTAAGTTATAGCCGTTGACTCCCGACTCTGCCGCGCACAAATGTTATTTAAATGTAAAT 616
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619568  ACTAAGTTATAGCCGTTGAGAACCAGCTCTGCTGAGCACATATGTTATTTAAATGTAAAA 3619627

Query 617     TTTGCCGCAAGCCATTAACCTGACCCCGTGTGCGGATGCCGTGCCATTTTTTGGCGCG 676
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619628  TATGTCACAACCTATTAACCGACCCCTGCGCTGCTGATATCGTG-C-TGTTTTGGTACG 3619685

Query 677     CCGTGCGGTGTTATTTACGGCATTTTGCAGCTCAGCTCGCATTTTTGCGTTATATGTAA 736
              ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3619686  CCGCGCGGTGTCATTTACGGCATTTTGCAGCTCAGCTCGCATTTTTGCGTTATATGTAA 3619745


```

```

Query 737      CCCTTTCCCGCAGCGATCTCAACTCTTTTTCTTGCAATGCGACTACTTTTTTCGTCGCCA 796
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619746  CCCTTTCCCGCCACGATCTCAACTCTTTTTCTTGCAATGCGGTTACTTTTCACTCTTCA 3619805

Query 797      TATTTTTACATTGAAGAAACATTT 820
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619806  TAATTTTACATTGCAGAAACATTT 3619829

```

>gb|CP002773.1|  Serratia plymuthica AS9, complete genome
Length=5442880

Features in this part of subject sequence:

[Nickel-transporting ATPase.](#), [Polyamine-transporting ATPase hypothetical protein](#)

Score = 854 bits (462), Expect = 0.0
Identities = 691/804 (86%), Gaps = 5/804 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 19      TGCAGGTGGTGCCTTCGCTGTGCCACCAGGTGATTGTGCTGCGACAGGGAGAAGTGTTG 78
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3618901  TGCAGGTGGTGCCTCACTGTGCCATCAGGTGATCGTACTGCGCCAAGGGGAAGTGTTG 3618960

Query 79      AGCAGGGAGACTGCCGGCGATTTTCGCGGCGCCCGCAGCCGACTATACCCGACAACGTG 138
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3618961  AACAGGGCGATTGCCAGACGATCTTCAACTCGCCTGCCGCGCTTATACGCAGCAGCTGT 3619020

Query 139     TGCAGTTGGCGGATTAGCGGCGAATTCAGAAGGGGTATTGCGCGCTGAGCGGTTCCGGCGA 198
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619021  TACAGCTGGCCGATTAGCGGCGGGGTGAGAAAGGGTATTGCGCGCTCAGTGGCTCCGGCGA 3619080

Query 199     TCGCGGCGCCGACGTTTTTCAGGGCGCACATCGTCGCGCTCTCATCGCTGCGCTGCACGA 258
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619081  TGGCGGCGCCAACGTTTTTTAACCAGGCGATAAGGTAGCGCTTTCATCGCTGCGGTGCACAA 3619140

Query 259     ACAGGCAAGGTTCCCTTCCCATTCGACGATCGCGCAGTCGACCTGAATCTCCTGCAACG 318
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619141  ACAGGCAAGGTTCCCTTCCCACTCCACGATGGCGCAATCGACCTGAATCTCCTGCAAAAG 3619200

Query 319     ACAGATTAAGCTGTTGCATCACCTGCCAGGCCTCGGCCCTTCATGGCTGAGCAGCTTCA 378
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619201  ACAGCTTAAGCTGTTGCATAACCTGCCAGGCGTCCGCCCTTCATGGCTGAGCAGTTTCA 3619260

Query 379     GCCCAATCAGGTTGTTATCCTCGTCTATTCGGTTAAACGGAATCGGTTTCGACCTTTACGC 438
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619261  AGCCAATCAGGTTGTTATCTTCGTCTATCCGCTAAGCGGAATCGGTTCAACCTTGATGC 3619320

Query 439     CGGTGAAACCGGATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAGTTGGA 498
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619321  CGGTAAAACCTGATAGCCAACGATAACTTTGCGGCAAGCGATGCACTACCGAAAGTTGGA 3619380

Query 499     TACTCTCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAGGTGAAACA-CTTTTACCTGACA-GGGTT 556
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619381  TACTATCCACATGAAATCCCTAGTTTGAAGAA-GTGAAACAGTTTTTACCTGACAGGGGTA 3619439

Query 557     ACTAAGTTATAGCCGTTGACTCCCGACTCTGCCGCGCACAAATGTTATTTAAATGTAAT 616
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619440  ACTAAGTTATAGCCGTTGAGAACCGACTCTGCTGAGCACATATGTTATTTAAATGTAATA 3619499

Query 617     TTTGCCGCAAGCCATTAACCTGACCCCGTGCTTGCCGATGCCGTTGCCATTTTTTGGCGCG 676
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619500  TATGTCACAACCTAATTAACCGACCCTGCGCTTGCTGATATCGTG-C-TGTTTTGGTACG 3619557

Query 677     CCGTGCGGTGTTATTTTACGGCATTGTCGACTCAGCTCGCATTTTTTGCCTTATATGTAA 736
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619558  CCGCGCGGTGTCATTTTACGGCATTGTCGACTCAGCTCGCATTTTTTGCCTTATATGTAA 3619617

