

**TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS CON PROTEÍNAS
AUTOFLUORESCENTES COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA
DINÁMICA DE COLONIZACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES**

SEBASTIÁN JOJOA CRUZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
CALI
2014**

**TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS CON PROTEÍNAS
AUTOFLUORESCENTES COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA
DINÁMICA DE COLONIZACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES**

SEBASTIÁN JOJOA CRUZ

Trabajo de Grado

**Tutor: Dra. Thaura Ghneim Herrera
Laboratorio de Fisiología Vegetal
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Icesi**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
CALI
2014**

Tabla de Contenido

1. Resumen del proyecto	7
2. Planteamiento del problema.....	8
3. Marco teórico y estado del arte	10
3.1. ¿Cómo estudiar las bacterias endófitas?.....	10
3.2. Expresión de AFPs en bacterias endófitas.	11
3.3. Proteínas Autofluorescentes.....	12
3.4. Ventajas del uso de AFPs en estudios de bacterias endófitas	13
4. Objetivos	15
4.1. Objetivo General.....	15
4.2. Objetivos Específicos.....	15
5. Materiales y Metodología	16
5.1. Bacterias y cultivo.....	16
5.2. Vectores.....	16
5.3. Propagación en <i>E. coli</i>	17
5.4. Extracción de ADN plasmídico	18
5.5. Transformación de los endófitos con AFPs por electroporación.....	18
5.6. Transformación de <i>Rhizobium</i> sp. por choque térmico.....	19
5.7. Visualización de la fluorescencia	19
5.8. Matriz de marco lógico.....	20
6. Resultados	21
6.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α con pmCherry y pmOrange2..	21
6.2. Amplificación mediante PCR de los genes codificantes de pmCherry y pmOrange2	22
6.3. Inducción	26
6.4. Visualización.....	28
6.5. Evaluación de la estabilidad de la transformación en <i>E. coli</i>	31
6.6. Stock de <i>E. coli</i> transformantes y evaluación de su viabilidad.....	32
6.7. Extracción de ADN plasmídico	33
6.8. Transformación de bacterias endófitas	33
7. Discusión.....	37
8. Conclusiones.....	43

9. Recomendaciones.....	44
10. Bibliografía.....	46
11. Impacto ambiental	51
12. Disposiciones vigentes	52
13. Agradecimientos.....	53
14. Anexos	54

Índice de Figuras

Figura 1. Células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α transformadas.....	22
Figura 2. PCR de colonia para <i>E. coli</i> transformadas con pmCherry y pmOrange2.	26
Figura 3. Inducción de la expresión en <i>E. coli</i>	27
Figura 4. Seguimiento de la fluorescencia de mCherry en <i>E. coli</i> transformadas. .	29
Figura 5. Seguimiento de la fluorescencia de mOrange2 en <i>E. coli</i> transformadas.	29
Figura 6. Comparación de la fluorescencia emitida por las AFPs usadas.	30
Figura 7. Comparación entre los espectros de excitación y emisión de las AFPs bajo el filtro Y-2E.....	30
Figura 8. Estabilidad de la transformación con pmCherry y pmOrange2 en <i>E. coli</i>	31
Figura 9. Viabilidad del stock de <i>E. coli</i> transformadas con pmCherry y pmOrange2.....	32
Figura 10. Crecimiento de colonias de bacterias transformadas en agar LB con ampicilina.....	35
Figura 11. Amplificación mediante PCR para comprobar la incorporación del plásmido por parte de las bacterias transformadas.	35
Figura 12. Seguimiento de la fluorescencia de mCherry en <i>Pantoea</i> sp. transformadas.....	36
Figura 13. Cultivo de bacterias de <i>Rhizobium</i> sp. en diferentes etapas del proceso de transformación.	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Posibles productos de amplificaciones inespecíficas en la especie <i>E. coli</i>	23
Tabla 2. Posibles productos de amplificaciones inespecíficas en el género <i>Pantoea</i>	23
Tabla 3. Posibles productos de amplificaciones inespecíficas en el género <i>Rhizobium</i>	23
Tabla 4. Condiciones finales de PCR.	25

Abreviaturas:

AFP: Auto-Fluorescent Protein

GFP: Green Fluorescent Protein

EmGFP: Emerald Green Fluorescent Protein

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

PCR: Polymerase chain reaction

1. Resumen del proyecto

Actualmente, debido a la creciente población mundial y al cambio climático, el mundo se encuentra en la necesidad de aumentar la producción de alimentos con prácticas amigables con el medio ambiente. Diferentes estrategias han surgido para enfrentar este problema, y el uso de bacterias endófitas en los cultivos es una de ellas. Una bacteria endófitas se ha definido como aquella que puede ser aislada a partir de tejido vegetal desinfectado superficialmente y que no causa daño aparente a la planta, es decir, una bacteria que habita al interior de la planta y juega un papel beneficioso o inocuo para ésta (Elbeltagy, et al., 2000). Las bacterias endófitas tienen diferentes efectos beneficiosos para la planta, como la fijación biológica de nitrógeno, la promoción del crecimiento, resistencia contra patógenos, entre otras, por lo que son una herramienta deseable para implementar en los cultivos. Es aquí donde las variedades silvestres de los cultivos cobran gran importancia, puesto que presentan una mayor diversidad de bacterias endófitas, en comparación con las variedades comerciales, ya que no han sido sometidas a ciertas presiones de selección (Elbeltagy, et al., 2000). No obstante, se ha reportado que la interacción planta – endófito es genotipo específica (Adams, 2002), es decir, la planta es selectiva en cuanto a los endófitos que permite que la colonicen. De este modo, para determinar si un endófito es capaz de colonizar una planta dada, es necesario poder visualizarlo. Existen diferentes formas para poder realizar dicha visualización, entre ellas el marcaje con proteínas autofluorescentes que presenta ciertas características que lo hacen superior a otros métodos, debido a que este tipo de marcaje es independiente de sustrato.

Dicho esto, el objetivo que se pretendió alcanzar en este proyecto fue la transformación de bacterias endófitas aisladas de especies silvestres de arroz con secuencias codificantes de proteínas fluorescentes para su futura utilización como herramienta para evaluar la colonización de los tejidos vegetales por parte de estas bacterias. Para esto, se realizaron esfuerzos en el marcaje de 2 cepas de bacterias endófitas previamente aisladas en el laboratorio, *Rhizobium* sp. con pmOrange2 y *Pantoea* sp. con pmCherry. Los objetivos fueron parcialmente alcanzados, debido a que se logró la transformación de *Pantoea* sp. mas no de *Rhizobium* sp.

Con los resultados obtenidos, se generó un protocolo de transformación de bacterias endófitas con proteínas autofluorescentes que sirve de herramienta para el marcaje de bacterias de interés para futuros estudios, entre ellos ensayos de colonización *in vivo* en plantas de arroz.

2. Planteamiento del problema

Los cereales son la fuente de alimentos más importante del mundo tanto de manera directa, para el consumo humano, como de manera indirecta, para la producción pecuaria (FAO, 2002). Entre los cereales, el arroz tiene un rol fundamental, ya que representa la principal fuente de alimento para más de la mitad de la población mundial (IRRI, s.f) y es el segundo cereal, después del trigo, con mayor demanda en el mundo según datos y pronósticos de la FAO para el periodo de años entre 1965 y 2030 (FAO, 2002).

El crecimiento poblacional de las últimas décadas ha traído consigo un aumento en la demanda de alimentos que a su vez ha exigido un aumento en la producción. Si bien, la producción de arroz ha venido incrementando desde la década de los 40's, gracias a diferentes estrategias empleadas, esta enfrenta nuevos desafíos de cara al cambio climático global. Dos tendencias son reconocidas actualmente como consecuencias del cambio climático: un aumento en la temperatura que causará un mayor estrés térmico y una mayor ocurrencia de climas extremos severos (IRRI, 2010); lo cual se traduce en un mayor estrés para los cultivos y una disminución en el rendimiento. Para contrarrestar esta disminución en la producción se tiende a utilizar más fertilizantes químicos para promover el crecimiento de los cultivos, pero estos compuestos contribuyen a empeorar los efectos del cambio climático, por lo que no representa una estrategia a largo plazo.

A nivel mundial se reconoce la necesidad de diseñar nuevas estrategias que permitan sostener la producción de los cultivos ante el nuevo escenario climático, basadas en prácticas ambientalmente amigables. El uso de bacterias endófitas representa una opción promisoría. Una bacteria endófitas se ha definido como aquella que puede ser aislada a partir de tejido vegetal desinfectado superficialmente y que no causa daño aparente a la planta, es decir, una bacteria que habita al interior de la planta y juega un papel beneficioso o inocuo para ésta (Elbeltagy, et al., 2000). Se ha encontrado que muchas bacterias endófitas tienen efectos beneficiosos sobre la planta hospedera como la fijación biológica de nitrógeno, estimulación del crecimiento y resistencia contra patógenos (Elbeltagy, et al., 2000). Se plantea que estos mismos efectos pueden ser alcanzados en la planta mediante el uso de fertilizantes y pesticidas, sin embargo, las bacterias endófitas son una estrategia que ayuda a mitigar el impacto ambiental causado por el uso indiscriminado de estos compuestos.

Antes de colonizar la planta, las bacterias endófitas hacen parte de la comunidad de organismos de la rizósfera, que se encuentra en estrecho contacto con las raíces de la planta. Para que una bacteria pueda colonizar a la planta necesita que existan un tipo de señales producidas por la planta que le permita la entrada.

Muchas de estas señales son dependientes del genotipo de la planta, por lo que se puede generar una especificidad en la interacción endófito planta, de modo que solo ciertos endófitos sean elegidos por la planta para permitir su colonización (Compant, Clément, & Sessitsch, 2010). Lo anterior se traduce en una diferencia en la composición de las comunidades de endófitos entre especies y cultivares vegetales. En el caso de las plantas de cultivo, se ha planteado que las especies silvestres poseen comunidades más ricas (Hung, et al., 2007), lo cual ha motivado interés en estudiarlas y transferirlas a los cultivares comerciales. En cuanto a las variedades cultivadas de arroz se ha propuesto que éstas han sufrido un empobrecimiento de sus comunidades bacterianas, como consecuencia del uso de fertilizantes, la domesticación y la selección artificial desde el inicio de la agricultura (Elbeltagy, et al., 2000). Debido a esto las especies silvestres de arroz, como *Oryza latifolia* y *Oryza glumaepatula*, cobran importancia como fuente de variación natural de comunidades de endófitos que no han sido sometidas a presiones de selección. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existe especificidad de la interacción planta-bacteria, sobre todo a nivel de la colonización (Adams, 2002). Cada especie tiene un comportamiento diferente, por lo que no es posible asegurar que una bacteria endófito de una especie pueda colonizar otras, aun cuando estén emparentadas, y en el caso en que se dé la colonización, todavía no es posible asegurar que las bacterias tendrán un ambiente propicio y llevarán a cabo las mismas funciones (Elbeltagy, et al., 2000). Es por esto que surge la necesidad de visualizar las bacterias endófitas para poder identificar la ocurrencia de la colonización y la supervivencia de las bacterias al interior de la planta.

En base a lo anterior, en este proyecto se busca generar una herramienta que posibilite la visualización de bacterias endófitas en el interior de los tejidos vegetales, la cual consistirá en el marcaje con proteínas autofluorescentes. Esta herramienta facilitará el estudio *in vivo* de las bacterias y comunidades endófitas en futuros estudios.

3. Marco teórico y estado del arte

3.1. ¿Cómo estudiar las bacterias endófitas?

Como ya se mencionó anteriormente, se ha encontrado que las bacterias endófitas tienen diversos efectos beneficiosos en la planta, como por ejemplo la promoción del crecimiento y la resistencia contra patógenos, los cuales producen un aumento en el rendimiento de los cultivos (Elbeltagy, et al., 2000). Sin embargo el estudio de las bacterias endófitas no es simple dado que las comunidades de endófitos están conformadas por diferentes bacterias y muchas de éstas tienen efectos similares sobre las plantas, lo cual dificulta el estudio de un endófito en particular y los posibles efectos que éste ejerce sobre el hospedero. Otro problema que surge en el estudio de las bacterias endófitas es que para que una bacteria tenga un efecto sobre la planta, el endófito debe ser capaz de colonizarla y experimentalmente es necesario hacer seguimiento del proceso de colonización, establecer en qué tejidos se da y su abundancia. En base a estos problemas surge la necesidad de una herramienta que permita la visualización de las bacterias endófitas para poder estudiarlas más ampliamente.

Existen diferentes formas para identificar la presencia de una bacteria endófitas en un tejido vegetal, como el cultivo en medios, la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), la electroforesis en gel de gradiente de temperatura temporal (TTGE), PCR-RFLPs y PCR cuantitativa (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). Aunque estas técnicas son útiles para determinar la presencia o ausencia de bacterias en la muestra o en algún tejido específico, pueden presentar varias limitaciones. Primero que todo, si se desea determinar la localización específica de ciertas bacterias por tejido, es necesario realizar el tratamiento a cada uno de los tejidos por aparte, lo cual representa un trabajo exhaustivo. Además estas técnicas identifican el ADN de bacterias independientemente si están vivas o muertas, por lo que no dan información real sobre la viabilidad de los endófitos dentro de la planta (Nocker & Camper, 2006). Estas técnicas no son fácilmente cuantificables (excepto la PCR cuantitativa) y su resolución no es tan buena, puesto que se presenta un efecto de dilución donde las bacterias de mayor abundancia enmascaran la presencia de otras que se encuentran en menor medida y hay que tener en cuenta que no necesariamente la abundancia está relacionada con la importancia, dado que pueden existir bacterias que se hallan con menor frecuencia pero con funciones claves. Las técnicas anteriores son útiles para estudios de diversidad de las comunidades endófitas, pero requieren de gran conocimiento de las bacterias presentes de modo que se pueda usar un sitio en el genoma de todas las bacterias que permita distinguir entre ellas a partir de los resultados obtenidos (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). Existen otro tipo de metodologías que efectivamente permiten la

visualización de bacterias endófitas *in vivo*, de las cuales dos son las más prominentes: el uso de marcadores metabólicos, como LacZ, XylE o GusA; y el uso de proteínas marcadoras autofluorescentes (AFPs, del inglés Auto-Fluorescent Proteins) que emiten luz bajo condiciones particulares, como es el caso de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). Entre estos dos últimos acercamientos, el uso de AFPs presenta una mejor opción para el estudio de bacterias endófitas, puesto que permite la detección de bacterias *in situ* y solo requiere la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, mientras que las técnicas de marcadores metabólicos requieren un periodo de incubación de la muestra y dependen de que el sustrato que utiliza la enzima seleccionada esté disponible en suficientes cantidades para su detección (Koch, Jensen, & Nybroe, 2001).

