



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE UNA BIBLIOTECA
METAGENÓMICA DE RIZOSFERA DE PLANTAS DE TRIGO
(*Triticum aestivum* L.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Q.F.B. ROCÍO HERNÁNDEZ LEÓN

TUTOR

D.C. GUSTAVO SANTOYO PIZANO

MORELIA, MICH.

NOVIEMBRE DE 2010

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Recombinación y Diversidad Genómica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D.C. Gustavo Santoyo Pizano. Para la realización del presente estudio se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
BLAST	Herramienta de búsqueda de homologías básico local (por sus siglas en ingles Basic Local Alignment Search Tool)
Em	Eritromicina
g	Gramos
Hr	Hora
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Kb	Kilo bases
Kv	Kilo volts
Mbp	Megapares de bases
Min.	Minuto
mM	mili molar
Nal	Acido Nalidixico

NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en ingles National Center of Biotechnology Information)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (por sus siglas en ingles Plant Growth Promoting Rhizobacteria).
pH	Potencial de iones H
Seg.	Segundo
Sp	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
μl	Microlitro
°C	Grados centígrados

RESUMEN

El número de microorganismos que son cultivables del suelo representa el 1% o menos del total de la comunidad microbiana (Torsvik et al., 1990). Métodos moleculares basados en el aislamiento y análisis de ADN de muestras de suelo se han desarrollado para acceder a todo este material genómico desconocido (Daniel, 2005). Uno de estos métodos es la construcción y análisis de bibliotecas metagenómicas, las cuales son una poderosa herramienta que nos permite analizar elementos genéticos con novedosas aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se tomaron muestras de ADN metagenómico de rizósfera de plantas de trigo. Posteriormente se construyó una biblioteca metagenómica en *Escherichia coli* de 1075 clonas. Se analizaron por digestión 26 BACs y se determinó un promedio del tamaño de los insertos de 38 Kb aproximadamente. Así mismo, se analizaron las secuencias de los extremos de algunos insertos tomados al azar. Los genes implicados en el metabolismo son los más abundantes con el 33%. Las secuencias de las clases alfa y beta proteobacteria son las más abundantes dentro de las 75 secuencias analizadas. Existen genes de interés biotecnológico como la trehalosafosfato sintasa, amidohidrolasa y genes de resistencia a cromato. Por otra parte, se realizó un análisis funcional a la biblioteca y se encontraron dos clonas con actividad beta hemolítica y cuatro con actividad alfa hemolítica. En el análisis de resistencia a antibióticos se descubrió que ocho clonas mostraron resistencia a tetraciclina, siete clonas resistencia a ácido nalidixico y dos clonas con resistencia a espectinomicina. Nuestros resultados sugieren que las actividades hemolíticas, así como la expresión de genes de resistencia a antibióticos, pueden ser mecanismos de defensa en un ambiente tan competido como lo es la rizósfera de plantas. Finalmente, la construcción de bibliotecas metagenómicas es una excelente opción para descubrir genes con potencial biotecnológico.

ABSTRACT

Only 1% or less of the total community of microorganisms living in soil can be cultured in lab conditions (Torsvik et al., 1990). Uncultured and molecular methods based on DNA analysis from soil samples have been developed to discover that unknown genomic material (Daniel, 2005). One of these is the construction and analysis of metagenomic libraries, which are a powerful tool that allows us to analyze genetic elements with potential novelty biotechnological applications. In this work, metagenomic DNA samples from rhizosphere of wheat plants were isolated to subsequently construct a metagenomic library in *Escherichia coli*, comprising at this moment of 1075 clones. 26 BACs were isolated and digested to be size analyzed, and it was found an average insert size of approximately 38 Kb. On the other hand, the BAC end sequences of 75 random clones were analyzed by Blastn search homology. These results show that genes involved in central metabolism are the most abundant with 33%. The sequences of the alpha and beta proteobacteria classes also were the most abundant within the library. Some interesting genes showed high identity with trehalose fosfate synthase, amidohydrolase, chromate resistance genes, just to name a few. In a functional search analysis also revealed two clones with beta-haemolytic activity and four clones with alpha haemolytic activity. Searching for antibiotic resistance activities, it was discovered that eight clones were resistant to tetracycline, seven to nalidixic acid and two clones with resistance to spectinomycin. Our results suggest that the hemolytic activity and the expression of antibiotic resistance genes could be defense mechanisms in a highly competitive environment such as the rhizosphere of plants. Finally, the construction of metagenomic libraries represents an excellent option to discover genes with biotechnological potential.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	
1.1.	La importancia del trigo	1
1.2.	Ecología de la rizósfera de plantas	2
1.3.	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	3
1.3.1.	Mecanismos directos para promover el crecimiento vegetal	4
1.3.2.	Mecanismos indirectos para promover el crecimiento vegetal	5
1.4.	La metagenómica	5
1.5.	Bibliotecas metagenómicas	9
II.	ANTECEDENTES	
2.1.	Estudios metagenómicos en ambientes marinos	12
2.2.	Metagenómica de ambientes terrestres	13
2.3.	Metagenómica de suelos supresores de enfermedades	17
2.4.	Empleo de otros hospederos diferentes a <i>E. coli</i>	19
2.5.	Estudio sobre la diversidad metagenómica en diversos ambientes en México	19
III.	JUSTIFICACIÓN	21
IV.	HIPOTESIS	22
V.	OBJETIVOS	
5.1.	Objetivo general	23
5.2.	Objetivos particulares	23
VI.	MATERIALES Y METODOS	
6.1.	Colecta de muestras	24
6.2.	Extracción y purificación de ADN metagenómico	24