```

```
Query 737      CCCTTTCCCGCAGCGATCTCAACTCTTTTTCTTGCAATGCGACTACTTTTTTCGTCGCCA 796
               ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619618  CCCTTTCCCGCCACGATCTCAACTCTTTTTCTTGCAATGCGGTACTTTTCACTCTTCA 3619677

Query 797      TATTTTACATTGAAGAACATTT 820
               || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3619678  TAATTTACATTGCAGAACATTT 3619701
```

G. Diseño de cebadores degenerados para la amplificación del gen de resistencia al glifosato

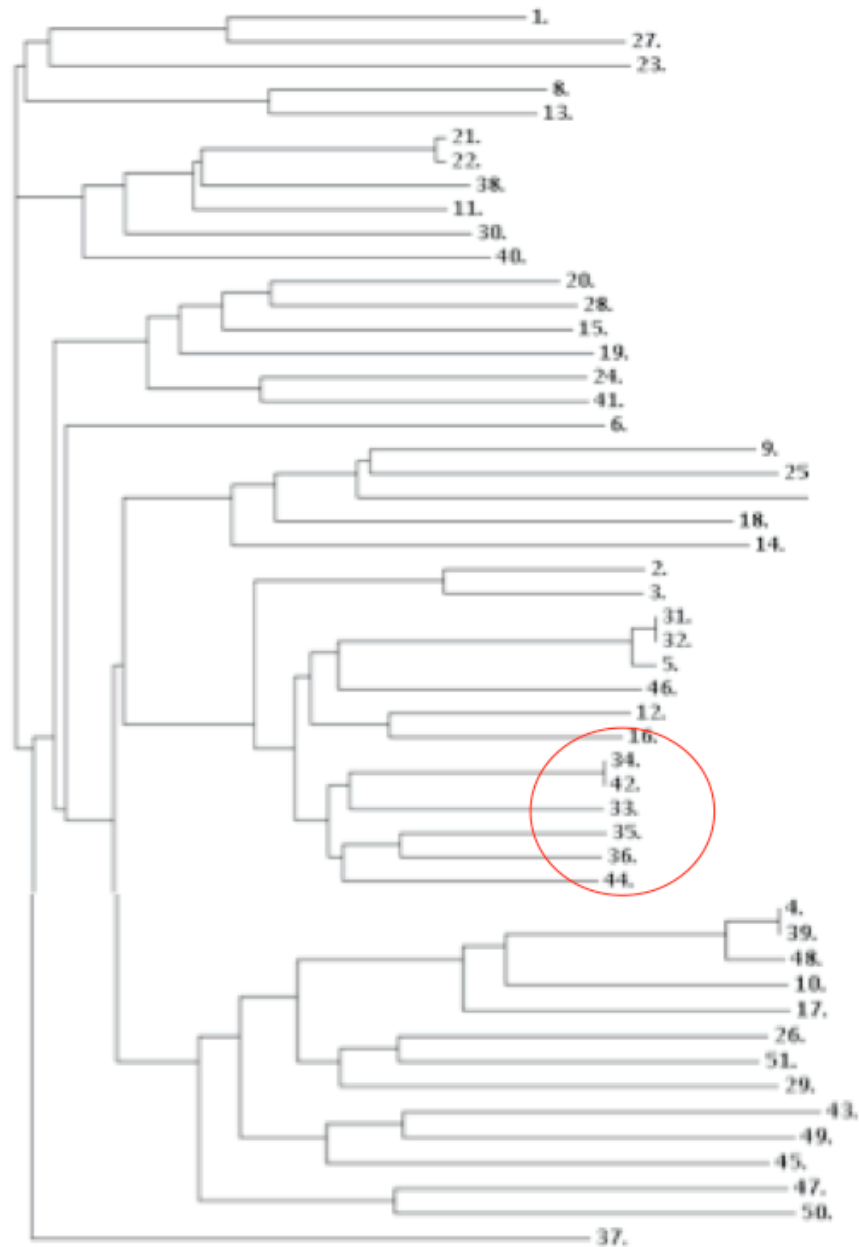
Lista de los organismos de los cuales se buscó la secuencia del gen EPSPS para el diseño de los cebadores degenerados:

1. *Xanthomonas albilineans*
2. *Pseudoalteromonas* sp.
3. *Pseudoalteromonas haloplanktis*
4. *Staphylococcus aureus* sbsp. *Aureus* MW2
5. *Haemophilus influenza* 86-028NP
6. *Desulfobacterium autotrophicum*
7. *Campylobacter curvus*
8. *Burkholderia glumae*
9. *Bdellovibrio bacteriovorus*
10. *Staphylococcus lugdunensis*
11. *Herbaspirillum seropedicae*
12. *Vibrio* sp.
13. *Burkholderia pseudomallei*
14. *Candidatus Puniceispirillum marinum*
15. *Microbacterium testaceum*
16. *Vibrio vulnificus*
17. *Staphylococcus pseudointermedius*
18. *Paenibacillus polymyxa*
19. *Rothia mucilaginosa*
20. *Propionibacterium freudenrichii* subsp *shermanii*
21. *Ralstonia solanacearum* ipo 1609
22. *Ralstonia solanacearum* MolK2
23. *Desulfohalohium rethaense* DSM 5692
24. *Corynebacterium pseudotuberculosis*
25. *Fibrobacter succinogees* subsp *succinogenes*
26. *Streptococcus pneumonia*
27. *Desulfovibrio desulfuricans* subsp *desulfuricans*
28. *Kytococcus sedentarius*
29. *Leuconostoc kimchii*
30. *Neisseria lactamica*
31. *Haemophilus influenzae* F3031
32. *Haemophilus influenzae* F3047
33. *Escherichia coli* K-12
34. *Erwinia amylovora*
35. *Yersinia pestis*
36. *Yersinia enterocolitica* subsp *enterocolitica*
37. *Bacteroides helcogenes*