3.2. Expresión de AFPs en bacterias endófitas.

La primera AFP fue descubierta en la medusa *Aequorea victoria*, y dada su fluorescencia verde fue denominada GFP (Green Fluorescent Protein) (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). Existe expresión de AFPs en distintos organismos en la naturaleza, por ejemplo en los corales *Discosoma striata* y *Fungia concinna* (Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005). Sin embargo, no se ha encontrado expresión nativa de AFPs en bacterias endófitas, por lo que si se desea expresar una de estas proteínas en endófitos se hace necesaria su transformación con un gen que codifique para una AFP. Dicha transformación puede llevarse a cabo mediante dos metodologías: inserción de plásmido o inserción cromosómica (Koch, Jensen, & Nybroe, 2001). Entre estos dos acercamientos, la inserción de plásmido es un método ampliamente utilizado y experimentalmente más sencillo en comparación con la inserción cromosómica. Existen escasos reportes sobre el riesgo de que, para algunas bacterias, la inserción de algunos plásmidos cause una carga metabólica que pueda disminuir la eficiencia de diferentes procesos, por ejemplo la colonización de la planta y el crecimiento (Rodríguez & Fraga, 1999). Se ha encontrado en estos estudios que la depresión metabólica no se debe a la expresión de la proteína *per se* sino a la carga que ejerce sobre la bacteria portar el plásmido (Clark, et al., 2009). Por otro lado, la inserción cromosómica es una estrategia prometedora, puesto que al insertar el gen de interés directamente en el genoma de la bacteria evita el riesgo de depresión metabólica causada por el plásmido, además que permite una mayor estabilidad del carácter y evita los riesgos de transferencia horizontal (Rodríguez & Fraga, 1999). Sin embargo, esta estrategia también presenta ciertos problemas, por ejemplo, se puede dar una menor expresión que la obtenida con un plásmido a causa de un menor número de copias insertadas o la falta de activación por parte del promotor. Existen dos formas de realizar la inserción cromosómica, la primera es una inserción al azar, la

cual puede llevar a inconvenientes como la inactivación de genes y efectos sobre la expresión, que pueden causar que la bacteria no sea viable o no cumpla con todas las funciones requeridas para el correcto estudio de los endófitos (Koch, Jensen, & Nybroe, 2001). El segundo método para llevar a cabo la inserción cromosómica es un tipo de inserción dirigida, puesto que usa secuencias específicas del genoma en las cuales se va a dar la inserción; este método presenta la limitante de requerir la identificación de una secuencia que permita la inserción específica en un sitio neutral del genoma (de modo que no tenga ningún efecto en la expresión génica), esta secuencia puede no estar conservada en todas las bacterias o si lo está puede que no en todas corresponda a un sitio neutral, por lo que no es un acercamiento que pueda ser usado de forma indiscriminada en todas las bacterias endófitas a estudiar, en especial cuando se trata de especies nuevas cuyos genomas no han sido secuenciados (Koch, Jensen, & Nybroe, 2001). Debido a que la inserción cromosómica, dependiendo de cómo sea llevada a cabo, presenta problemas en cuanto a la expresión génica o requiere la identificación de una secuencia en un sitio neutral, la cual puede no servir para diferentes bacterias, se decidió para este proyecto marcar las bacterias endófitas mediante inserción de plásmidos.

Es importante mencionar que existen diversos estudios donde se ha recurrido al uso de plásmidos para el marcaje de bacterias endófitas: *Burkholderia* sp. con GFP en uva (Compant, et al., 2005), *Bacillus megaterium* C4 con GFP en maíz (Liu, Zhao, & Chen, 2006), *Streptomyces* sp. con EGFP en trigo (Coombs & Franco, 2003) y *Herbaspirillum* sp. con GFP en arroz (Elbeltagy, et al., 2001), entre otras. Dichos estudios han hecho énfasis en la dinámica de colonización de las bacterias, es decir, cuál es la ruta de acceso que usan para colonizar la planta; pero también han permitido identificar una colonización dependiente del genotipo de la planta para algunas bacterias y la localización tisular de éstas. Basados en los resultados establecidos por estos estudios y al hacer uso de la inserción de plásmidos se logró obtener una herramienta para visualizar la colonización de plantas por parte de bacterias endófitas para estudios futuros.

3.3. Proteínas Autofluorescentes

Por proteína autofluorescente se hace referencia a una proteína que emite fluorescencia al ser estimulada por luz de una longitud de onda (λ) específica y sin necesidad de un sustrato, cofactor u otra proteína. Dicha fluorescencia se da por la existencia de un fluoróforo dentro de la proteína, el cual se encarga de absorber fotones de cierta λ , excitarse, y reemitir estos fotones con una λ mayor (dada la pérdida de energía), volviendo a su estado basal y generando la fluorescencia en el proceso (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). Aunque en la naturaleza

existen muchos tipos diferentes de AFPs, para el estudio en laboratorio se utilizan principalmente dos proteínas, GFP y DsRed, y las diversas variantes de éstas obtenidas por mutagénesis que varían en sus características fluorescentes ($\lambda_{\text{excitación}}$, $\lambda_{\text{emisión}}$, fotoestabilidad, luminosidad, etc.). Como ya se mencionó, GFP ($\lambda_{\text{excitación}}=470\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=509\text{nm}$) fue inicialmente descubierta en la medusa *Aequorea victoria*, mientras que DsRed ($\lambda_{\text{excitación}}=560\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=580\text{nm}$) fue descubierta en el coral *Discosoma striata* y presentó una menor dependencia de pH y una mayor fotoestabilidad, pero requería de un mayor tiempo de maduración y un alto peso molecular por ser un tetrámero (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). El tener dos AFPs con longitudes de onda de emisión y excitación tan diferentes fomentó diversos estudios con marcaje múltiple. Para resolver los problemas que cada una de estas proteínas presentaba y para ampliar las posibilidades de uso, se crearon a lo largo de los años diferentes variantes de estas dos proteínas, y hoy en día contamos con una gran gamma de proteínas autofluorescentes disponibles. En el Anexo 1 se muestra las AFPs de mayor importancia en la actualidad.

Al momento de elegir las AFPs a usar, lo primero que se debe tener en cuenta es la necesidad de poder distinguir entre ellas, para lo cual es necesario que sus $\lambda_{\text{emisión}}$ sean distantes; para efectos de este proyecto se eligieron AFPs de la clase roja, naranja y verde. Segundo, se debe tener en cuenta el peso molecular de la AFP y la estructura cuaternaria de la proteína, favoreciendo en la elección a los monómeros o dímeros débiles, puesto que estructuras más complejas de alto peso molecular requieren una mayor cantidad de proteína para ser fluorescentes y pueden llegar a formar agregados que pueden ser tóxicos para las bacterias (Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005). Otros factores a tener en cuenta son la fotoestabilidad y la luminosidad, atribuyéndosele mayor importancia a la primera. La fotoestabilidad hace referencia al tiempo que le toma a una AFP perder su capacidad de fluorescencia cuando es excitada, mientras que la luminosidad es una característica compuesta por varios factores (tiempo de maduración, fotoestabilidad, coeficiente de extinción, rendimiento cuántico, entre otros) que proporciona una idea de que tan detectable es la AFP (Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005). En base a esto se eligieron las variantes mCherry y mOrange2 de DsRed y la variante EmGFP (Emerald) de GFP (Anexo 1).

3.4. Ventajas del uso de AFPs en estudios de bacterias endófitas

El uso de proteínas autofluorescentes para el estudio de bacterias endófitas brinda un gran abanico de oportunidades. Primero que todo, como se mencionó anteriormente, este tipo de marcajes facilitará el estudio del proceso y dinámica de colonización en la planta y permitirá establecer si una planta es efectivamente

colonizada por ciertas bacterias, la cual es la primera condición para que la bacteria pueda ejercer un efecto sobre la planta. Estos estudios podrían contribuir a dilucidar los diferentes mecanismos de señalización existentes entre planta y bacteria que desencadenan el proceso de colonización, como es el caso de la fitohormona ácido indol-acético (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007). También se ha reportado que existe un efecto del genotipo del hospedero sobre la abundancia de bacterias y estructura de las comunidades endófitas, es decir, se establecen relaciones genotipo específicas a través de las cuales el hospedero favorece o inhibe la colonización por bacterias específicas (Adams, 2002).

Desde la perspectiva de aplicaciones de biotecnología agrícola, estos estudios adquieren gran importancia puesto que apoyarían el desarrollo de estrategias alternativas para mejorar la productividad de los cultivos y reducir el uso de fertilizantes químicos a través de estrategias de biofertilización. Dicha biofertilización se llevará a cabo mediante el desarrollo de inóculos de bacterias endófitas (ya sea una sola o un consorcio de éstas) que produzcan un mayor rendimiento en los cultivos. Estos inóculos podrán ser producidos puesto que el marcaje con AFPs permitiría, durante la fase de formulación y caracterización de los inóculos en el laboratorio, el seguimiento de las bacterias para establecer la ocurrencia de colonización de los tejidos de la planta.

La colonización, además de ser genotipo específica, puede ser tejido específica, puesto que se han reportado diferencias en la composición de comunidades de endófitos en los distintos tejidos a nivel de una misma planta (hojas, tallos, raíces, semillas) (Sessitsch, et. al, 2002). El uso de AFPs permitirá el estudio de dicha especificidad de localización de las bacterias y cómo esta puede verse afectada por factores de estrés en la planta, por ejemplo, se ha encontrado que los endófitos utilizan el xilema como ruta para migrar desde los tejidos de la raíz hacia la parte aérea de la planta (Compant, et al., 2005), de modo que nace la pregunta de si factores de estrés que reducen el transporte en el xilema, por ejemplo la sequía, causan cambios o crean impedimentos para la distribución de estas bacterias. El marcaje con AFPs también aporta al estudio de las relaciones ecológicas en las comunidades de endófitos, puesto que permite visualizar con mayor facilidad los cambios en densidades de diferentes bacterias según la presencia o ausencia de otras, lo que representa un acercamiento a identificar el tipo de relaciones (competencia, mutualismo, sinergismo, entre otras) que existen en estas comunidades dentro de la planta.

Es muy importante tener en cuenta que aunque en este proyecto se utilice arroz y bacterias endófitas aisladas de éste como modelo de estudio, el marcaje por fluorescencia es esencialmente una herramienta que puede ser empleada independientemente del cultivo o especie que se quiera estudiar y brindará las mismas posibilidades de investigación.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Transformar bacterias endófitas aisladas de especies silvestres de arroz con secuencias codificantes de proteínas fluorescentes.

4.2. Objetivos Específicos

➤ Selección de vectores a partir de la literatura para la transformación de bacterias endófitas con secuencias codificantes de proteínas fluorescentes.

Indicadores

- Listado de posibles vectores a usar.
- Selección de vectores a usar.

➤ Usar la bacteria *Escherichia coli* cepa DH5α como organismo modelo para el desarrollo de un protocolo de expresión de proteínas autofluorescentes que permita su visualización en el microscopio de fluorescencia.

Indicadores

- Bacterias de *Escherichia coli* cepa DH5α transformadas con los plásmidos codificantes de proteínas autofluorescentes.
- Visualización de la expresión de proteínas fluorescentes en las bacterias transformadas bajo el microscopio de fluorescencia

➤ Transformar las bacterias endófitas de interés empleando los vectores seleccionados.

Indicadores

- Crecimiento de bacterias transformantes en medio selectivo y detección mediante PCR de la incorporación del vector que porta la secuencia codificante para la proteína fluorescente.
- Visualización de la expresión de proteínas fluorescentes en las bacterias transformadas bajo el microscopio de fluorescencia.

5. Materiales y Metodología

5.1. Bacterias y cultivo

Para el proyecto se utilizaron tres bacterias distintas: *E. coli* DH5 α para la propagación de los vectores y como cepa control de transformación, y dos cepas de endófitos aislados en el Laboratorio de Fisiología vegetal de la Universidad Icesi: *Pantoea* sp., aislada de semillas de *Oryza glumaepatula*, y *Rhizobium* sp., encontrada tanto en semillas de *Oryza glumaepatula* y de *Oryza sativa* (Ghneim-Herrera et al., sin publicar). *Rhizobium* sp. es de interés pues representa putativamente una especie nueva; su porcentaje de identidad en la secuencia del 16sRNA es menor al 95% con otras especies de su mismo género. (Ghneim-Herrera et al., sin publicar). Además, se ha demostrado la presencia del complejo nitrogenasa (*nifH*), necesario para la fijación biológica de nitrógeno, y actualmente se evalúa su actividad de fijación a través de bioensayos y análisis de reducción de acetileno (Ghneim-Herrera et al., sin publicar). En cuanto a *Pantoea* sp. ya se ha demostrado en el mismo laboratorio su capacidad de producción de la auxina AIA, mediante bioensayos y actualmente se trabaja en la cuantificación de los compuestos mediante espectrometría de masas (Ghneim-Herrera et al., sin publicar). Dada las capacidades de producción de AIA y de fijación de nitrógeno existe un gran interés en caracterizar la interacción planta-bacteria y los factores que controlarían su transferencia a cultivares élites de arroz.

Las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo, para el caso de *E. coli* y *Pantoea* sp., o caldo Luria Broth (LB), para el caso de *Rhizobium* sp., a partir de una colonia de la bacteria. Los caldos se incubaron a 180 rpm bajo condiciones de pH (6.5-6.8) y temperatura óptima para cada bacteria: *E. coli* (37°C), *Rhizobium* sp. y *Pantoea* sp. (28 - 30°C).

5.2. Vectores

Para llevar a cabo la selección de vectores se realizó una revisión de literatura sobre los plásmidos que contenían las AFPs de interés mOrange2, mCherry y EmGFP y sus usos (Anexo 2). Se eligió el vector más simple que garantizara la expresión de cada una de las AFPs y el screening de bacterias transformantes. Se eligieron los plásmidos pmCherry y pmOrange2 (CloneTech), de aproximadamente 3.3kb cada uno, que portan el promotor *lac*, resistencia a ampicilina y la expresión de la proteína de interés se da mediante la inducción por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). En cuanto a EmGFP, se escogió el

vector pRSET-EmGFP (Invitrogen) de 3.6kb que presenta el promotor T7 y resistencia a ampicilina y expresa la proteína EmGFP por inducción con IPTG. El Anexo 5 muestra los mapas de los diferentes vectores a usar.

5.3. Propagación en *E. coli*

Para la propagación de los vectores se utilizaron células comerciales de *Escherichia coli* DH5 α competentes (Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells, Invitrogen), las cuales fueron transformadas por choque térmico siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez transformadas las bacterias se cultivaron en placas de agar LB con 50 μ g/ml de ampicilina para seleccionar las bacterias transformantes.

Para comprobar la transformación se realizó PCR de colonia. Inicialmente se trabajó con las siguientes condiciones para la PCR: (1) desnaturalización inicial a 96°C por 5 minutos, (2) desnaturalización a 94°C por 30 segundos, (3) alineamiento a 55°C por 30 segundos, (4) elongación a 72°C por 45 segundos, y (5) elongación final a 72°C por 5 minutos; los pasos 2 a 4 se repiten 35 veces (Anexo 3). Las condiciones de PCR se optimizaron para reducir la amplificación inespecífica (Tabla 4). Para este proyecto, fueron diseñados primers para amplificar cada uno de los genes que codifican para las AFPs a usar utilizando la herramienta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). El Anexo 5 muestra la posición de alineamiento de los primers a usar para cada vector. Para mCherry se diseñaron los primers mCherry2013F (5'-AAGGGCGAGGAGGATAACAT-3') y mCherry2013R (5'-ACATGAACTGAGGGGACAGG-3') y se usó el primer mCherry5514R (5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGC-3') reportado en la literatura (Lin, et al., 2011); para mOrange2 se diseñaron los primers mOrange22013F (5'-CGTGATGCAGAAGAAGACCA-3') y mOrange22013R (5'-GCTTCTTGGCCTTGTAGGTG-3'); y para EmGFP se diseñaron los primers EmGFP2013F (5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3') y EmGFP2013R (5'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3') (Anexo 4). Una vez se comprobó la transformación de *E. coli* con los distintos plásmidos, se realizó un stock en glicerol con las colonias transformantes.

El tiempo medio de maduración a 37°C de mOrange2 es de 4.5h (Shaner, et al., 2008), de mCherry es de 15min y para EmGFP no ha sido determinado (Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005). Sin embargo, se carece de datos sobre la longevidad/estabilidad de estas proteínas (periodo en el cual pueden ser detectadas). Dado lo anterior, se llevó a cabo la inducción de la expresión de las diferentes AFPs en las bacterias de *E. coli* transformadas usando IPTG para estimar el tiempo después del cual se tiene una producción detectable de las

AFPs y el tiempo hasta el cual se puede visualizar la fluorescencia producida, con el fin de estimar la ventana de tiempo en la que se puede llevar a cabo la visualización de estas proteínas en ensayos *in vivo*.

5.4. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de los plásmidos a partir de las colonias de *E. coli* transformadas se llevó a cabo mediante el protocolo de lisis alcalina con SDS (Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012). El ADN extraído fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

5.5. Transformación de los endófitos con AFPs por electroporación

La transformación de las bacterias endófitas se llevó a cabo siguiendo el protocolo utilizado por Elbeltagy et al. (2001). Las bacterias fueron enfriadas en hielo y luego se hicieron competentes mediante lavados con agua destilada helada y una solución de agua y glicerol al 10%. Las bacterias competentes fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C. Para la transformación se tomó una alícuota de células competentes, se mezclaron con el plásmido y se incubarán por 15 minutos en hielo. Seguido, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación y se llevó a cabo la transformación. Las bacterias fueron inmediatamente diluidas en 1ml de medio líquido, transferidas a tubos estériles y cultivadas a 30°C para su recuperación. Después de este lapso, las bacterias transformadas se cultivaron en placas LB con 50µg/ml de ampicilina para seleccionar las bacterias transformantes.