38. *Bordetella pertussis*
39. *Staphylococcus aureus* subsp *aureus*
40. *Streptomyces coelicolor*
41. *Corynebacterium diphtheriae*
42. *Erwinia amylovora*
43. *Clostridium difficile*
44. *Pectobacterium atrosepticum*
45. *Helicobacter mustelae*
46. *Proteus mirabilis*
47. *Chlamydophila abortus*
48. *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* MRSA252
49. *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni*
50. *Chlamydia trachomatis*
51. *Streptococcus pyogenes*

Figura 48. Arbol filogenético de los genes EPSPS encontrados y grupo de genes pertenecientes a las Enterobacterias

En la figura, se puede observar el árbol filogenético, realizado con el programa Clustal W2”, de todos los genes EPSPS encontrados. En el círculo rojo se encuentran los genes pertenecientes al grupo de las Enterobacterias, los cuales fueron utilizados más adelante para el diseño de los cebadores degenerados.



Cuadro 24. Número de accesión según NCBI de los genes utilizados para el diseño de los cebadores degenerados

Bacteria a la que pertenece el gen EPSPS	Número de accesión
<i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430	Gene ID: 8913937
<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946	Gene ID: 8952013
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	Gene ID: 945528
<i>Yersinia pestis</i> CO92	Gene ID: 1174231
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	Gene ID: 4713234
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	Gene ID: 2884136

Figura 49. Alineación de los genes EPSPS utilizados para el diseño de cebadores degenerados

```

YersiniaP      ATGCTGGAATCCCTGACCTTACAACCCATTGCCCTAGTTAATGGCACCGTTAATTTACCT 60
YersiniaE      ATGCTGGAATCCCTGACTTTACACCCCAATGCCCTGATTAATGGCACTGTTAATTTACCC 60
Pectobacterium ATGCAGGAATCCCTGACCTTACAACCCATCAAGCTGATTAACGGTACTCTTAACTTCCA 60
ErwiniaA1      ATGCAGGATTCCTGACTTTACAACCTATCGCCCTGTAGACGGCACTGTTAACTTCCA 60
ErwiniaA2      ATGCAGGATTCCTGACTTTACAACCTATCGCCCTGTAGACGGCACTGTTAACTTCCA 60
EcoliK-12      AT---GGAATCCCTGACGTTACAACCCATCGCTCGTGTGATGGCACTATTAATCTGCC 57
                **  **  *****  *****  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

YersiniaP      GGTTCGAAGAGTGCTCTAACCGCGCACTGCTTCTGGCCGCGTTGGCCGAAGGGACCACT 120
YersiniaE      GGTTCATAAAGTGTTTCTAACCGTGCACTTCTTCTGGCAGCGCTGGCCAGGGGACAACT 120
Pectobacterium GGTTCATAAAGCGTGTGCAACCGAGCTTGTGCTGGCCGCGCTTGTGCGAAGGAAAGACC 120
ErwiniaA1      GGTTCATAAAGCGTGTGCAACCGAGCTTGTGCTGGCCGCGCTTGGCAAGGGCACCACT 120
ErwiniaA2      GGTTCATAAAGCGTGTGCAACCGAGCTTGTGCTGGCCGCGCTTGGCAAGGGCACCACT 120
EcoliK-12      GGTTCGAAGAGCGTGTGCAACCGCGCTTATTGCTGGCCGCAATAGCACACGGCAAAACA 117
                **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

YersiniaP      CAGTTGAATAACGTGTTAGACAGCGATGACATCCGCCACATGCTCAATGCATTACAGGCA 180
YersiniaE      CAGCTGAATAACTTGTAGACAGTGATGACATTCGCCATATGCTTAATGCTCTACAGGCA 180
Pectobacterium CGACTGACTAACCTGTTAGACAGTGACGATGTCGTCATATGCTTACTGCGTTAACGGCG 180
ErwiniaA1      CGCCTGACTAATCTGCTCGACAGCGACGATGTACGGCATATGCTGGATGCATTGCAGGCG 180
ErwiniaA2      CGCCTGACTAATCTGCTCGACAGCGACGATGTACGGCATATGCTGGATGCATTGCAGGCG 180
EcoliK-12      GTATTAAACAATCTGCTGGATAGCGATGACGTGCGCCATATGCTGAATGCATTAAAGCG 177
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

YersiniaP      TTAGGGGTGGACTTCCGCTTTCTGCTGATCGCACATGCTGTGAGGTTGATGGTCTGGGG 240
    
```



```

ErwiniaA1      GCGAACTGAAGGCAGTTGATTTGGATATGAATCACATCCCGATGCTGCCATGACGATAG 958
ErwiniaA2      GCGAACTGAAGGCAGTTGATTTGGATATGAATCACATCCCGATGCTGCCATGACGATAG 958
EcoliK-12      GTGAACTGAACGCTATTGATATGGATATGAACCATATTCCTGATGCGGCGATGACCATTG 955
* * * * *
YersiniaP      CGACTACGGCATTATTTGCC---ACGGGCCAACGACGATCCGCAATATCTACAACCTGGC 1015
YersiniaE      CTACCACCGACTGTTTGCC---GACGGCCGACTGTTATTCGTAATACTATAACTGGC 1015
Pectobacterium CGACGGCGGCGCTTTTCGCTCAGGGCGGACGACCCACGCTGCGTAATACTATAACTGGC 1018
ErwiniaA1      CAACCACCGCGCTGTTTGCG---CAAGGTACCACGGTCATGCGTAATAATTTATAACTGGC 1015
ErwiniaA2      CAACCACCGCGCTGTTTGCG---CAAGGTACCACGGTCATGCGTAATAATTTATAACTGGC 1015
EcoliK-12      CCACGGCGGCGTATTGCA---AAAGGACCACCCACGCTGCGCAATACTATAACTGGC 1012
* * * * *
YersiniaP      GGGTAAAAGAAACTGACCGGCTGACGGCGATGGCAACCGAGTTGAGAAAAGTAGGTGCTG 1075
YersiniaE      GAGTGAAGGAAACCGACCGCTTATCCGCGATGGCGACTGAATTGAGAAAAGTGGGCGCG 1075
Pectobacterium GAGTGAAGGAAACCGATCGTTTAGCAGCGATGGCGATTGAACTGCGCAAAAGTGGGCGCG 1078
ErwiniaA1      GGGTTAAAGAGACCGATCGGCTGGCGCGATGGCGACAGAGTTACGTAAAAGTTGGCGCTG 1075
ErwiniaA2      GGGTTAAAGAGACCGATCGGCTGGCGCGATGGCGACAGAGTTACGTAAAAGTTGGCGCTG 1075
EcoliK-12      GTGTTAAAGAGACCGATCGCCTGTTTGCATGGCAACAGAACTGCGTAAAAGTGGGCGCG 1072
* * * * *
YersiniaP      AAGTGAAGAGGGGGAAGATTACATCCGCGTGGTTCCACCCTT-GCAGCTAACTGCTGCA 1134
YersiniaE      AAGTGAAGAGGGGCAAGACTACATTCGGGTGGTGCCCTGC-GCAGCTAACTGCAAGCC 1134
Pectobacterium AAGTGAAGAGGGTAACGACTACATTCGCATTACGCCACCAGC-CAAGCTGAAAGCGGCA 1137
ErwiniaA1      AAGTTGAAGAGGCTATGACTTCATTCGTATTACACCACCCGCCAAAATTGC-CTGCGCG 1134
ErwiniaA2      AAGTTGAAGAGGCTATGACTTCATTCGTATTACACCACCCGCCAAAATTGC-CTGCGCG 1134
EcoliK-12      AAGTGAAGAGGGGACGATTACATTCGTATCACTCC-TCCGGA AAAACTGAACTTTGCC 1131
* * * * *
YersiniaP      GATATTGGTACCTACGATGACCACCGTATGGCGATGTGTTTCTCGCTGGTTCGCTTATCA 1194
YersiniaE      GAAATAGGGACTTATAATGACCACCGCATGGCGATGTGTTTCTCGCTGGTGGCTTATCT 1194
Pectobacterium GAAATCGGTACGTACAACGATCATCGTATGGCGATGTGTTTCTCGCTGGTGGCGTTATCG 1197
ErwiniaA1      CAAATCGCTACCTATAACGATCACCGTATGGCCATGTGTTTCTCGCTGGTGGCTCTTTCA 1194
ErwiniaA2      CAAATCGCTACCTATAACGATCACCGTATGGCCATGTGTTTCTCGCTGGTGGCTCTTTCA 1194
EcoliK-12      GAGATCGGCACATACAATGATCACCGGATGGCGATGTGTTTCTCGCTGGTGGCGTTGTCA 1191
* * * * *
YersiniaP      GATACCCCGTGACGATCCTTGACCCGAAATGTACCGCAAAAACCTTCCCTGATTATTTT 1254
YersiniaE      GACACGCCGGTGACTATCCTTGAATCCGAAATGTACCGCAAAAACCTTCCCTGACTACTTT 1254
Pectobacterium GATACGCCAGTACGATTTTGGATCCGAAGTGTACGGCTAAAACCTTCCCTGACTACTTC 1257
ErwiniaA1      TCGACCCCGGTGACCATCCTTGAATCCGAATTGTACCGCAAAAACCTTCCCTGATTATTTT 1254
ErwiniaA2      TCGACCCCGGTGACCATCCTTGAATCCGAATTGTACCGCAAAAACCTTCCCTGATTATTTT 1254
EcoliK-12      GATACACCAAGTGACGATTCCTTGAATCCCAATGCACGGCAAAAACCTTCCCGATTATTTT 1251
* * * * *
YersiniaP      GAACAGTTTGGCGCTCTGAGCCAACTGGCCTGA 1287
YersiniaE      GAACAACTGGCCCGATTGAGCCAGATAGCCTAA 1287
Pectobacterium GAGCAATTGGCGCTCTCAGCGAACTAGCGTGA 1290
ErwiniaA1      ACTCAGTTAGCCCGCATCAGCCAGCTGGCATAA 1287

```

```

ErwiniaA2      ACTCAGTTAGCCCGCATCAGCCAGCTGGCATAA 1287
EcoliK-12     GAGCAGCTGGCGGGATTAGCCAGGCAGCCTGA 1284
                ** * ** * * * ** * ** * *
    
```