La transformación fue llevada a cabo con diferentes cepas: *E. coli* DH5α como control del funcionamiento del protocolo empleado y con las bacterias de interés *Rhizobium* sp. y *Pantoea* sp.

Para comprobar la transformación se realizó un PCR de colonia utilizando las condiciones de PCR previamente optimizadas. Se realizó un stock en 20% glicerol a -80°C (Van Overbeek & Van Elsas, 2008) con las colonias con transformación comprobada.

5.6. Transformación de *Rhizobium* sp. por choque térmico

Para la transformación de *Rhizobium* sp. por choque térmico se utilizó el protocolo utilizado por Vincze & Bowra (2006). Para obtener células competentes, se inoculó 50ml de medio LB líquido con dos mililitros de un cultivo inicial de *Rhizobium* sp. en fase estacionaria y se incubó durante 6 horas a 30°C a 180rpm. Al término de este tiempo, se colectaron las células por centrifugación a 12000g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en 2ml de 20mM CaCl₂. La suspensión de bacterias fue distribuida en alícuotas de 100µl en tubos eppendorf de 1,5ml, que fueron enfriados en nitrógeno líquido antes de ser guardados a -80°C. Para la transformación, se adicionó 200ng del plásmido a la alícuota de 100µl de células competentes y se incubó en baño maría a 37°C. Después de 5 minutos de incubación, se agregó medio SOC al tubo eppendorf donde se encontraban las bacterias y se incubó a 30°C durante 2 horas. Posteriormente, las bacterias fueron cultivadas en agar LB con ampicilina para seleccionar los transformantes.

5.7. Visualización de la fluorescencia

Para la visualización de fluorescencia de las bacterias transformadas se llevó a cabo la inducción de la expresión de las AFPs usando IPTG. La visualización se realizó utilizando el microscopio Nikon Eclipse 55i trinocular con contraste de fase de fluorescencia y bajo el filtro Y-2E (Nikon), el cual excita la muestra a un intervalo de longitudes de onda entre los 540 a 580nm y captura la emisión a longitudes de onda entre 600 a 660nm (Nikon, s.f).

5.8. Matriz de marco lógico

Objetivo general: Transformar bacterias endófitas aisladas de especies silvestres de arroz con secuencias codificantes de proteínas fluorescentes.			
Objetivos específicos	Actividad	Indicador	Supuestos
Selección de vectores a partir de la literatura para la transformación de bacterias endófitas con secuencias codificantes de proteínas fluorescentes.	Revisión de la literatura y selección de los vectores a evaluar.	Listado de vectores posibles.	Acceso a la bibliografía necesaria.
		Selección de vectores a usar.	
Usar la bacteria <i>Escherichia coli</i> cepa DH5α como organismo modelo para el desarrollo de un protocolo de expresión de proteínas autofluorescentes que permita su visualización en el microscopio de fluorescencia.	Transformación de las bacterias con vectores portadores de proteínas autofluorescentes	Amplificación del gen mediante PCR.	El vector se expresa en las bacterias transformadas. Disponibilidad de equipamiento y reactivos para transformación.
	Visualización bajo el microscopio de fluorescencia.	Expresión de fluorescencia.	Kit de PCR, termociclador. Filtros, microscopio de fluorescencia.
Transformar las bacterias endófitas de interés empleando los vectores seleccionados.	Cultivo de bacterias endófitas en medios de cultivo óptimos para su crecimiento.	Cantidades adecuadas de las bacterias en cultivo.	Cabina de bioseguridad, otros equipos y reactivos disponibles. Bacterias previamente aisladas y mantenidas en condiciones adecuadas para posterior cultivo.
	Transformación de las bacterias con vectores portadores de proteínas autofluorescentes.	Amplificación del gen mediante PCR.	El vector se expresa en las bacterias transformadas. Disponibilidad de equipamiento y reactivos para transformación.
	Visualización bajo el microscopio de fluorescencia.	Expresión de fluorescencia.	Kit de PCR, termociclador. Filtros, microscopio de fluorescencia.

6. Resultados

6.1. Transformación de *Escherichia coli* DH5 α con pmCherry y pmOrange2

Células competentes de *Escherichia coli* DH5 α fueron seleccionadas para la adaptación de los protocolos de transformación con AFP e inducción de la fluorescencia dado que estas han sido utilizadas en numerosos trabajos. Además de su utilidad para el montaje de los métodos de transformación a usar, estas cepas sirven también como control en los eventos de transformación de las bacterias endófitas.

La transformación se llevó a cabo por choque térmico usando 50 μ l de células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells, Invitrogen), a las cuales se les adicionó 3 μ l de los plásmidos pmCherry o pmOrange2 a una concentración de 5ng/ μ l. Después del choque térmico, se adicionó 950 μ l de medio SOC y se incubaron las bacterias a 37°C por 1 hora a 225rpm.

Para la selección de las bacterias transformantes se sembraron dos volúmenes distintos, 80 μ l y 180 μ l, del cultivo en placas de agar LB con ampicilina, a una concentración de 50 μ g/ml, a 37°C durante 24 horas aproximadamente. Después de la incubación, las colonias presentaron una distribución de una colonia principal de color (morado para las bacterias transformadas con pmCherry y naranja para las transformadas con pmOrange2) rodeada de colonias blancas de menor tamaño (Figura 1). Las colonias blancas fueron consideradas colonias satélites que no incorporaron el plásmido, y por ende no portan resistencia a ampicilina ni el gen de interés, más logran sobrevivir por su cercanía a bacterias transformantes que han degradado el antibiótico alrededor de ellas, creando una zona libre de antibiótico (Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012). Por esta razón, se continuó con las colonias de color morado y naranja para comprobar su transformación mediante PCR.

La transformación con el vector pRSET-EmGFP no pudo ser llevada a cabo a causa de discontinuación del producto por parte de la casa comercial.

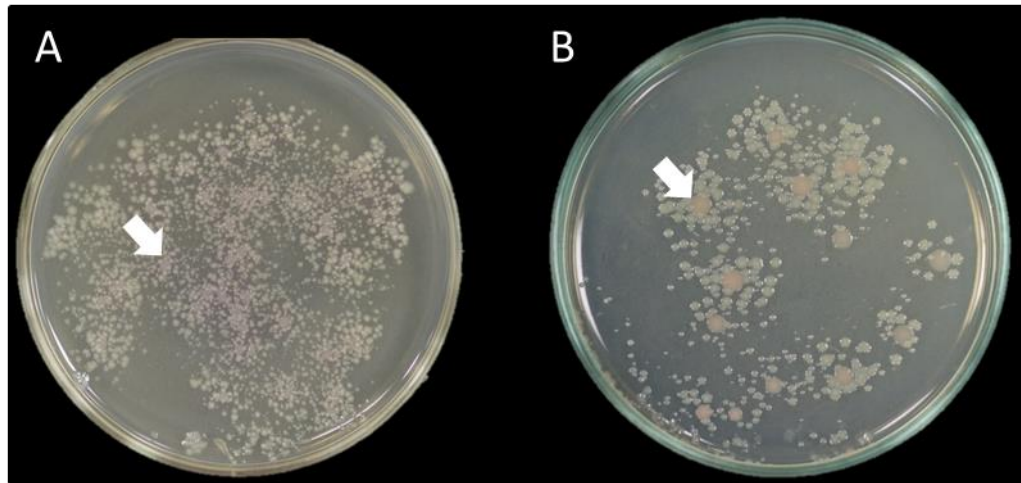


Figura 1. Células de *Escherichia coli* DH5 α transformadas.

Crecimiento de (A) bacterias de *E. coli* transformadas con pmCherry y (B) bacterias de *E. coli* transformadas con pmOrange2 en agar LB con 50 μ g/ml de ampicilina. En cada caso se señalan las colonias transformadas efectivamente e identificadas por su coloración característica morada o naranja (flechas). Puede observarse la presencia de colonias satélites no transformadas alrededor de las colonias transformadas.

6.2. Amplificación mediante PCR de los genes codificantes de pmCherry y pmOrange2

Los genes codificantes de las proteínas mCherry y mOrange2 se encuentran insertos en los plásmidos pmCherry y pmOrange2, y poseen tamaños moleculares de 711 bp cada uno. Mientras que el gen de la proteína EmGFP se encuentra insertado en el plásmido pRSET-EmGFP y tiene un tamaño de 720 bp. En este trabajo, se diseñaron primers específicos para amplificar fragmentos de dichos genes, dado que se encontraron escasos reportes en la literatura y estos no amplificaron *in silico*.

El diseño de primers específicos se realizó con ayuda del sitio web Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). En el caso de mCherry, los primers mCherry2013F y mCherry2013R amplifican una región de 205 bp comprendida entre las posiciones 10 y 214 del gen; mientras que los primers mCherry2013F y mCherry5514R amplifican un producto de 699 bp ubicado entre las posiciones 10 y 708. Para mOrange2, los primers mOrange22013F y mOrange22013R amplifican un fragmento de 155 bp entre las regiones 417 y 571 del gen. Por último, los primers EmGFP2013F y EmGFP2013R amplifican un segmento de 187 bp ubicado entre las posiciones 273 y 459 del gen que codifica para EmGFP (Anexo 3).

La especificidad de los primers se evaluó *in silico* empleando la herramienta PrimerBlast del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se llevó a cabo un análisis de las secuencias depositadas para la especie *E. coli*, el género

Pantoea y el género *Rhizobium* para identificar los posibles productos de amplificaciones inespecíficas (Tablas 1, 2 y 3, respectivamente).

Tabla 1. Posibles productos de amplificaciones inespecíficas en la especie *E. coli*.

Primers	Organismo	Gen amplificado	Tamaño del producto (bp)
mOrange22013F mOrange22013R	<i>E. coli</i> cepa ST540	Proteína hipotética de membrana	2554
mCherry2013F mCherry2013R	<i>E. coli</i> ETEC 1392/75 <i>E. coli</i> cepa ST2747	Plásmido p1018 Proteína hipotética	3203 3327
mCherry2013F mCherry5514R	<i>E. coli</i> cepa ST2747	Proteína hipotética	3327
EmGFP2013F EmGFP2013R	<i>E. coli</i> LF82 <i>E. coli</i> O83:H1 cepa NRG 857C	Proteína reguladora del fago N Proteína represora CII	2723 2928

Tabla 2. Posibles productos de amplificaciones inespecíficas en el género *Pantoea*.

Primers	Organismo	Gen amplificado	Tamaño del producto (bp)
mOrange22013F mOrange22013R	<i>Pantoea</i> sp. At-9b	Subunidad beta de exodesoxirribonucleasa V	1655
mCherry2013F mCherry2013R	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 5342 <i>Pantoea ananatis</i> PA13	Coproporfirógeno III oxidasa independiente de oxígeno Coproporfirógeno III oxidasa independiente de oxígeno	2302 2304
mCherry2013F mCherry5514R	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 5342	Adenilil transferasa glutamato-amoniaco ligasa	2848
EmGFP2013F EmGFP2013R	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 5342 <i>Pantoea ananatis</i> PA13	Transportador ABC de azúcares Xilulosa quinasa	932 4057

Tabla 3. Posibles productos de amplificaciones inespecíficas en el género *Rhizobium*.

Primers	Organismo	Gen amplificado	Tamaño del producto (bp)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Plásmido pRL9	906
	<i>Rhizobium</i> sp. cepa NT-26	Factor de especificidad topológico de división celular	1199
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1689	Regulador transcripcional de la familia AraC	1932
mOrange22013F mOrange22013R	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	Hidrolasa de la superfamilia HAD	1999
	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	Deshalogenasa 2-haloácido putativa	2001
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304	Hidrolasa de la superfamilia HAD	2010
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Descarboxilasa de uroporfirinógeno putativa	2067
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Descarboxilasa de uroporfirinógeno putativa	2961

	<i>Rhizobium</i> sp. cepa NT-26	Acetil-coenzima A sintetasa	3585
	<i>Rhizobium etli</i> bv. mimosae cepa Mim1	Transportador ABC de azúcares	3985
	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	Transportador ABC de azúcares putativo	3985
mCherry2013F mCherry2013R	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	Plásmido pA	3260
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii CB782	Plásmido	3636
mCherry2013F mCherry5514R	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1689	Plásmido	330
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Plásmido pRL12	330
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	Plásmido pR132501	331
	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	Transportador ABC putativo	609*
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii CB782	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	862
	<i>Rhizobium etli</i> bv. mimosae cepa Mim1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	862
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	863
	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	864
	<i>Rhizobium</i> sp. LPU83	Proteína putativa conservada	888
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304	Plásmido pRLG201	1913
	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	Transportador putativo para la biosíntesis de succinoglicano	2056
	<i>Rhizobium</i> sp. cepa NT-26	Proteína putativa conservada	2252
	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	Plásmido pA	3260
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii CB782	Plásmido	3636
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Descarboxilasa de uroporfirinógeno putativa	3668
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii CB782	Plásmido	4392
	EmGFP2013F EmGFP2013R	<i>Rhizobium etli</i> bv. mimosae cepa Mim1	Proteína hipotética
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42		Proteína oxidasa putativa	329
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1689		Permeasa de C4-dicarboxilato	737
<i>Rhizobium etli</i> bv. mimosae cepa IE4771		Manosa-1-fosfato guanililtransferasa	892
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899		Plásmido pRtrCIAT899c	1888
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii CB782		Plásmido	1979

*Posible falso positivo debido al tamaño del producto amplificado para este par de primers.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió transformar *Rhizobium* sp. con pmOrange2 dado que existe una posibilidad de una amplificación inespecífica en

uno de los organismos encontrados (*Rhizobium tropici* CIAT 899, Tabla 3) que presenta un producto con tamaño similar al esperado al usar los primers mCherry2013F y mCherry5514R, de modo que se podría presentar un falso positivo si se transformara esta cepa con pmCherry. Por otro lado, debido a que el ensayo *in silico* para pmCherry no presentó ninguna posible amplificación inespecífica de tamaño similar al esperado para las secuencias del género *Pantoea* (Tabla 2), se decidió transformar *Pantoea* sp. con este plásmido. En cuanto a los resultados obtenidos para *E. coli*, se evidenció que ninguna de las posibles amplificaciones inespecíficas resultan en productos de tamaños similares a los esperados (Tabla 1). Para el caso de los primers diseñados para la amplificación de EmGFP, no se presenta ninguna amplificación inespecífica que pudiera llegar a ser confundida por su tamaño para *E. coli* ni para el género *Pantoea* (Tablas 1 y 2, respectivamente), aunque si se presentó un caso dentro del género *Rhizobium* (*Rhizobium etli* bv. *mimosae* cepa Mim1, Tabla 3). Sin embargo, debido a que el plásmido que contiene esta proteína no fue recibido, no fue usado para la transformación de ninguna bacteria.

Las condiciones óptimas de amplificación se establecieron para cada par de cebadores mediante una PCR en gradiente (12 temperaturas diferentes entre 50,0 y 62,5°C). La temperatura de alineamiento óptima fue de 60,0°C para mOrange22013F y mOrange22013R, y de 61,3°C tanto para mCherry2013F y mCherry2013R como para mCherry2013F y mCherry5514R. La Tabla 4 muestra las condiciones finales para la reacción de PCR obtenidas después de la optimización.

Tabla 4. Condiciones finales de PCR.

Paso	Temperatura (°C)		Tiempo (min)
	mCherry	mOrange2	
1 Desnaturalización inicial	95,0	95,0	05:00
2 Desnaturalización	94,0	94,0	01:00
3 Alineamiento	61,3	60,0	01:00
4 Elongación	72,0	72,0	00:45
35 ciclos de repetición de pasos 2 a 4			
5 Elongación final	72,0	72,0	10:00

Una vez optimizadas las condiciones de PCR se procedió a evaluar la transformación de *Escherichia coli* DH5 α con cada uno de los plásmidos mediante PCR de colonias aisladas, observándose que en ambos casos se presentaron bacterias transformantes. Las colonias de *E. coli* de color morado incorporaron el

plásmido pmCherry y las bacterias de color naranja el plásmido pmOrange2 (Figura 2).