Figura 50. Alineación de la secuencia de aminoácidos de los genes EPSPS utilizados para el diseño de cebadores degenerados

```

YersiniaP      MLESLLTLPQIALVNGTVNLPGSKSVSNRALLLAALAEGTTQLNNVLDSDDIRHMLNALQA 60
YersiniaE      MLESLLTLPQIALVNGTVNLPGSKSVSNRALLLAALAEGTTQLNNVLDSDDIRHMLNALQA 60
Pectobacterium MQESLLTLPQIALVNGTVNLPGSKSVSNRALLLAALSEGKTRLTNLLSDSDVRHMLTALTA 60
EcoliK-12     -MESLLTLPQIARVDGTINLPGSKSVSNRALLLAALAHGKTVLTLNLLSDSDVRHMLNALTA 59
ErwiniaA1      MQDSLTLQPIALVDGTVNLPGSKSVSNRALLLAALAKGTTRLTNLLSDSDVRHMLDALQA 60
ErwiniaA2      MQDSLTLQPIALVDGTVNLPGSKSVSNRALLLAALAKGTTRLTNLLSDSDVRHMLDALQA 60
                :****:* * :*:*****:.*.* *.*:*****:**** * *
YersiniaP      LGVDFRLSADRTCCEVDGLGGKLVAEQPLSLFLGNAGTAMRPLAAVLCGNSDIVLTGEP 120
YersiniaE      LGVKYRLSADRTRCEVDGLGGKLVAEQPLELFLGNAGTAMRPLAAALCLGKNDIVLTGEP 120
Pectobacterium LGVEYHLSSDRTVCEIIGLGGFAASQPLELFLGNAGTAMRPLAAALCLTDGDIVLTGEP 120
EcoliK-12     LGVSYTSLADRTRCEIIGNGGPLHAEGALELFLGNAGTAMRPLAAALCLGNSDIVLTGEP 119
ErwiniaA1      LGVQYLSADRTRCEITGQGGALQADRSLELFLGNAGTAMRPLAAALCIGNDIILTGEP 120
ErwiniaA2      LGVQYLSADRTRCEITGQGGALQADRSLELFLGNAGTAMRPLAAALCIGNDIILTGEP 120
                **.*: **:* * * * * : * .*.*****:.*.*: .**:* * * *
YersiniaP      RMKERPIGHLVDALRQGGAQIDYLEQENYPPRLRGGFRGGELTVDGVRSSQFLTALLMT 180
YersiniaE      RMKERPIGHLVDALRQGGAQIDYLEQENYPPRLRGGFRGGKLTVDGVSQFLTALLMT 180
Pectobacterium RMKERPIGHLVDALRQGGAKIDYLEQENYPPRLRHGGFQGGEISVDGVSQFLTALLMT 180
EcoliK-12     RMKERPIGHLVDALRGGAKITYLEQENYPPRLRQGGFTGGNVVDGVSQFLTALLMT 179
ErwiniaA1      RMKERPIGHLVDALRQGGADVVDYLEQVDYPPLRVKGGSFSGEITVDGVSQFLTALLMA 180
ErwiniaA2      RMKERPIGHLVDALRQGGADVVDYLEQVDYPPLRVKGGSFSGEITVDGVSQFLTALLMA 180
                ***** **.*: * * * :*****:.*.*: * * * * * * * * *
YersiniaP      APLAEQDQTTIRIMGDLVSKPYIDITLHLMKAFGIDVGHENYQIFHIKGGQTYRSPGYLV 240
YersiniaE      APLAEQDTEIQIQGELVSKPYIDITLHLMKAFGVVHENYQIFHIKGGQTYRSPGIYLV 240
Pectobacterium APLAAQDTQISIQGDLVSKPYIDITLHMMKAFGIDVRHENYQRFVAGRQYRSPGDYLV 240
EcoliK-12     APLAPEDTVIRIKGDLVSKPYIDITLNLKMTFGVEIENQHYQQFVVKGGQSYQSPGYLV 239
ErwiniaA1      APLAKNDSQIIIKGDLVSKPYIDITLKLMAAFGVVDNNNYHTFRIRGQQYQATSEYLV 240
ErwiniaA2      APLAKNDSQIIIKGDLVSKPYIDITLKLMAAFGVVDNNNYHTFRIRGQQYQATSEYLV 240
                **** :*: * * * :*****:.*.*: : * * * * * * * * *
YersiniaP      EGDASSASYFLAAAAIKGGTVRVTGIGKKSQVGDTKFADVLEKMGAKVTWGDDYIECSR 300
YersiniaE      EGDASSASYFLAAAAIKGGTVRVTGIGKQSVQGDTKFADVLEKMGAKISWGDDYIECSR 300
Pectobacterium EGDASSASYFLAAAAIKGGVVRVTGIGRNSVQGDIRFADVLEKMGAIVRWGEDYIECER 300
EcoliK-12     EGDASSASYFLAAAAIKGGTVKVTGIGRNSMQGDIRFADVLEKMGATICWGDDYISCTR 299
ErwiniaA1      EGDASSASYFLAAAAIKGGTVKVTGIGRNSMQGDIRFADVLEKMGASVEWGDDYIACTR 300
ErwiniaA2      EGDASSASYFLAAAAIKGGTVKVTGIGRNSMQGDIRFADVLEKMGASVEWGDDYIACTR 300
                *****.*.*:.*.*:.*.*:***** :***** : **:* * * *
    
```

```

YersiniaP      ELQGIDMDMNHIPDAAMTIATTALFATG-PTTIRNIYNWRVKETDRLTAMATELRKVGAE 359
YersiniaE      ELQGIDMDMNHIPDAAMTIATTALFADG-PTVIRNIYNWRVKETDRLSAMATELRKVGAE 359
Pectobacterium ELHAIDMDMNHIPDAAMTIATAALFAQGGTTTLRNIYNWRVKETDRLAAMAEELRKVGAE 360
EcoliK-12     ELNAIDMDMNHIPDAAMTIATAALFAKG-TTTLRNIYNWRVKETDRLFAMATELRKVGAE 358
ErwiniaA1     ELKAVDLDMNHIPDAAMTIATTALFAQG-TTVMRNIYNWRVKETDRLAAMATELRKVGAE 359
ErwiniaA2     ELKAVDLDMNHIPDAAMTIATTALFAQG-TTVMRNIYNWRVKETDRLAAMATELRKVGAE 359
**.:*:*****:**** * .*:***** ** *****

YersiniaP      VEEGEDYIRVVPPLQLTAADIGTYDDHRMAMCFSLVALSDTPVTILDPKCTAKTFPDYFE 419
YersiniaE      VEEGQDYIRVPPAQLIAAEIGTYNDHRMAMCFSLVALSDTPVTILDPKCTAKTFPDYFE 419
Pectobacterium VEEGNDYIRITPPAKLKAAEIGTYNDHRMAMCFSLVALSDTPVTILDPKCTAKTFPDYFE 420
EcoliK-12     VEEGHDYIRITPPEKLNFAEIATYNDHRMAMCFSLVALSDTPVTILDPKCTAKTFPDYFE 418
ErwiniaA1     VEEGYDFIRITPPAKIACAQIATYNDHRMAMCFSLVALSSTPVTILDPNCTAKTFPDYFT 419
ErwiniaA2     VEEGYDFIRITPPAKIACAQIATYNDHRMAMCFSLVALSSTPVTILDPNCTAKTFPDYFT 419
**** *:*:.* * : *:*:*****.*****:*****

YersiniaP      QFARLSQL- 427
YersiniaE      QLARLSQIA 428
Pectobacterium QLARLSELA 429
EcoliK-12     QLARISQAA 427
ErwiniaA1     QLARISQLA 428
ErwiniaA2     QLARISQLA 428
*:*:*:

```

Cuadro 25. Código de los cebadores degenerados

Código	Nucleótidos
B	C+G+T
D	A+G+T
H	A+C+T
K	T+G
M	A+C
N	A+C+G+T
R	A+G
S	G+C
W	A+T
V	A+C+G
X	Una base menor (especificada aparte)
Y	C+T

Cuadro 26. Estudio de los cebadores diseñados por medio del programa CLC

PrimerID	Sequence(5'-3')	Lengt h(bp)	Tm(°C)	Tm_3'e nd(°C)	CG(%)	Linguistic_com plexity(%)	Primer_Qu ality(%)
	atgcaggattccctgactttacaacctatcgccctgtgac ggcactgttaacctccaggttctaaaa						
1F1_31-50	cgttggcaaagggc accacc	20	62. 2	41.8	65	89	93
2F1_55-74	tgactaatctgctcg acagc	20	54. 1	37.8	50	95	92
3F1_125-145	cagtctgtccgcaga ccgtac	21	59. 3	30.9	61. 9	93	95
4F1_159-180	actggtcagggagg cgcacttc	22	63. 2	38.9	63. 6	95	96
5F1_182-201	ggccgacagatcgc ttgagc	20	60. 8	36	65	97	92
6F1_207-228	cttgaaatgcaggt acggcga	22	59. 7	39.1	54. 5	98	92
7F1_294-316	atgaaagagcggcc gataggcca	23	62. 3	33.5	56. 5	95	97
8F1_346-370	ctgacgtcgattatc ttgagcaggt	25	58. 1	32.5	48	98	92
9F1_410-429	cggtgaaatcacgg tggacg	20	58. 5	39.5	60	87	92
10F1_547-566	tgaagctgatggctg cgttc	20	58. 58	38.9	55	92	97
11F1_596-617	tacctccgcattcgc gggcag	22	63. 8	45	63. 6	94	92
12F1_620-639	gcagtatcaggcaa cgagtg	20	55. 9	34	55	94	91
13F1_645-665	ctggtagaaggcga tgcctct	21	58. 4	34.2	57. 1	97	95
14F1_666-689	tctgcgtcttattcc tggcagct	24	60. 60	39.5	50	96	94
15F1_690-710	gcccaatcaaagg cggtacg	21	61. 7	39.1	61. 9	95	95
16F1_721-740	caggaattggtcgta acagc	20	53. 8	30.5	50	97	90
17F1_747-771	ggcgatattcgtttg ccgatgtgt	25	59. 9	35.9	48	92	92
18F1_812-836	tattgcctgcaccc	25	65. 65.	35.8	60	97	94

Continuación Cuadro 26.