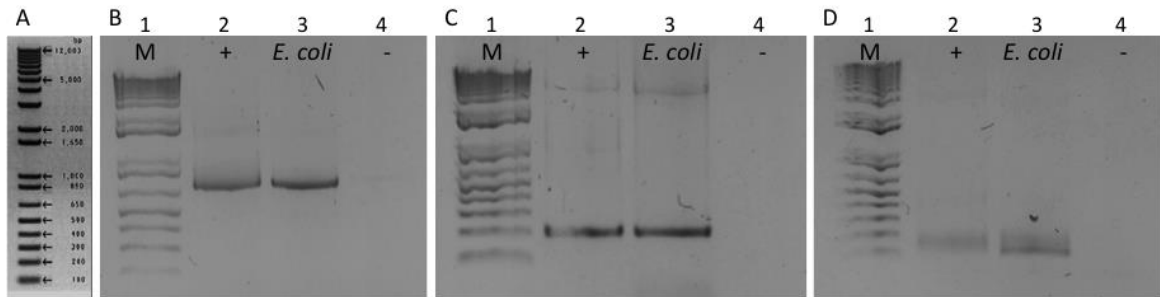


Figura 2. PCR de colonia para *E. coli* transformadas con pmCherry y pmOrange2.

A) Marcador molecular 1Kb Plus (Life Technologies). B) PCR con primers mCherry2013F y mCherry5514R. Tamaño del producto esperado: 699 bp. C) PCR con primers mCherry2013F y mCherry2013R. Tamaño del producto esperado: 205 bp. D) PCR con primers mOrange22013F y mOrange22013R. Tamaño del producto esperado: 155 bp. Para todos los geles, de izquierda a derecha: 1) Marcador molecular 1kb, 2) Control positivo, 3) *E. coli* transformada, 4) Control negativo. Gel de agarosa al 1%.

6.3. Inducción

Para la inducción se tomó una colonia transformada con la AFP respectiva y esta fue cultivada en medio LB líquido en presencia de ampicilina e IPTG. El IPTG es un compuesto que sirve como inductor artificial del operador *lac*, puesto que es capaz de unirse al represor *lac*, que en ausencia de IPTG se encuentra bloqueando dicho operador e impidiendo la transcripción. Cuando el IPTG se une a este represor, el operador queda libre y se desencadena la producción de la AFP contenida en el plásmido (Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012).

Colonias individuales de *E. coli* transformadas con pmCherry y pmOrange2 fueron inoculadas en medio LB líquido suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. El medio de cultivo fue incubado a 37°C bajo agitación constante a 180rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 600nm. La densidad poblacional del cultivo es un factor de gran importancia, pues las bacterias son capaces de producir β-lactamasas, enzimas que inactivan la ampicilina presente en el medio de cultivo. La producción de β-lactamasas es proporcional a la densidad poblacional, por lo que en cultivos muy ricos se promueve la desactivación de la ampicilina y esto a su vez aumenta la probabilidad de la pérdida del plásmido por parte de las bacterias transformadas.

Una vez alcanzada la densidad óptica de 0.6, las células transformadas fueron colectadas mediante centrifugación y lavadas con solución salina con la finalidad

de eliminar el medio de cultivo y las β -lactamasas producidas. Las bacterias fueron resuspendidas a una densidad óptica de 0,132 a 600nm en medio LB con 50 μ g/ml de ampicilina e IPTG a una concentración de 1mM. Debido a que la temperatura juega un papel importante en la velocidad con que se producen las proteínas (Green & Sambrook, 2012), la inducción se realizó a 30°C, puesto que esta es la temperatura a la que se cultivan las bacterias endófitas objetivo de la investigación y de esta forma se tendría un estimado más exacto del tiempo necesario para la expresión de las AFPs en dichas bacterias. La inducción se llevó a cabo durante 15 horas a 180rpm en oscuridad. Finalizado este periodo, se prosiguió con la observación bajo el microscopio de fluorescencia en donde se logró ver la expresión de la AFP por parte de las cepas de *E. coli* transformantes que fueron inducidas con 1mM de IPTG (Figura 3), mientras que las cepas de *E. coli* no transformadas no presentaron fluorescencia y las cepas transformadas pero que no fueron inducidas con IPTG presentaron fluorescencia con rápida extinción (menos de 5 segundos de fluorescencia).

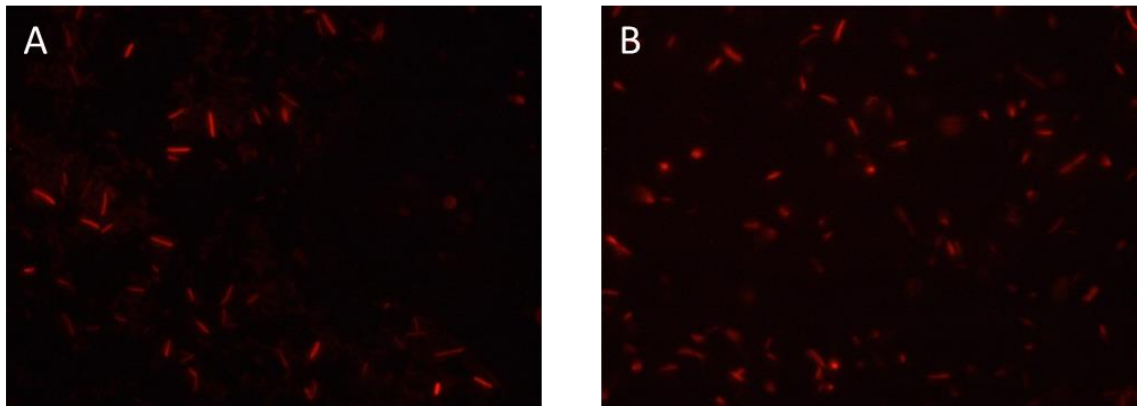


Figura 3. Inducción de la expresión en *E. coli*.

Expresión de las proteínas (A) mCherry y (B) mOrange2 después de la inducción con 1mM IPTG por parte de bacterias de *Escherichia coli* transformantes.

6.4. Visualización

Se llevó a cabo un seguimiento a través del tiempo de la fluorescencia producida por las bacterias de *E. coli* transformadas con pmCherry y pmOrange2 para tener un estimado del tiempo necesario para la inducción de su expresión y tener un indicio de si la duración de dicha expresión es suficiente para llevar a cabo ensayos de colonización de plantas por parte de las bacterias endófitas.

En cuanto a la expresión de mCherry, se encontró que un tiempo de inducción de 15 horas fue suficiente para evidenciar la expresión de esta AFP (Figura 4). En cuanto a la expresión de mOrange2, no se evidenció una fluorescencia perceptible hasta después de 39 horas, sin embargo dicha fluorescencia solo se presentó en cantidades considerables después de 62 horas de inducción (Figura 5). La fluorescencia de las dos proteínas pudo ser visualizada incluso pasados 7 días después de la inducción.

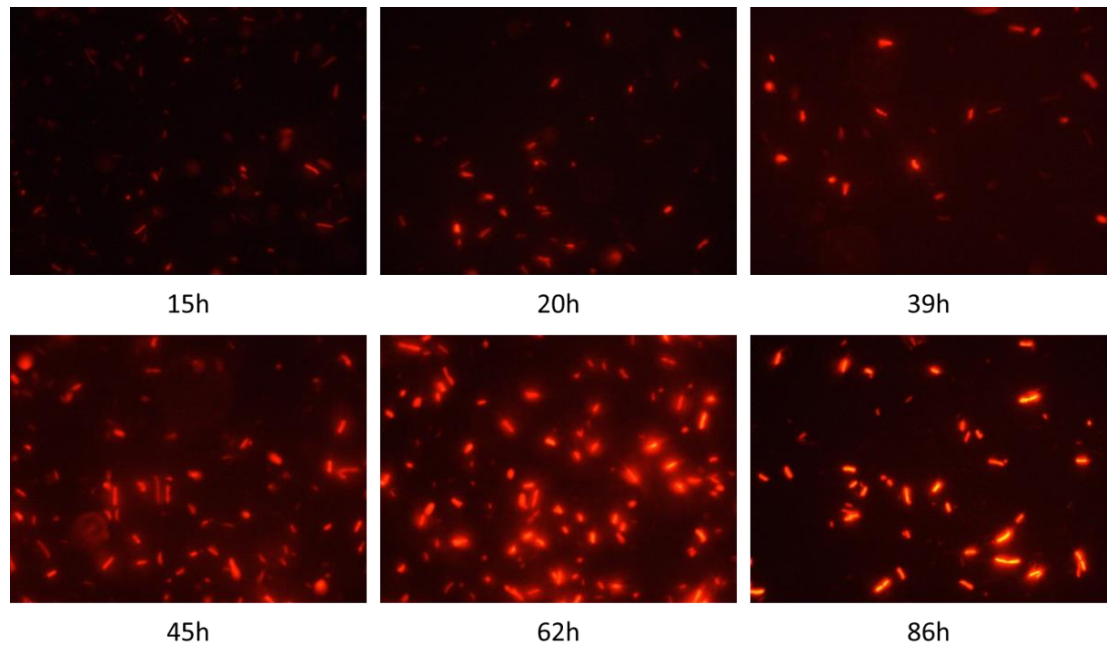


Figura 4. Seguimiento de la fluorescencia de mCherry en *E. coli* transformadas.

La inducción de mCherry presentó una fuerte fluorescencia que fue perceptible después de un periodo de inducción con 1mM de IPTG de 15 horas y hasta después de 86 horas.

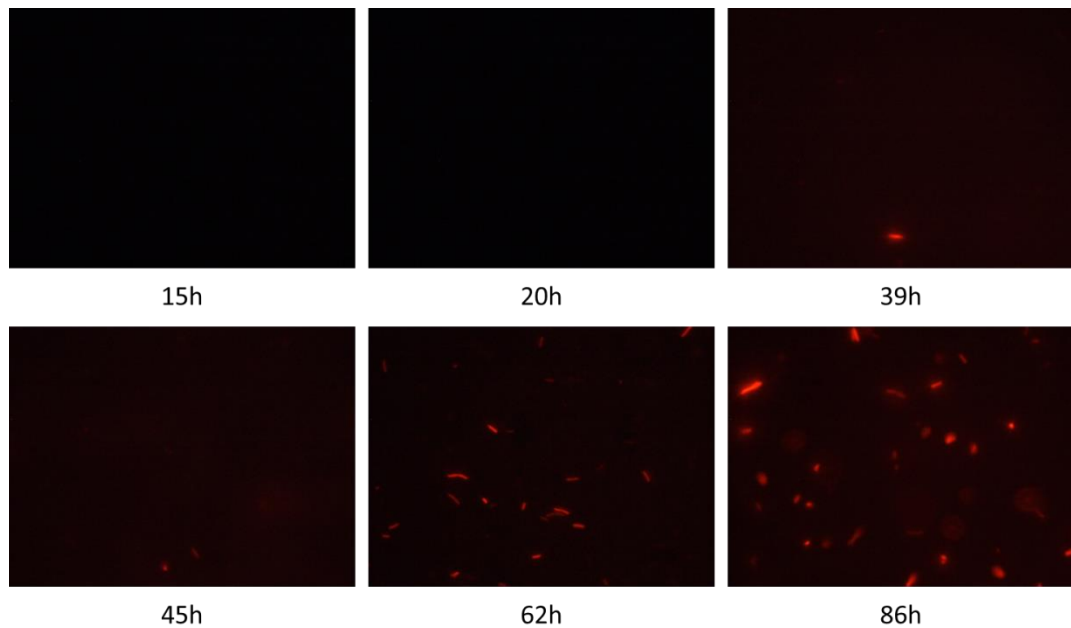


Figura 5. Seguimiento de la fluorescencia de mOrange2 en *E. coli* transformadas.

La fluorescencia de mOrange2 no logró ser perceptible antes de las 39 horas, en donde empezó a emitir una débil fluorescencia. Después de las 62 horas se empezó a captar una fluorescencia considerable. La inducción se realizó con 1mM de IPTG.

Las AFPs mCherry y mOrange2 tienen un máximo de emisión a longitudes de onda distintas, 610nm y 565nm respectivamente (Anexo 1), las cuales están lo suficientemente apartadas como para producir una emisión de color distinta (Figura 6). Sin embargo, debido a las características del filtro usado (Y-2E), las longitudes de onda, emitidas por la fluorescencia de cada una de las AFP, que son efectivamente captadas por el filtro son idénticas, por tanto presentan el mismo color (Figura 7).

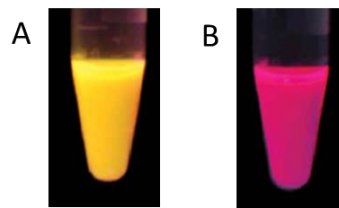


Figura 6. Comparación de la fluorescencia emitida por las AFPs usadas.

Fluorescencia emitida por las proteínas purificadas (A) mOrange2 y (B) mCherry. Adaptado de Shaner, et al., 2004.

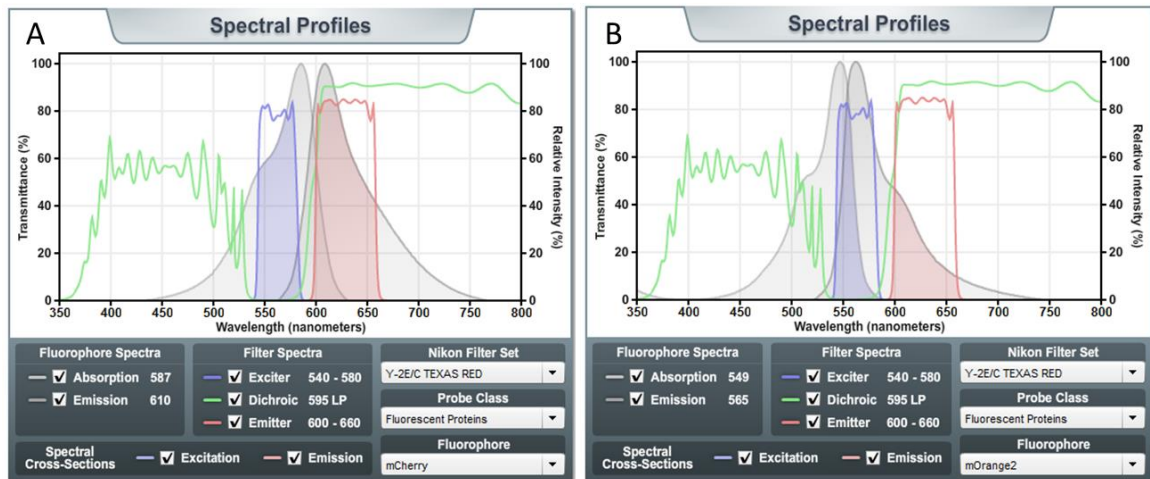


Figura 7. Comparación entre los espectros de excitación y emisión de las AFPs bajo el filtro Y-2E.

Espectro de emisión de mCherry (A) y mOrange2 (B) bajo el filtro Y-2E. La curva azul representa el intervalo de longitud de onda en los cuales se produce la excitación bajo el filtro Y-2E, mientras que la curva roja representa el intervalo de longitud de onda en los cuales se capta la fluorescencia emitida por la muestra. Para las dos AFPs, la primera curva gris indica el intervalo de longitud de onda al cual se excita la proteína, mientras que la segunda curva gris representa el intervalo de longitud de onda en el cual dicha proteína expresa fluorescencia. Tomado de <http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/spectralprofiles/index.html>.

6.5. Evaluación de la estabilidad de la transformación en *E. coli*

Para comprobar la estabilidad de la transformación de las bacterias *E. coli* se evaluó la presencia y expresión de AFPs durante 10 generaciones mediante repiques sucesivos de las bacterias en placas de agar LB suplementadas con ampicilina. Para comprobar si las bacterias conservaron el plásmido se realizó un PCR de colonia y posteriormente se llevó a cabo la inducción de la expresión de las AFPs con IPTG, demostrando que las bacterias conservaron el plásmido funcional (Figura 8).