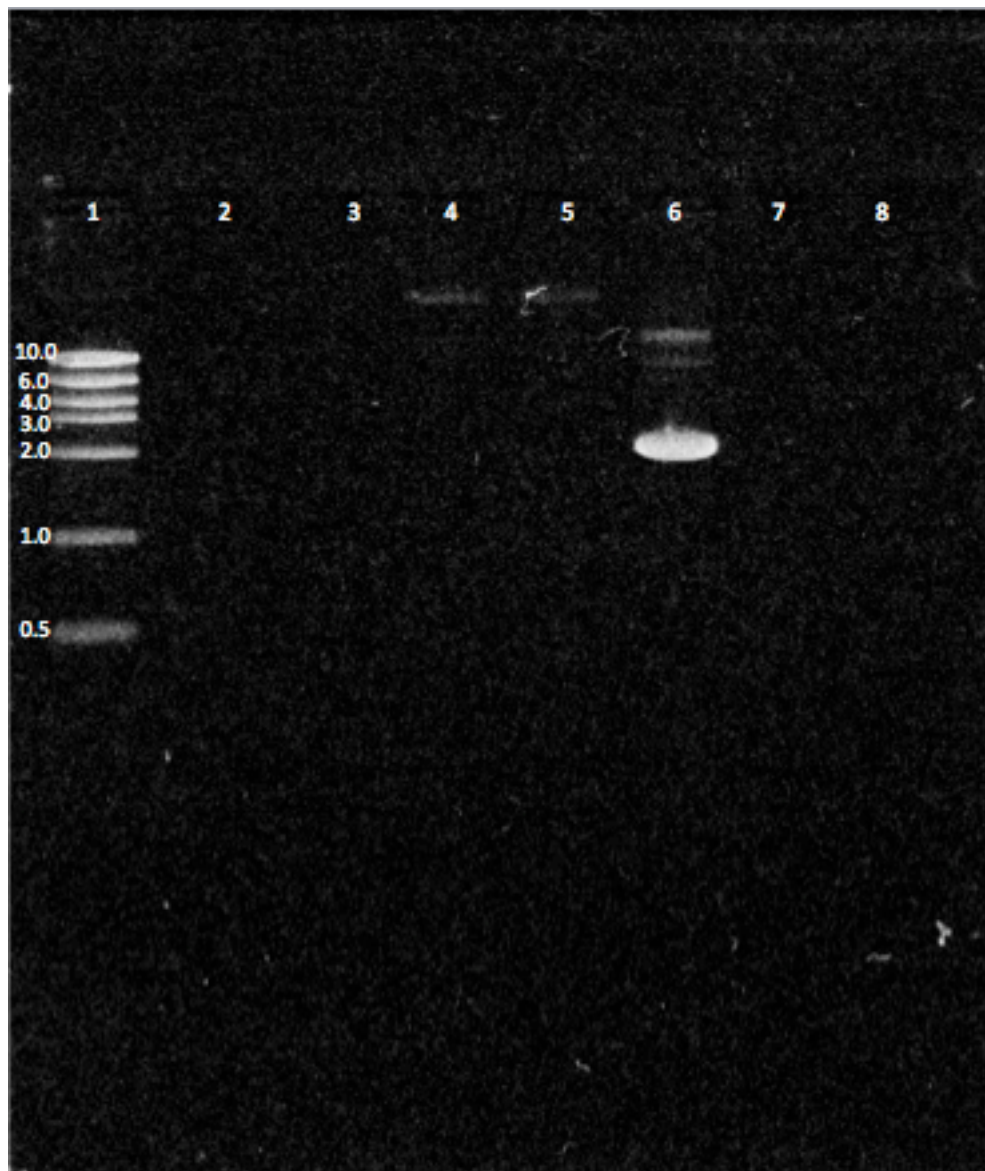
PrimerID	Sequence(5'-3')	Lengt h(bp)	Tm(°C)	Tm_3'e nd(°C)	CG(%)	Linguistic_com plexity(%)	Primer_Qu ality(%)
21F1_943-963	ggcgggttaaagag accgatc	21	57. 7	30.4	57. 1	96	85
22F1_989-1008	acgtaaagttggcg ctgaag	20	55. 7	38.3	50	95	94
23F1_1042-1061	caccgcctcctc gcctgc	20	60. 7	32.7	60	91	85
24F1_1065-1089	caaatcgctacat aacgatcacc	25	55. 3	30.3	44	94	82
25F1_1146-1169	gatccgaattgtacc gccaaaacc	24	58. 8	35	50	95	94
26F1_1185-1204	actcagttagccgc atcag	20	56. 7	37.2	55	93	92
1R1_1158-1177	tcaggaaggtttg gcggt	20	58. 9	35.1	55	92	94
2R1_1133-1152	tcggatcaaggatg gtcacc	20	56. 3	31.2	55	92	92
3R1_1105-1124	tgaagagccacca gcgaga	20	58. 1	36.5	55	89	94
4R1_1064-1088	gtgatgttataggt agcgatttgc	25	55. 7	33.1	44	94	84
5R1_1042-1062	cgaggcaatttgg cgggtg	21	62. 6	40.6	61. 9	91	94
6R1_998-1019	gccttctcaactca gcgcca	22	60. 1	38.9	54. 5	85	91
7R1_973-992	acgtaactctgtcgc catcg	20	56. 6	38	55	95	90
8R1_908-930	tacgatgaccgtgg taccttgc	23	61	31.9	56. 5	96	91
9R1_863-882	tcatggcagcatcgg ggatg	20	59. 8	33.4	60	89	95
10R1_825-844	actgccttcagttcg ccacg	20	60	38.9	60	93	95
11R1_755-774	ccaacacatcggca aaacga	20	56. 3	32.7	50	90	93
12R1_688-708	taccgctttgattgc ggcag	21	60. 3	37.2	57. 1	96	96
13R1_651-672	acgcagaagaggca tcgccttc	22	61. 6	32.9	59. 1	95	95
15R1_541-560	agccatcagcttcag	20	58. 33.5	55	89	96	

Continuación Cuadro 26.