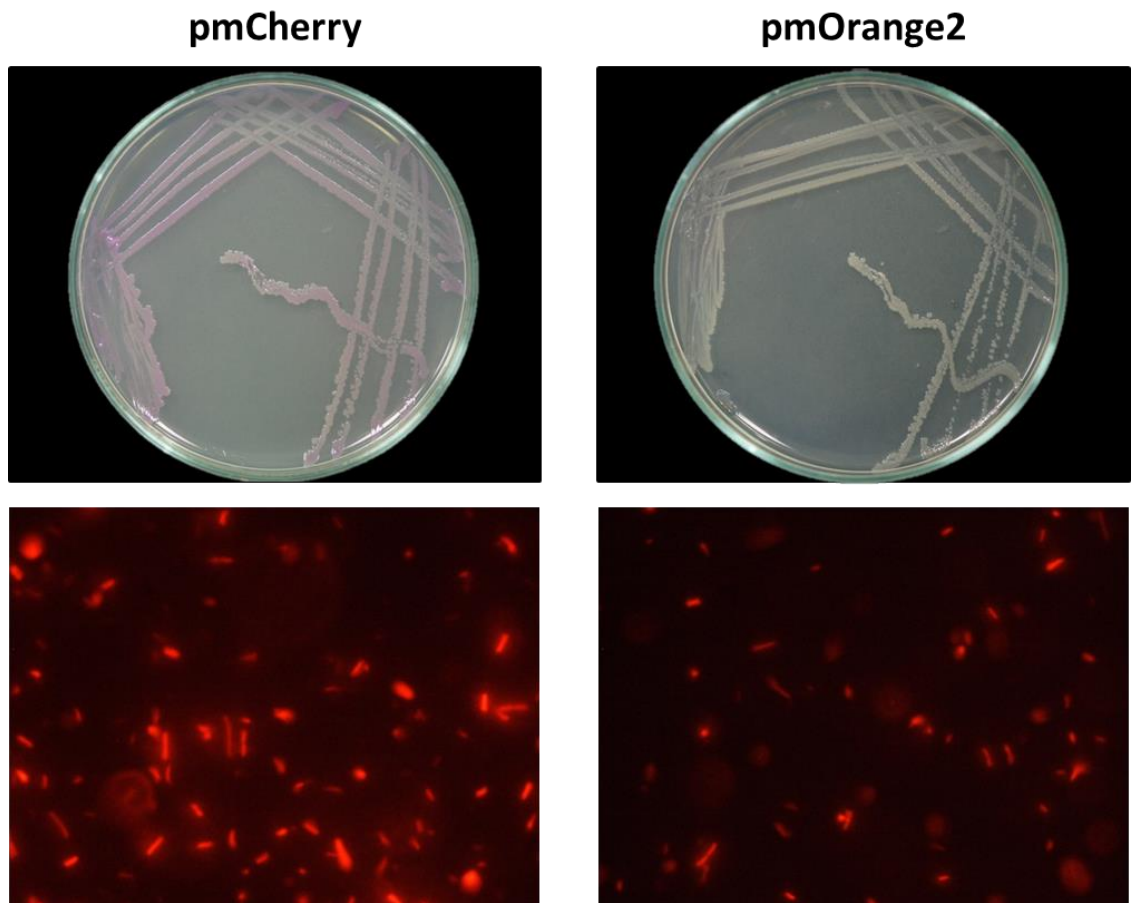


Figura 8. Estabilidad de la transformación con pmCherry y pmOrange2 en *E. coli*.

Crecimiento de colonias transformantes de *Escherichia coli* DH5 α luego de 10 generaciones en agar LB con 50 μ g/ml ampicilina (paneles superiores) y expresión de las proteínas mCherry y mOrange2 después de la inducción con 1mM IPTG (paneles inferiores).

6.6. Stock de *E. coli* transformantes y evaluación de su viabilidad

Se realizó un stock de *E. coli* transformantes tanto para las bacterias transformadas con el plásmido pmCherry como para las transformadas con pmOrange2. El stock de bacterias fue almacenado a -80°C en medio LB con $50\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y glicerol al 20%.

Se evaluó la estabilidad de la transformación luego de 15 días de almacenamiento a -80°C , mediante siembra en placas de agar LB con $50\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Además, se realizó un PCR de colonia y la inducción de la expresión de las AFPs, con lo que se demostró el correcto funcionamiento del plásmido (Figura 9).

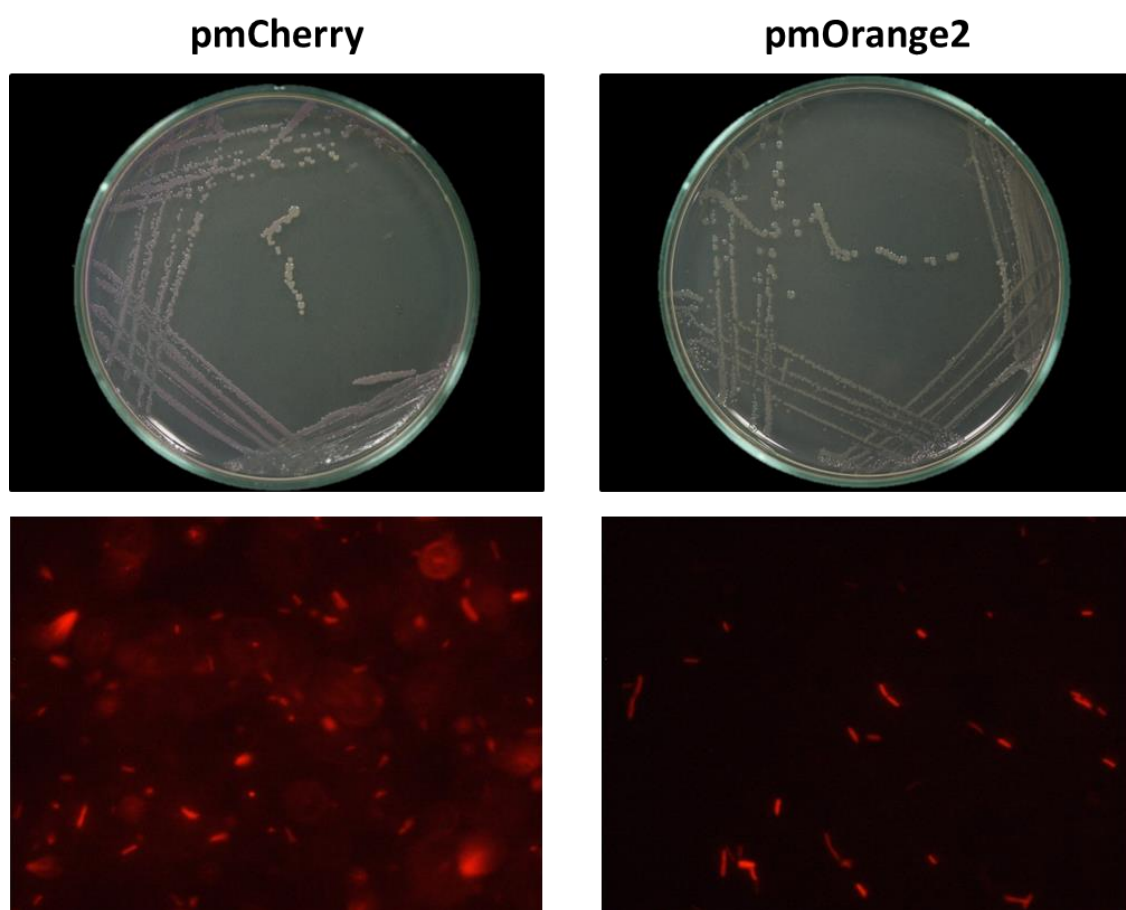


Figura 9. Viabilidad del stock de *E. coli* transformadas con pmCherry y pmOrange2.

Crecimiento de colonias transformantes de *Escherichia coli* DH5 α tomadas a partir de un stock a -80°C en agar LB con $50\mu\text{g/ml}$ ampicilina (paneles superiores) y expresión de las proteínas mCherry y mOrange2 después de la inducción con 1mM IPTG (paneles inferiores).

6.7. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción del plásmido se inoculó una colonia de *E. coli* transformada, con el plásmido respectivo, en 2ml de medio LB con 50µg/ml de ampicilina durante la noche a 37°C y 180rpm. El rendimiento de la extracción fue de 3.02µg/µl para pmCherry y 2.25µg/µl para pmOrange2.

6.8. Transformación de bacterias endófitas

Para la obtención de células competentes y la transformación por electroporación de las diferentes cepas se realizaron modificaciones al protocolo usado por Elbeltagy et al. (2001). Primero, para la preparación de células competentes se utilizaron cultivos líquidos de cada cepa en un medio que permitiera un rápido crecimiento. Para *E. coli* y *Pantoea* sp. se utilizó caldo nutritivo, mientras que para *Rhizobium* sp. se utilizó caldo CASO. Para todas las cepas, el medio fue suplementado con 20mM de Mg²⁺, en forma de 10mM MgSO₄ y 10mM de MgCl₂, puesto que el crecimiento en estas condiciones aumenta la fluidez de la membrana y facilita la transformación (Srivastava, 2013). *E. coli* y *Pantoea* sp. fueron cultivadas durante 12 a 24 horas, mientras que *Rhizobium* sp. fue cultivado entre 48 a 72 horas (2 a 3 días), debido a su lento crecimiento.

Finalizado el periodo de incubación, el cultivo bacteriano fue enfriado en hielo durante 15 a 30 minutos. Después se prosiguió con una serie de tres centrifugaciones y resuspensiones para volver las células competentes. Las centrifugaciones fueron realizadas a 5000g durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido dos veces en agua destilada autoclavada helada (en 1 volumen y 0.5 volúmenes, respectivamente) y luego dos veces en una solución fría de glicerol al 10% (primero en 0.02 volúmenes y después en 0.0025 ó 0.005 volúmenes, según fuera necesario), utilizando para cada resuspensión un volumen menor al anterior con el fin de concentrar las bacterias. Las bacterias fueron mantenidas en hielo a lo largo de todo el proceso. Las células competentes fueron distribuidas en alícuotas de 50µl y almacenadas a -80°C hasta su uso.

Para la transformación, 100ng del plásmido con la AFP de interés fue adicionado a 50µl de células competentes y se incubó la mezcla en hielo durante 15 minutos. La mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación de 2mm de separación entre los electrodos y se electroporó a 2500V (12,5kV/cm). Las bacterias fueron inmediatamente diluidas en 1ml de medio SOC, transferidas a tubos estériles y cultivadas a 30°C durante 3 a 4 horas, en el caso de *Pantoea* sp., y 6 a 8 horas en el caso de *Rhizobium* sp. (debido a su lento crecimiento). El periodo de recuperación de las bacterias *E. coli* después de la electroporadas fue de 1 hora a

37°C. Después de este lapso, las bacterias transformadas se cultivaron en placas de agar LB con 50µg/ml de ampicilina para seleccionar las bacterias transformantes.

Para llevar a cabo la transformación por electroporación se utilizó como control células electrocompetentes comerciales de *E. coli* (ElectroMAX™ DH5α-E™ Competent Cells, Invitrogen) para comprobar el correcto funcionamiento del electroporador. Dichas células fueron transformadas con el plásmido control pUC19, para demostrar el funcionamiento de estas células, y con pmCherry, para demostrar que es posible transformar con el plásmido obtenido a partir de la extracción. La transformación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante de las células competentes. De igual forma, se transformaron células competentes de *E. coli* con pmOrange2 con el fin de comprobar si el protocolo para hacer las células competentes es adecuado. Como ya se mencionó con anterioridad, se decidió transformar *Pantoea* sp. con pmCherry y *Rhizobium* sp. con pmOrange2.

Tanto las bacterias de *Pantoea* sp. como de *E. coli* ElectroMAX DH5α que fueron transformadas exitosamente con pmCherry presentaron una coloración morada en placas de agar LB con ampicilina (Figura 10). La transformación de las diferentes bacterias se comprobó mediante PCR de colonia (Figura 11). Seguidamente se prosiguió a realizar la inducción de la expresión de mCherry y la visualización a diferentes tiempos en el microscopio de fluorescencia (Figura 12). Una vez se confirmó la expresión de mCherry por parte de *Pantoea* sp. se realizó un stock de la bacteria transformada y este fue guardado a -80°C. No se logró evaluar la viabilidad de dicho stock por falta de tiempo.

Por otro lado, no se logró transformar *Rhizobium* sp. con pmOrange2. Se piensa que esto se debe a que el plásmido no ha sido incorporado por la bacteria durante la electroporación y no a la falta de supervivencia de la bacteria al proceso, puesto que tanto las células competentes como las bacterias electroporadas han sido cultivadas en agar LB y en los dos casos se ha presentado crecimiento (Figura 13).

Debido a que no se logró transformar *Rhizobium* sp. con pmOrange2 por electroporación, se decidió intentar transformar por choque térmico, puesto que existen reportes de transformación exitosa en especies de la familia Rhizobiaceae, a la cual pertenece *Rhizobium* sp., mediante este método (Vincze & Bowra, 2006, & Patel & Sinha, 2010). Sin embargo, los esfuerzos realizados para transformar mediante este método también fueron infructíferos, puesto que no existió crecimiento de colonias transformantes en agar LB con 50µg/ml de ampicilina. Este resultado pudo deberse a la baja concentración de células obtenidas, puesto que se trata de una cepa de crecimiento lento, por lo que a las 6 horas de cultivo la densidad bacteriana fue baja. De este modo se tuvieron pocas bacterias para la

transformación, por lo que las probabilidades de una transformación exitosa fueron bajas.

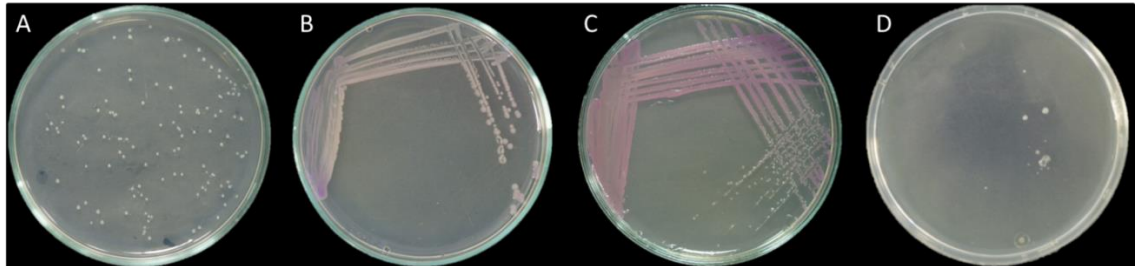


Figura 10. Crecimiento de colonias de bacterias transformadas en agar LB con ampicilina.

A) *E. coli* ElectroMAX DH5 α transformada con plásmido control pUC19. B) *E. coli* ElectroMAX DH5 α transformada con pmCherry. C) *Pantoea* sp. transformada con pmCherry. D) Dilución 1×10^{-4} de *E. coli* transformada con pmOrange2.

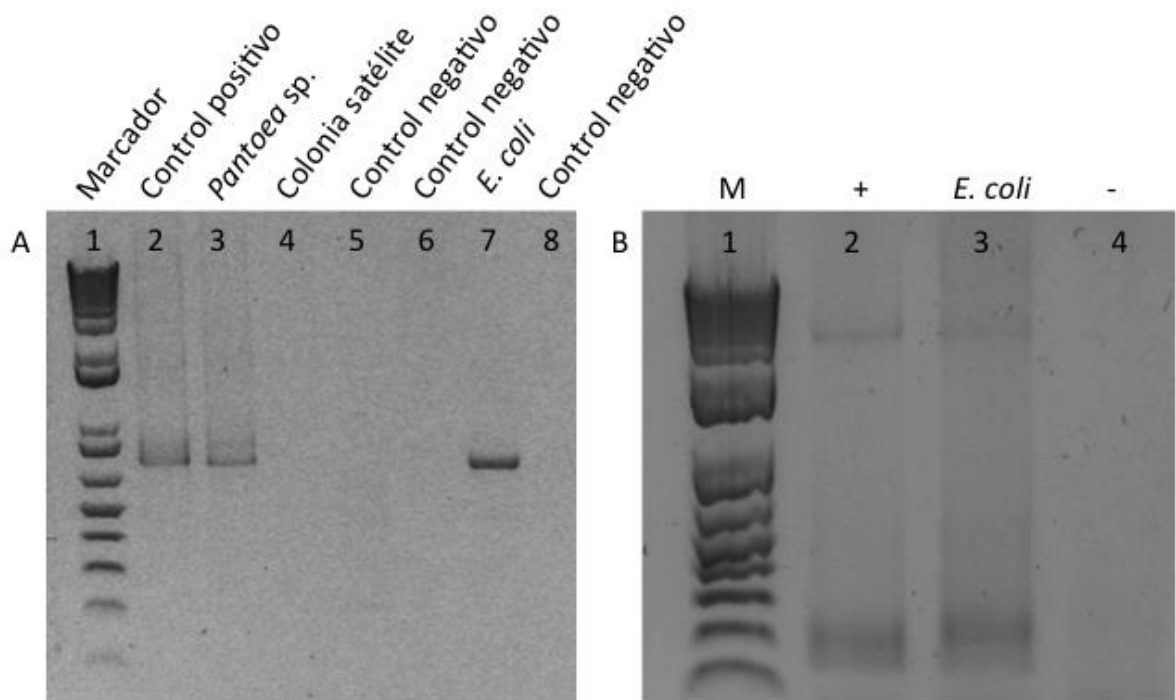


Figura 11. Amplificación mediante PCR para comprobar la incorporación del plásmido por parte de las bacterias transformadas.