PrimerID	Sequence(5'-3')	Length(bp)	Tm(°C)	Tm_3'end(°C)	CG(%)	Linguistic_complexity(%)	Primer_Quality(%)
18R1_379-398	ccccttaacacgcag cggag	20	60. 6	42.7	65	95	91
19R1_345-369	cctgctcaagataat cgacgtcagc	25	59. 4	37.8	52	98	94
20R1_311-333	gcaaagcgtctacc agatggcct	23	61. 4	33.9	5	99	97
21R1_286-310	atcgggcgctctttc atgcgaggct	25	68. 3	44.6	64	89	89
22R1_169-191	tctgtcggcctgaag tgcgcctc	23	65. 1	40.2	2	92	97
23R1_137-156	ttcacagcgggtac ggtct	20	58. 32.7	55	93	96	
24R1_111-130	agactgtactgcacg ccaag	20	57. 39.5	55	93	90	
25R1_63-83	tacatcgtcgtgtc gagcag	21	58. 5	34.7	1	92	90
26R1_37-61	ttagtcaggcgggtg gtgcccttg	25	64. 8	33.7	60	94	94
27R1_2-21	aaaagctcggttcg acacg	20	57. 6	33.6	55	94	94

Figura 51. Visualización de los productos de la primera prueba de PCR utilizando los cebadores degenerados

Gel de agarosa al 1.2% en TBE para la visualización de los productos amplificados por los cebadores degenerados. De izquierda a derecha: en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular “Mass ladder” en kilobases (New England Biolabs, N3237S), en el pozo 2 se encuentran 5 μ L del producto de PCR, en el pozo 3 se encuentran 5 μ L del producto de PCR, en el pozo 5 se encuentran se encuentran 10 μ L del producto de PCR, en el pozo 6 se encuentran 10 μ L del producto de PCR, los pozos 7 y 8 se encuentran vacíos.



H. Tamizaje de los clones con inserto de producto de PCR degenerado

Figura 52. Tamizaje de la transformación de *E. coli* DH5 α con el vector pCR2.1 con inserto del producto del PCR degenerado

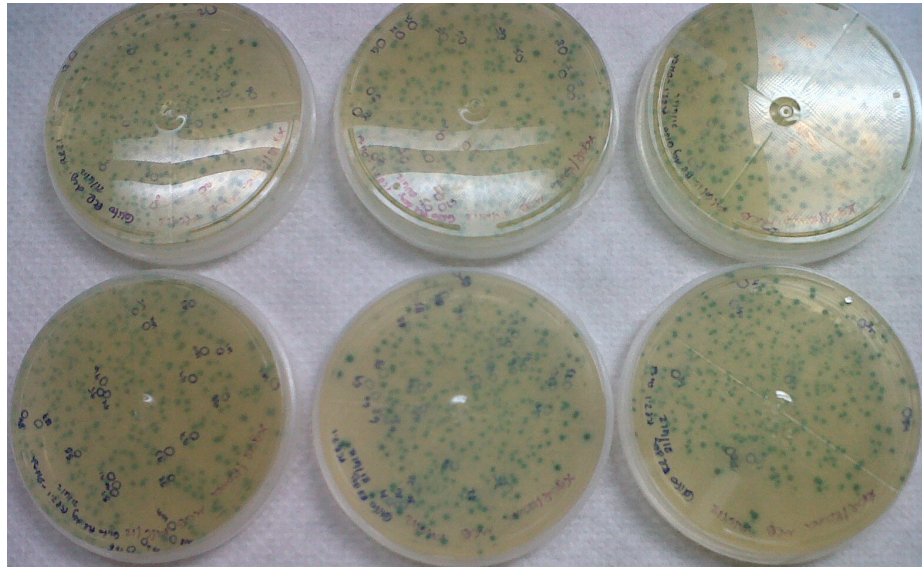
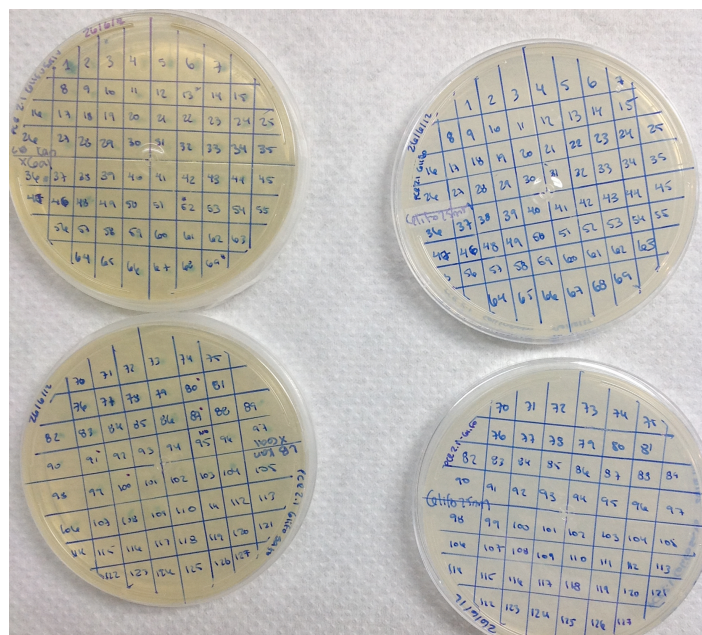


Figura 53. Colonias blancas PCRG inoculadas en Xgal/kanamicina y en glifosato 25 mM



I. Caracterización de *Serratia marcescens*

Figura 54. Crecimiento de la muestra *Serratia marcescens* en tetraciclina



Figura 55. Caracterización de la muestra *Serratia marcescens* en diferentes antibióticos. En la figura, de izquierda a derecha, la primera placa corresponde al antibiótico kanamicina, la segunda a estreptomycinina y la tercera a cloranfenicol. Como se puede observar en ninguna placa hay crecimiento.