A) PCR de colonia con primers mCherry2013F y mCherry5514R. Tamaño del producto esperado: 699 bp. De izquierda a derecha: 1) Marcador molecular 1Kb Plus (Life Technologies), 2) Control positivo, 3) *Pantoea* sp. transformada con pmCherry (colonia de color morada), 4) Colonia satélite de *Pantoea* sp. (colonia de color amarilla, que corresponde al color normal de esta cepa), 5) Control negativo de *Pantoea* sp. sometida al proceso de transformación, 6) Control negativo de *Pantoea* sp. no sometido al proceso de transformación, 7) *E. coli* ElectroMAX DH5 α transformada con pmCherry (colonia morada), 8) Control negativo. Gel de agarosa al 1%. B) PCR de colonia con primers mOrange22013F y mOrange22013R. Tamaño del producto esperado: 155

bp. De izquierda a derecha: 1) Marcador molecular 1kb, 2) Control positivo, 3) *E. coli* transformada, 4) Control negativo. Gel de agarosa al 1%.

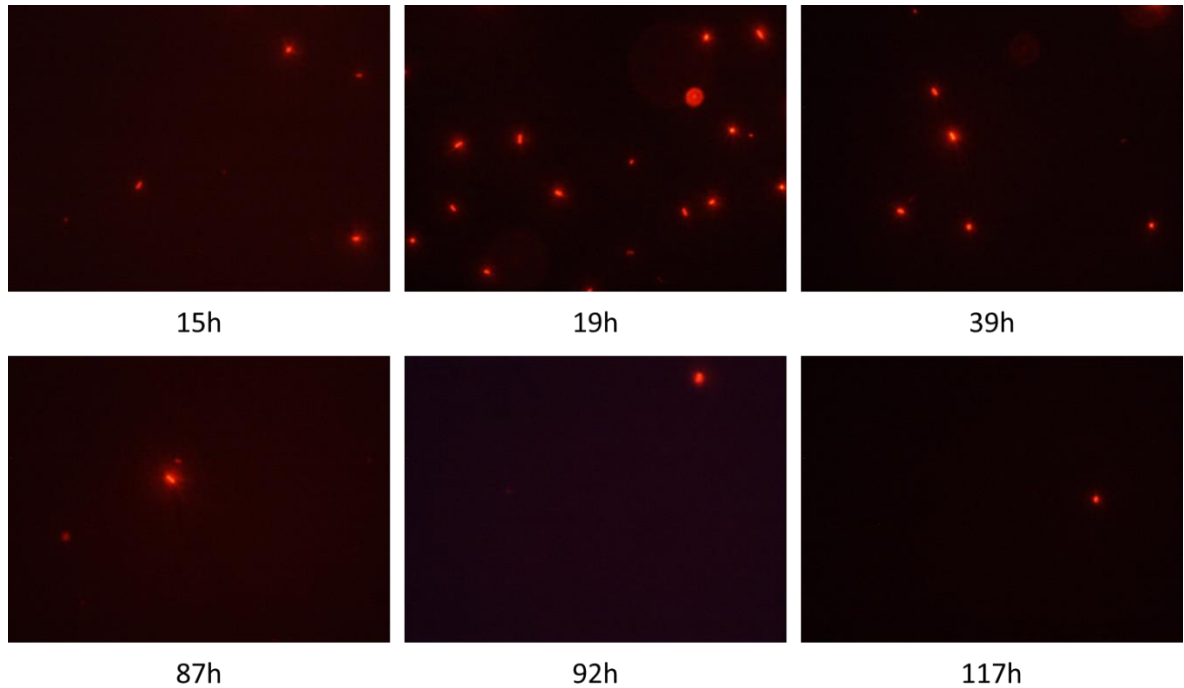


Figura 12. Seguimiento de la fluorescencia de mCherry en *Pantoea* sp. transformadas.

La fluorescencia producida por la proteína mCherry expresada en *Pantoea* sp. fue perceptible después de 15 horas de inducción con 1mM IPTG. Sin embargo su duración no fue tan longeva como la encontrada en la inducción de la misma proteína en *E. coli*, puesto que después de 87 horas se presentó poca fluorescencia.

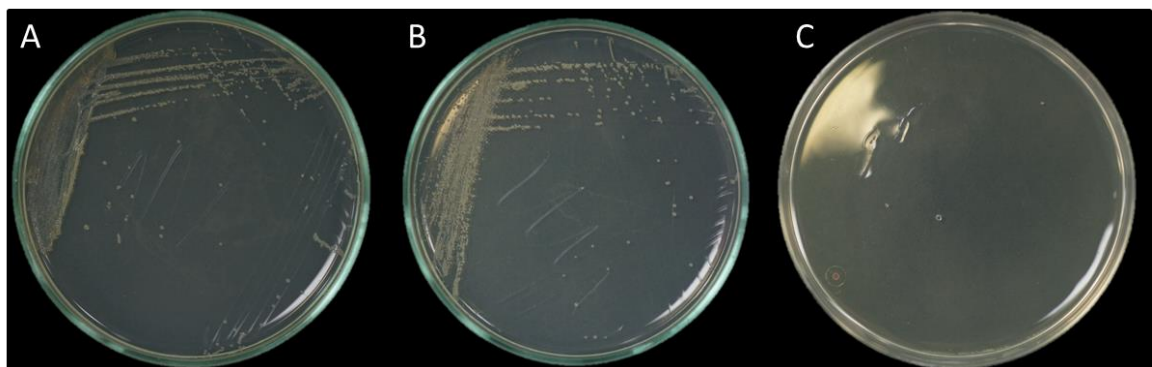


Figura 13. Cultivo de bacterias de *Rhizobium* sp. en diferentes etapas del proceso de transformación.

A) Células competentes en medio sin ampicilina. B) Bacterias después de la electroporación en medio sin ampicilina. C) Falta de crecimiento, en medio con 50µg/ml de ampicilina, de *Rhizobium* sp. que ha intentado ser transformado con pmOrange2. Resultados similares fueron obtenidos siguiendo el proceso de transformación por choque térmico.

7. Discusión

En las últimas décadas, el marcaje con AFPs se ha convertido en una herramienta importante en diferentes estudios de ecología microbiológica, entre estos, la interacción planta-bacteria (Larrainzar, O'Gara, & Morrissey, 2005). Numerosos estudios han reportado el uso de AFPs para el monitoreo de bacterias endófitas en distintas especies vegetales, entre ellos *Burkholderia* sp. con GFP en uva (Compant, et al., 2005), *Bacillus megaterium* C4 con GFP en maíz (Liu, Zhao, & Chen, 2006), *Streptomyces* sp. con EGFP en trigo (Coombs & Franco, 2003) y *Herbaspirillum* sp. con GFP en arroz (Elbeltagy, et al., 2001). De igual forma, existen reportes de especies del género *Rhizobium* transformadas con AFPs (Stuurman, et al., 2000, & Hallmann, et al., 2001) y reportes de transformaciones similares para especies del género *Pantoea* (Ferreira, et al., 2008, & Verma, et al., 2004). Sin embargo, en este proyecto se usaron especies putativamente nuevas para ser marcadas con AFPs, y cada especie, e incluso en algunos casos ciertas cepas, presentan diferentes complicaciones, puesto que existen diferencias innatas en su cultivo (medio, temperatura, tiempo, etc.), pared celular (tamaño, composición, permeabilidad), voltaje necesario para transformar, concentración y pureza del ADN, entre otros (Eynard & Teissie, 2000), por lo que se requiere de un protocolo adaptado a las necesidades de cada bacteria de interés. De acuerdo a esto, la importancia de este proyecto radica en la transformación de dos especies putativamente nuevas de bacterias endófitas de arroz, *Pantoea* sp. y *Rhizobium* sp., con variantes nuevas de AFPs, mCherry y mOrange2, mediante un protocolo de transformación adaptado a las condiciones de estas dos bacterias.

En este trabajo se decidió hacer la transformación con plásmidos que contienen los genes de interés y no con inserción genómica de dichos genes, puesto que no se ha secuenciado el genoma completo de las dos bacterias de interés, por lo que se desconoce si tienen sitios de inserción específica necesarios para llevar a cabo una inserción dirigida. De igual forma, se descartó la opción de realizar una inserción al azar en el genoma, debido a que, como su nombre sugiere, no es posible controlar el sitio de inserción del gen de interés y, debido a que la interacción planta-bacteria es un proceso complejo que involucra gran cantidad de genes (Louise, et al., 2005), se puede afectar este proceso.

Las bacterias de *Escherichia coli* DH5 α transformadas con pmCherry y pmOrange2 sirvieron como organismo modelo para el desarrollo de un protocolo de inducción de la expresión de las AFPs que permitiera su visualización bajo el microscopio de fluorescencia. A su vez, estas bacterias transformadas fueron usadas para determinar la estabilidad de la transformación con los plásmidos usados. No obstante, como su nombre sugiere, estos son organismos modelos, por lo que el protocolo obtenido debe ser usado como base para la estandarización del mismo en las bacterias endófitas transformadas y la prueba de estabilidad de la

transformación debe ser repetida para estas bacterias. Estas dos actividades no se lograron hacer en este proyecto por falta de tiempo. Además falta determinar la viabilidad de las bacterias durante el proceso de inducción, de tal modo que se pueda identificar si el aumento de la fluorescencia en las cepas de *E. coli* transformadas se debe a un aumento en la cantidad de bacterias que emiten fluorescencia o a lisis celular de dichas bacterias que libera las AFPs al medio, produciendo ruido (señal fluorescente que no representa bacterias) durante la visualización de la fluorescencia.

El uso de *E. coli* DH5 α como cepa control durante el proceso de transformación por electroporación permitió comprobar el funcionamiento de los protocolos usados en el proceso. El uso de células electrocompetentes comerciales de esta cepa permitió evaluar el correcto desempeño del equipo de electroporación y la calidad del plásmido obtenido de la extracción. Además, el uso de *E. coli* que fue hecha competente con el protocolo desarrollado en este trabajo sirvió de modelo para la comprobación de que el protocolo efectivamente funciona y permitió establecer que en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi se cuenta con las capacidades necesarias para llevar a cabo la transformación de las bacterias endófitas que hacen parte del cepario del laboratorio.

Especies del género *Pantoea* han sido transformadas por conjugación (Verma, et al., 2004) y por electroporación (Weinthal, et al., 2007); mientras que especies del género *Rhizobium* se han transformado por métodos de conjugación (Hallmann, et al., 2001), electroporación (Garg, Dogra, & Sharma, 1999) y choque térmico (Vincze & Bowra, 2006). Para este trabajo se eligió llevar a cabo la transformación por electroporación debido a su mayor eficiencia en comparación con los otros métodos utilizados (Borralho, et al., 2002). Para la transformación se eligió el protocolo usado por Elbeltagy et al. (2001) debido a que este es el mismo protocolo utilizado por Unge, et al., (1998), el cual ha sido utilizado para la transformación de diferentes bacterias endófitas (Compant, et al., 2005; You, et al., 2005; Tombolini, van der Gaag, Gerhardson, & Jansson, 1999; & Unge, et al., 1999). No obstante, el protocolo requirió ciertas adaptaciones para su uso en las bacterias de interés a transformar. El primero de ellos fue el cultivo de cada una de las bacterias en un medio que permite su supervivencia y crecimiento de forma rápida. Otro de los cambios realizados fue el aumento en el tiempo y velocidad de centrifugación, puesto que las cepas usadas no forman pellet con facilidad, por lo que se requería de una mayor fuerza y un tiempo más prolongado para precipitar el mayor número de células posibles. También se modificó el volumen usado para lavar el pellet, puesto que se decidió realizar lavados siguiendo una disminución gradual del volumen utilizado en vez de utilizar siempre el mismo volumen. Esto con el fin de obtener una menor pérdida de bacterias que quedan en la solución (por la dificultad de precipitación de estas cepas) que se presenta al usar volúmenes más grandes. La última modificación importante en el protocolo fue el cambio del medio de recuperación después de la electroporación, que fue cambiado de medio nutritivo a medio SOC, dado que este permite una

recuperación más rápida y la recuperación de mayor cantidad de células después del pulso eléctrico, lo que se traduce en una mayor eficiencia de transformación.

Con el protocolo modificado se logró la transformación de la cepa de *Pantoea* sp. con pmCherry. Esta bacteria transformada fue capaz de producir fluorescencia al ser inducida con IPTG. No obstante, dicha fluorescencia fue débil y no se presentó por un periodo prolongado en comparación con la encontrada en la inducción en *E. coli*. Esto puede deberse a una concentración de IPTG que no es la adecuada para inducir la expresión de la proteína deseada en esta bacteria. Para solucionar esto, se propone probar diferentes concentraciones de IPTG para determinar la concentración óptima que permita visualizar una fuerte fluorescencia durante un tiempo suficientemente prolongado de modo que sea posible utilizar la bacteria en ensayos de colonización de plantas. Además es necesario realizar el ensayo de estabilidad de la transformación en *Pantoea* sp. en medio sin antibiótico y por un tiempo más prolongado (por lo menos 30 generaciones) para determinar su utilidad para los ensayos *in vivo* (Vincze & Bowra, 2006).

En cuanto a *Rhizobium* sp., su transformación con pmOrange2 no se ha logrado llevar a cabo. La falta de incorporación del plásmido por parte de esta bacteria puede deberse a que el cultivo usado para la obtención de células competentes no se encontraba en fase de crecimiento exponencial, la cual corresponde al momento en el que las bacterias adquieren con mayor facilidad ADN foráneo como se ha visto en especies emparentadas de la familia Rhizobiaceae (Patel & Sinha, 2010). Otra posible causa puede ser el método usado para llevar a cabo la transformación. Generalmente, se considera que la electroporación presenta una alta tasa de eficiencia, sin embargo, dado que las bacterias son sometidas a un pulso eléctrico durante el proceso, también presenta una elevada mortalidad (Borralho, et al., 2002). Debido al lento crecimiento de *Rhizobium* sp., es posible que esta bacteria no se alcance a recuperar después del pulso eléctrico o el tiempo no sea suficiente como para garantizar la expresión del plásmido, es decir que no se logra expresar el mecanismo de resistencia al antibiótico (Eynard & Teissie, 2000). Según esto lo anterior, sería pertinente probar la transformación por electroporación con diferentes tiempos de recuperación.

Un acercamiento para circunvenir la alta mortalidad que se presenta en la electroporación fue llevar a cabo la transformación por choque térmico. A pesar de que esta transformación ha sido usada exitosamente en especies pertenecientes a la misma familia de *Rhizobium* sp. (Vincze & Bowra, 2006, & Patel & Sinha, 2010), los resultados no fueron diferentes a los obtenidos con la electroporación. Lo anterior probablemente fue producto del corto tiempo de incubación (6 horas) del cultivo de *Rhizobium* sp. Como esta cepa tiene un crecimiento lento, al término de la incubación no se obtuvo una alta densidad bacteriana necesaria para la transformación, de modo que existía muy baja probabilidad de obtener bacterias transformantes.

Una posible solución a los problemas presentados en las dos metodologías de transformación de *Rhizobium* sp. es la realización de una curva de crecimiento para esta cepa, de modo que se conozca un tiempo aproximado en donde se dé un buen crecimiento bacteriano para poder modificar el tiempo de recuperación o el tiempo de cultivo necesario. Otra posible explicación de la falta de crecimiento en medio selectivo de bacterias de *Rhizobium* sp. transformadas es la concentración de ampicilina utilizada (50µg/ml), dado que esta representa la concentración máxima a la cual confiere resistencia el plásmido utilizado; sin embargo puede suceder que para esta cepa en particular el nivel de resistencia que le confiere el plásmido es menor al esperado, por lo que se hace necesario realizar una curva de resistencia con las bacterias obtenidas después de la electroporación para determinar si son resistentes a una concentración de ampicilina menor. Una última complicación que se pudo haber presentado fue la calidad del plásmido en uso, aunque cuando fue cuantificado dio niveles de pureza buenos y el mismo plásmido fue usado para la transformación exitosa de *E. coli* por electroporación, puede ser que no se encontraba lo suficientemente puro para la transformación de *Rhizobium* sp., ya que el nivel de pureza necesario varía para diferentes bacterias. Por esto se recomienda llevar a cabo una repurificación del plásmido para mejorar la eficiencia de transformación.

Al finalizar este proyecto, se logró la transformación de dos bacterias, *E. coli* DH5α (como cepa control) y *Pantoea* sp., con plásmidos codificantes para proteínas autofluorescentes. La expresión de dichas proteínas es inducible por IPTG y permite su visualización bajo el microscopio de fluorescencia, lo cual resulta ventajoso a la hora de determinar la capacidad de bacterias endófitas, como el caso de *Pantoea* sp., para colonizar variedades de arroz silvestres y comerciales.

En las diferentes cepas transformadas se encontró que en las colonias se presentaba una expresión constitutiva de las AFPs. Particularmente aquellas transformadas con pmCherry presentan una coloración morada característica fácil de identificar, mientras que aquellas transformadas con pmOrange2 solo son identificables a simple vista al manipular las colonias (por ejemplo, cuando son tomadas con un asa microbiológica o un hisopo, Anexo 6). Sin embargo, el plásmido está construido para que la expresión de estas proteínas se dé por inducción y no de forma constitutiva. Una posible explicación a esta aparente contradicción se encuentra en el mecanismo por el cual se regula la expresión de las proteínas codificadas en estos plásmidos. En estos plásmidos la regulación de la expresión se da por inhibición, en donde el operador *lac* es reconocido por la proteína Lac I, para la cual sirve de sitio de unión, impidiendo el acceso de la RNA polimerasa a los genes codificantes de AFPs y bloqueando su transcripción (Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012). No obstante, el plásmido no codifica para la proteína Lac I, por lo que la fuente de producción de esta proteína debe ser la misma bacteria. De este modo, si la bacteria transformada no produce Lac I en niveles suficientemente altos, se puede

encontrar una expresión residual de AFPs por parte de genes cuya expresión no se encuentra inhibida.

Además de codificar para las AFPs de interés, los plásmidos utilizados codifican para la resistencia a ampicilina. El mecanismo de esta resistencia se basa en la secreción de β -lactamasas al medio, las cuales son capaces de degradar la ampicilina (Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012). Por esto, el uso de ampicilina como mecanismo de selección presenta ciertos cuidados. En medio sólido, el crecimiento de las bacterias transformadas suele acompañarse por crecimiento de bacterias que carecen del plásmido, pero que aprovechan la zona adyacente a las bacterias resistentes en donde se ha degradado el antibiótico. En cuanto a medio líquido, se debe tener especial cuidado en la densidad bacteriana que se permite alcanzar al cultivo, puesto que al aumentar esta también aumenta la producción de β -lactamasas, lo cual fomenta la pérdida del plásmido al desaparecer la presión de selección de la ampicilina. Esto puede generar problemas especialmente para el proceso de inducción de la expresión de las AFPs. Con la metodología usada para la inducción en *E. coli* no se está presentando este problema, sin embargo, es un aspecto que se debe tener en cuenta y de presentarse algún tipo de problema, se puede considerar la posibilidad de utilizar carbenicilina en vez de ampicilina, ya que es un compuesto más estable, con la misma función y el mismo mecanismo que confiere la resistencia a ampicilina también confiere resistencia a este antibiótico (Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012).

En cuanto a la expresión de las AFPs, se encontró que la fluorescencia de mCherry fue visible con mayor facilidad, más prontamente y por un tiempo más prolongado que aquella producida por mOrange2. Es posible que esto se deba a una diferencia en el tiempo de maduración y de degradación de las dos proteínas (Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005, & Shaner, et al., 2008). Sin embargo, estas dos AFPs no son muy diferentes entre sí, ya que presentan un porcentaje de identidad del 97% en sus secuencias nucleotídicas y del 95% en sus secuencias de aminoácidos (Anexo 7), por lo que una diferencia tan significativa como la encontrada para la expresión de estas dos proteínas en un mismo organismo (*E. coli* DH5 α) probablemente se deba a algún otro factor. Debido a que las condiciones para el proceso de inducción fueron iguales para mCherry y mOrange2, la diferencia encontrada en su fluorescencia probablemente se deba al filtro Y-2E usado para visualizar las bacterias transformadas. Esto se debe a que en el rango de longitudes de onda a los cuales este filtro permite visualizar fluorescencia (600-660nm) no son los óptimos para mOrange2, puesto que a estas longitudes el porcentaje de transmitancia de esta proteína ya ha caído por debajo del 50% (Figura 7).

En este trabajo se alcanzó parcialmente los objetivos planteados, puesto que en cuanto a la transformación de las bacterias endófitas se logró transformar *Pantoea* sp. con pmCherry, mas no se logró transformar *Rhizobium* sp. con pmOrange2 por

falta de tiempo. No obstante, cabe recalcar la importancia de la transformación lograda en el proyecto, puesto que se logró desarrollar una metodología que permite el marcaje de bacterias endófitas con proteínas autofluorescentes y una metodología para la expresión de dichas proteínas que permite su visualización bajo el microscopio de fluorescencia.

8. Conclusiones

- Por medio de este proyecto se logró el diseño de primers específicos para la amplificación de regiones pertenecientes a los genes mCherry y mOrange2 que permiten identificar bacterias transformantes mediante PCR.
- La transformación de *E. coli* con pmCherry y pmOrange2 dio paso al establecimiento de un protocolo para la inducción de la expresión de estas proteínas que permita la visualización de bacterias transformadas bajo el microscopio de fluorescencia.
- Se estableció un protocolo para la transformación por electroporación de bacterias endófitas con plásmidos codificantes de proteínas autofluorescentes y se logró comprobar la capacidad del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi para llevar a cabo dichas transformaciones.
- Al finalizar el proyecto se obtuvieron bacterias transformadas de *Pantoea* sp. con pmCherry, lo que da paso a la realización de ensayos *in vivo* de colonización de plantas de arroz, por parte de estas bacterias, en los cuales se pueda realizar un seguimiento de la localización de *Pantoea* sp. gracias a la fluorescencia emitida.
- La transformación de *Rhizobium* sp. con pmOrange2 queda pendiente para su realización, ya que no logró llevarse a cabo por falta de tiempo.

9. Recomendaciones

- Para evitar la pérdida del plásmido por parte de las bacterias transformadas en cultivos líquidos se recomienda probar el uso de carbenicilina en vez de ampicilina, puesto que es un antibiótico más estable que puede garantizar mejores resultados.
- Es necesario determinar si el aumento de la fluorescencia en las cepas de *E. coli* transformadas se debe a un aumento en la cantidad de bacterias que emiten fluorescencia o a lisis celular que libera las AFPs al medio.
- El uso de un mejor filtro para la fluorescencia producida por mOrange2 mejoraría de gran manera su visualización, puesto que el filtro usado para este trabajo no permite captar las longitudes de onda de mayor transmitancia de esta proteína, perdiéndose la mayor parte de la señal producida.
- Es necesario la estandarización del protocolo de inducción de la expresión de mCherry en *Pantoea* sp. Para lo cual se deben probar diferentes concentraciones de IPTG, puesto que a 1mM la expresión de mCherry no presenta una señal estable durante un tiempo suficiente para realizar ensayos de colonización de plantas de arroz.
- Realizar la prueba de estabilidad de la transformación con pmCherry en *Pantoea* sp. para determinar si la transformación es estable y evaluar la viabilidad del stock de glicerol realizado.
- Para mejorar las probabilidades de transformación de *Rhizobium* sp., se recomienda realizar una curva de crecimiento para esta bacteria a modo de determinar el tiempo necesario de cultivo para alcanzar la fase de crecimiento exponencial. De esta forma, se logrará obtener células competentes que posean una mayor probabilidad de incorporar el plásmido durante la transformación. Además, esta curva proporcionará datos de un tiempo aproximado en donde se dé un buen crecimiento bacteriano para poder modificar el tiempo de recuperación después del pulso eléctrico.
- En caso de no tener éxito con la transformación de *Rhizobium* sp., mediante electroporación, se recomienda intentar transformar por choque térmico como ha sido reportado para otras bacterias emparentadas. Para esta transformación se realizará un ajuste del protocolo usado para tener un periodo de incubación acorde con lo encontrado en los datos de la curva de crecimiento para un tiempo suficiente de incubación para obtener una densidad bacteriana alta.
- Es importante realizar una curva de resistencia a ampicilina con las bacterias de *Rhizobium* sp. obtenidas después de la electroporación para determinar si el plásmido les confiere un nivel de resistencia a una concentración de ampicilina menor a la esperada.

- También se recomienda realizar la repurificación del plásmido pmOrange2 extraído a partir de *E. coli*, puesto que la muestra puede contener impurezas que estén inhibiendo la transformación de *Rhizobium* sp.

10. Bibliografía

Adams, P. D. (2002). Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil* , 240 (1), 181-189.

Borrvalho, T., Chang, Y., Jain, P., Lalani, M., & Parghi, K. (2002). Effect of Electroporation Versus Hanahan Protocols on the Transformation of *Escherichia coli* HB101 with Chromosomal DNA from *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* B23, and *Bacillus subtilis* WB746 and the Plasmid p328. 5, Including an Analysis of Compet. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* , 2, 194-200.

Clark, L., Martinez-Argudo, I., Humphrey, T. J., & Jepson, M. A. (2009). GFP plasmid-induced defects in *Salmonella* invasion depend on plasmid architecture, not protein expression. *Microbiology* , 155 (2), 461-467.

Clontech. (2009). *Fluorescent Proteins & Reporters*. Retrieved 4 de Noviembre de 2013 from Clontech: http://www.clontech.com/CO/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins/Fluorescent_Proteins_Selection_Tool?sitex=10028:22372:US

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* , 42 (5), 669-678.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* , 71 (4), 1685-1693.

Coombs, J. T., & Franco, C. M. (2003). Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed. *Applied and environmental microbiology* , 69 (7), 4260-4262.

Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., et al. (2001). Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Applied and environmental microbiology* , 67 (11), 5285-5293.

Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y.-I., Morisaki, H., et al. (2000). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Wild and Traditionally Cultivated Rice Varieties. *Soil Science and Plant Nutrition* , 46 (3), 617-629.

Eynard, N., & Teissie, J. (2000). General Principles of Bacteria Electrotransformation: Key Steps . In N. Eynard, & J. Teissie, *Electrotransformation of bacteria* (pp. 3-22). Springer.

FAO. (2002). *Perspectivas por sectores principales: Producción de cultivos*. Retrieved 22 de Octubre de 2013 from Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido: <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm>

Ferreira, A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Oda, S., Azevedo, J. L., & Araújo, W. L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS microbiology letters* , 287 (1), 8-14.

Garg, B., Dogra, R. C., & Sharma, P. K. (1999). High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. *Applied and environmental microbiology* , 65 (6), 2802-2804.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cuarta ed., Vol. I). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cuarta ed., Vol. III). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Miller, W. G., Sikora, R. A., & Lindow, S. E. (2001). Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology* , 91 (4), 415-422.

Hung, P. Q., Kumar, S. M., Govindsamy, V., & Annapurna, K. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biology and Fertility of Soils* , 44 (1), 155-162.

Invitrogen. (s.f.). *pRSET-EmGFP*. Retrieved 4 de Noviembre de 2013 from Life Technologies: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V35320?ICID=search-product>

IRRI. (2010). *Rice and climate change: Impact of climate change on rice*. Retrieved 22 de Octubre de 2013 from IRRI: http://irri.org/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=9902&Itemid=100889&lang=en

IRRI. (s.f). *Rice basics: What is rice?* Retrieved 22 de Octubre de 2013 from IRRI: http://irri.org/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=9081&lang=en

Koch, B., Jensen, L. E., & Nybroe, O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral site. *Journal of microbiological methods* , 45 (3), 187-195.

Larrainzar, E., O'Gara, F., & Morrissey, J. P. (2005). Applications of Autofluorescent Proteins for In Situ Studies in Microbial Ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* , 59, 257-277.

Lin, J.-w., Annoura, T., Sajid, M., Chevalley-Maurel, S., Ramesar, J., Klop, O., et al. (2011). A novel 'gene insertion/marker out'(GIMO) method for transgene expression and gene complementation in rodent malaria parasites. *PloS one* , 6 (12), e29289.

Liu, X., Zhao, H., & Chen, S. (2006). Colonization of Maize and Rice Plants by Strain Bacillus megaterium C4. *Current microbiology* , 52 (3), 186-190.

Louise, M. G., Dow, J. M., Kiely, P. D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., et al. (2005). Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 102 (48), 17454-17459.

Nikon. (s.f). *Yellow Excitation: Y-2E/C (Bandpass Emission)*. Retrieved 28 de Enero de 2014 from MicroscopyU: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/yellow/y2ec/y2ecindex.html>

Nocker, A., & Camper, A. K. (2006). Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* , 72 (3), 1997-2004.

Patel, U., & Sinha, S. (2010). Transformation of Sinorhizobium meliloti MTCC 100 and Mesorhizobium ciceri TAL 620 by CaCl₂ method. *Canadian journal of microbiology* , 56 (1), 74-76.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* , 17 (4), 319-339.

Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., & Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS microbiology ecology* , 39 (1), 23-32.

Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., et al. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature methods* , 5 (6), 545-551.

Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods* , 2 (12), 905-909.

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22 (12), 1567-1572.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* , 31 (4), 425-448.

Srivastava, S. (2013). *Genetics of Bacteria*. New Delhi: Springer India.

Stuurman, N., Bras, C. P., Schlaman, H. R., Wijffjes, A. H., Bloemberg, G., & Spaik, H. P. (2000). Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 13 (11), 1163-1169.

Tombolini, R., van der Gaag, D. J., Gerhardson, B., & Jansson, J. K. (1999). Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein. *Applied and environmental microbiology* , 65 (8), 3674-3680.

Unge, A., Tombolini, R., Mølbak, L., & Jansson, J. K. (1999). Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dualgfp-luxAB marker system. *Applied and environmental microbiology* , 65 (2), 813-821.

Van Overbeek, L., & Van Elsas, J. D. (2008). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS microbiology ecology* , 64 (2), 283-296.

Verma, S. C., Singh, A., Chowdhury, S. P., & Tripathi, A. K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology letters* , 26 (5), 425-429.

Vincze, E., & Bowra, S. (2006). Transformation of Rhizobia with broad-host-range plasmids by using a freeze-thaw method. *Applied and environmental microbiology* , 72 (3), 2290-2293.

Weinthal, D. M., Barash, I., Panijel, M., Valinsky, L., Gaba, V., & Manulis-Sasson, S. (2007). Distribution and replication of the pathogenicity plasmid pPATH in diverse populations of the gall-forming bacterium *Pantoea agglomerans*. *Applied and environmental microbiology* , 73 (23), 7552-7561.

You, M., Nishiguchi, T., Saito, A., Isawa, T., Mitsui, H., & Minamisawa, K. (2005). Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum* endophyte in wild rice species: daily rhythm during the light-dark cycle. *Applied and environmental microbiology* , 71 (12), 8183-8190.

11. Impacto ambiental

El uso de bacterias endófitas para la generación de inóculos en prácticas de biofertilización representa una posible estrategia para reducir el impacto ambiental que representa el uso de pesticidas y fertilizantes en la producción agrícola.

Las bacterias endófitas transformadas fueron manejadas en todo momento en medio confinado, sin permitir escape de ningún tipo de éstas, y en ningún momento fueron liberadas al ambiente. La disposición de estas bacterias se hizo bajo las normas estipuladas por la Universidad Icesi, con el fin de evitar a toda costa su liberación al medio ambiente.

El manejo de los residuos de los reactivos y demás residuos tóxicos que se generaron durante el desarrollo del proyecto, se hizo bajo las normas estipuladas por la Universidad Icesi a fin de disminuir el riesgo de contaminación de aguas y otros ambientes.

12. Disposiciones vigentes

El proyecto se ciñó a las normativas éticas colombianas para la investigación con organismos genéticamente modificados (OGM):

- Decreto Número 4525 de 2005 por el cual se reglamenta la Ley 740 de 2002.
- Ley 740 de 2002 por medio de la cual se aprueba el 'Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica'.

13. Agradecimientos

- A la Dr. Thaura Ghneim Herrera por su supervisión y colaboración a lo largo del desarrollo del proyecto.
- A Alejandra Londoño Villegas, Eliana Torres Bedoya y Luis Carlos Ramos Páez por su ayuda durante el desarrollo de la fase experimental del proyecto.
- A la Dr. Zaida Lentini, al Dr. Andrés Castillo y al Dr. Federico Odreman por sus comentarios y ayuda en la realización del presente documento.
- Al M.Sc. Andrés Dávalos por su colaboración en diferentes etapas del proyecto.
- Al Dr. Carlos Valderrama, Eddie Tabares, Flavio Cerón, Alejandro Vera y Carlos Cardozo por su colaboración con diferentes equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto.
- Al ICGEB por la financiación del proyecto.

14. Anexos

Anexo 1. Propiedades de las variantes actuales de las proteínas GFP y DsRed.

Variante	Clase	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)	Luminosidad	Fotoestabilidad	pKa	Oligomerización	Observaciones
mPlum	Rojo lejano	590	649	4,1	53	<4,5	Monómero	Baja luminosidad, es usada cuando se necesita un amplio espectro de separación entre diferentes proteínas fluorescentes usadas al mismo tiempo.
mCherry*	Rojo	587	610	16	96	<4,5	Monómero	Menor luminosidad pero mayor estabilidad que mStrawberry
tdTomato		554	581	95	98	4,7	Dímero en tándem	Alto peso molecular.
mStrawberry		574	596	26	15	<4,5	Monómero	Mayor luminosidad pero menor estabilidad que mCherry.
J-Red		584	610	8,8	13	5	Dímero	Alto peso molecular, baja luminosidad.
DsRed-monomer		556	586	3,5	16	4,5	Monómero	Baja luminosidad.
mOrange	Naranja	548	562	49	9	6,5	Monómero	Alta luminosidad pero baja fotoestabilidad. No se debe usar cuando el medio sea de bajo pH.
mOrange2*		549	565	35	228	6,5	Monómero	Pierde luminosidad respecto a mOrange pero presenta un gran incremento en la fotoestabilidad; presenta un mayor tiempo de maduración que mOrange.
mKO		548	559	31	122	5	Monómero	Es usada en condiciones de bajo pH que las otras AFPs de la clase naranja pueden alcanzar.
mCitrine	Amarillo	516	529	59	49	5,7	Monómero	Propiedades similares a Ypet.
Venus		515	528	53	15	6	Dímero débil	Baja fotoestabilidad en comparación con las otras AFPs de su clase.
Ypet		517	530	80	49	5,6	Dímero débil	Propiedades similares a mCitrine pero presenta una mayor luminosidad.
EYFP		514	527	51	60	6,9	Dímero débil	Se considera obsoleta en comparación con las nuevas variantes dentro de esta clase.

EmGFP*	Verde	487	509	39	0,69	6	Dímero débil	Su fotoestabilidad inicial es baja dado un rápido blanqueamiento hasta que se alcanza el 50% de este; su fotoestabilidad después de los primeros segundos es comparable con la de EGFP.
EGFP		488	507	34	174	6	Dímero débil	Menor eficiencia en el plegamiento que EmGFP.
CyPet		435	477	18	59	5	Dímero débil	Menor luminosidad en comparación con Cerulean.
mCFPm	Cyan	433	475	13	64	4,7	Monómero	Menor luminosidad en comparación con Cerulean.
Cerulean		433	475	27	36	4,7	Dímero débil	Mayor luminosidad entre las AFPs de su clase.
T-Sapphire	Verde excitable con UV	399	511	26	25	4,9	Dímero débil	Es usado para experimentos de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET).

*AFPs escogidas para uso en este proyecto.

Adaptado de:

1. Shaner, et al., 2004.
2. Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005.
3. Shaner, et al., 2008.

Anexo 2. Vectores comerciales que contienen las AFPs de interés.

AFP	Vector	Observaciones
mOrange2	pmOrange2*	Vector que permite la expresión de mOrange2 en bacterias
	pmOrange2-N1	Vector diseñado para la expresión en mamíferos de una proteína de interés fusionada al extremo N de mOrange2
	pmOrange2-C1	Vector diseñado para la expresión en mamíferos de una proteína de interés fusionada al extremo C de mOrange2
mCherry	pmCherry*	Vector que permite la expresión de mCherry en bacterias
	pmCherry-N1	Vector diseñado para la expresión en mamíferos de una proteína de interés fusionada al extremo N de mCherry
	pmCherry-C1	Vector diseñado para la expresión en mamíferos de una proteína de interés fusionada al extremo C de mCherry
	pmCherry-1	Vector que requiere la inserción de un promotor funcional
	pLVX-IRES-mCherry	Vector de expresión lentiviral en células de mamífero con un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para la expresión de un gen de interés y mCherry en un mismo mRNA
	pmR-mCherry	Vector para expresión en mamíferos diseñado para coexpresar constitutivamente un miRNA de interés junto con mCherry
	pEF1 α -mCherry	Vector diseñado para la expresión constitutiva de una proteína de interés fusionada con mCherry
	pLVX-EF1 α -mCherry	Vector de expresión lentiviral en células de mamífero diseñado para la expresión constitutiva de una proteína de interés fusionada con mCherry
	pLVX-mCherry	Vector de expresión lentiviral en células de mamífero que permite marcar un proteína de interés con mCherry
	EmGFP	pRSET-EmGFP*
Vivid Colors™ pcDNA™6.2/C-EmGFP-GW/TOPO®		Vector que permite una rápida y fácil fusión de una proteína de interés a EmGFP para su expresión en mamíferos
Vivid Colors™ pcDNA™6.2/N-EmGFP-DEST		Vector que permite una rápida y fácil fusión de una proteína de interés a EmGFP para su expresión en mamíferos

*Vectores escogidos para uso en este proyecto.

Adaptado de:

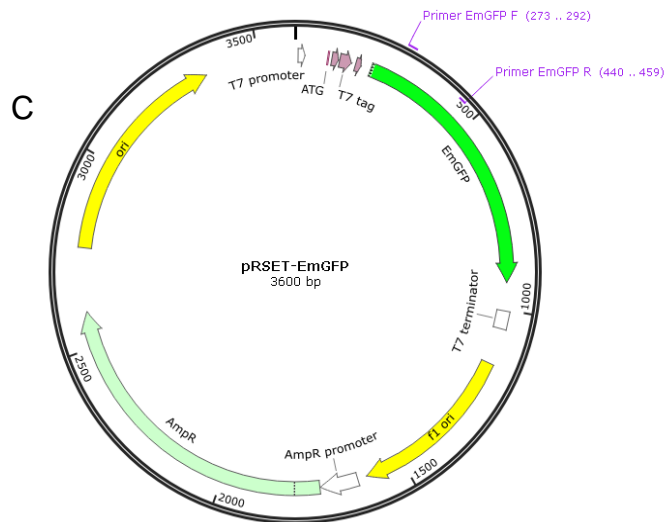
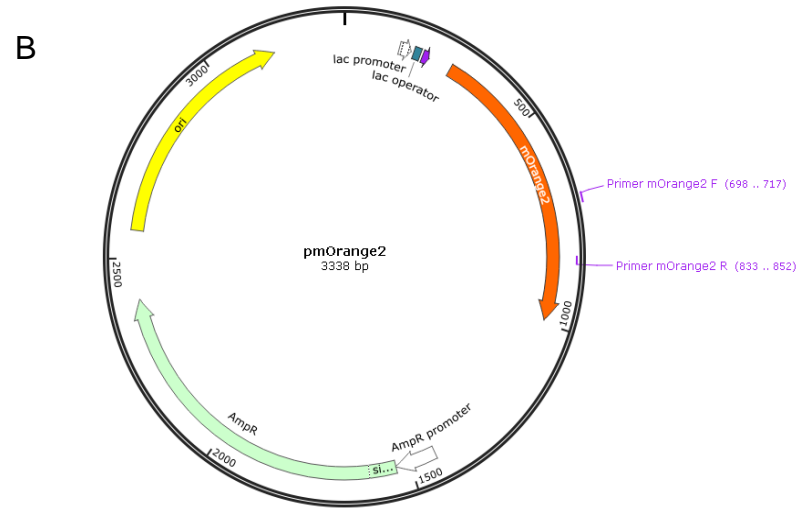
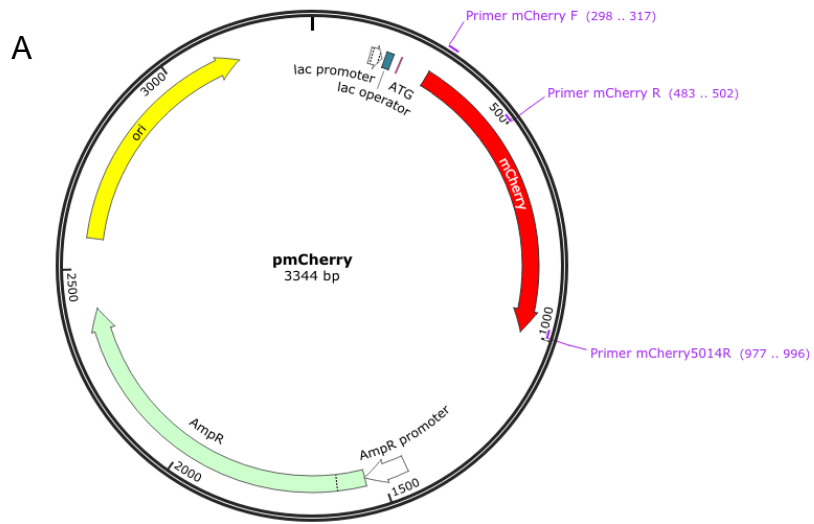
1. Clontech, 2009.
2. Invitrogen, s.f.

Anexo 3. Lista de primers usados para la amplificación de los genes de AFPs.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)	Tm (°C)	GC%	Autocomplementariedad	Autocomplementariedad en 3'	Producto esperado (bp)
mCherry2013F	AAGGGCGAGGAGGATAACAT	20	58,19	50,00	2,00	2,00	205
mCherry2013R	ACATGAACTGAGGGGACAGG	20	59,01	55,00	4,00	0,00	
mCherry2013F	AAGGGCGAGGAGGATAACAT	20	58,19	50,00	2,00	2,00	699
mCherry5514R	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	20	59,00	55,00	6,00	2,00	
mOrange22013F	CGTGATGCAGAAGAAGACCA	20	57,92	50,00	4,00	0,00	155
mOrange22013R	GCTTCTTGGCCTTGTAGGTG	20	58,83	55,00	4,00	0,00	
EmGFP2013F	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	20	59,06	50,00	4,00	1,00	187
EmGFP2013R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	20	59,13	50,00	4,00	2,00	

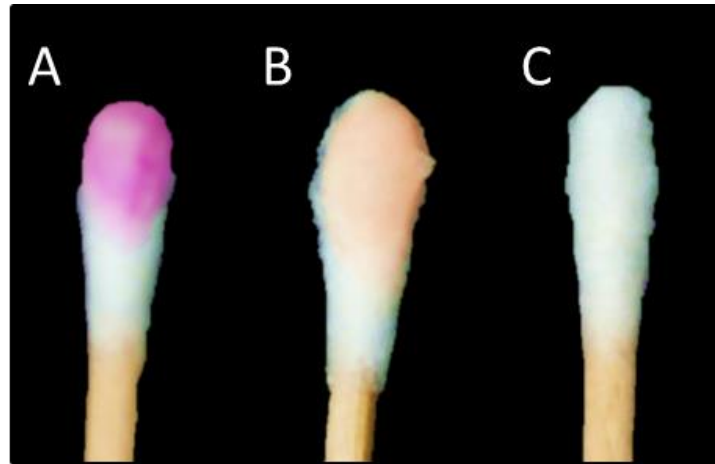
Anexo 4. Condiciones iniciales para PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 Desnaturalización inicial	96	5:00
2 Desnaturalización	94	1:00
3 Alineamiento	55	1:30
4 Elongación	72	1:00
35 ciclos de repetición de pasos 2 a 4		
5 Elongación final	72	5:00



Anexo 5. Mapas de los vectores indicando la posición de alineamiento de los primers (A) pmCherry (B) pmOrange2 y (C) pRSET-EmGFP. Todos los vectores contienen en gen de resistencia a ampicilina. Los primers a usar amplifican el gen que codifica para la AFP en cada uno de los vectores.

Anexo 6. Coloración presentada por las bacterias transformadas al ser tomadas con un hisopo. A) *E. coli* transformada con pmCherry. Resultado similar al obtenido para *Pantoea* sp. transformada con pmCherry. B) *E. coli* transformada con pmOrange2. C) Coloración normal de un hisopo limpio.



Anexo 7. Resultados de alineación de las secuencias nucleotídicas (izquierda) y de aminoácidos (derecha) de mCherry (Query) y mOrange2 (Subject).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Score	Expect	Identities	Positives	Gaps	Frame
1188 bits(643)	0.0	687/709(97%)	0/709(0%)	Plus/Plus	509 bits(1110)	3e-149	224/237(95%)	229/237(96%)	0/237(0%)	+1/+1
Query 1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAG			60	Query 1	MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNghefeiegegegeRPYEGTQTAKLKVKGGPLP				180
Sbjct 1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAG			60	Sbjct 1	MVSKGEE+NMIIKEFMRFKV MEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG QTAKLKVKGGPLP				180
Query 61	GTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC			120	Query 181	FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVVTIQDSSLQD				360
Sbjct 61	GTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC			120	Sbjct 181	FAWDILSP F YGSKAYVKHPADIPDY KLSFPEGFKWERVMN+EDGGVVVTIQDSSLQD				360
Query 121	CGCCCCCTACGAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCC			180	Query 361	GEFIYKVKLRGTNFPDGFVMQKKTIMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDA				540
Sbjct 121	CGCCCCCTACGAGGGCTTTCAGACCGCTAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCC			180	Sbjct 361	GEFIYKVKLRGTNFPDGFVMQKKTIMGWEASSERMYPEDGALKG+IK RLKLDGGHY +				540
Query 181	TTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCAC			240	Query 541	EVKTTYKAKKPVQLPGAYVNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYERAERHSTGGMDELYK*				711
Sbjct 181	TTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCATTTCACCTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCAC			240	Sbjct 541	EVKTTYKAKKPVQLPGAY V+IKLDITSHNEDYTIIVEQYERAERHSTGGMDELYK*				711
Query 241	CCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGC			300						
Sbjct 241	CCCGCCGACATCCCCGACTACTTCAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGC			300						
Query 301	GTGATGAACCTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGAC			360						
Sbjct 301	GTGATGAACCTACGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGAC			360						
Query 361	GGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA			420						
Sbjct 361	GGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA			420						
Query 421	ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGC			480						
Sbjct 421	ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGT			480						
Query 481	GCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCT			540						
Sbjct 481	GCCCTGAAGGGCAAGATCAAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACACCTCC			540						
Query 541	GAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCCCTACAACGTC			600						
Sbjct 541	GAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCCCTACATCGTC			600						
Query 601	AACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAA			660						
Sbjct 601	GACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAA			660						
Query 661	CGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGGCCATGGACGAGCTGTACAAGT 709			709						
Sbjct 661	CGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGGCCATGGACGAGCTGTACAAGT 709			709						