6.3.	Construcción de la biblioteca	29
6.4.	Extracción del vector de clonación (BAC)	31
6.5.	Liberación de los fragmentos clonados	32
6.6.	Determinación de las actividades hemolíticas	32
6.7.	Determinación de las actividades de resistencia a antibióticos	33
6.8.	Purificación de los vectores de clonación (BAC) para secuenciación	33
VII.	RESULTADOS	
7.1.	Análisis físico-químico del suelo	34
7.2.	Aislamiento y digestión del metagenoma de rizósfera de trigo	35
7.3.	Construcción de la biblioteca metagenómica de trigo y determinación del tamaño promedio de los insertos	36
7.4.	Secuenciación y análisis de los insertos clonados	37
7.5.	Análisis funcional de la biblioteca metagenómica	43
7.6.	Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) a las clonas con actividad hemolítica	45
7.7.	Aislamiento de BACs de clonas con resistencia a antibióticos	46
VIII.	DISCUSIÓN	47
IX.	RESUMEN DE RESULTADOS	54
X.	CONCLUSIÓN	55
XI.	PERSPECTIVAS	56
XII.	PUBLICACIONES	57
XIII.	LITERATURA CITADA	58

I.INTRODUCCIÓN

1.1. LA IMPORTANCIA DEL TRIGO.

La industria agroalimentaria se puede ver perjudicada o beneficiada debido a la interacción de las especies vegetales que se cultivan y los microorganismos que viven cerca de la raíz, incluyendo el cultivo de trigo.

El trigo es una planta de la familia de las gramíneas, de la cual existe un gran número de variedades. Sin embargo los más utilizados son el *Triticum durum* y el *Triticum compactum*. El trigo harinero de la especie *Triticum aestivum* es el cereal panificable más cultivado en el mundo.

Su domesticación ha mejorado el rendimiento y la productividad, la alteración significativa de su fisiología, su desarrollo y morfología (Shewry, 2009). Por esta razón es objeto de estudio, además de que los investigadores analizan las mejores maneras de cultivarlo. Así, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), destaca su importancia como nutriente de la humanidad.

El consumo per cápita se estima en 50 kilogramos por año y forma parte de la dieta del mexicano sobre todo en forma de pan y galletas, del trigo se obtienen dos subproductos muy importantes; el salvado o cáscara de trigo, que aporta fibra y por tanto se usa mucho como suplemento de ésta, tanto directamente como formando parte de concentrados comerciales.

En México se siembra una superficie de trigo de aproximadamente 930 000 hectáreas, donde se producen cerca de cuatro millones de toneladas anuales, ocupando el tercer

lugar en volumen de producción de granos, después del maíz y el sorgo. En el estado de Michoacán en el 2009 se cultivaron 36,402 hectáreas con una producción de 183,544 toneladas y un valor de producción de más de 483 millones de pesos (SAGARPA). Lo anterior nos destaca la importancia que tiene el trigo como parte fundamental de la dieta del hombre en el mundo, así como su importancia económica.

1.2. ECOLOGÍA DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS.

La rizósfera se define como la región del suelo que rodea y se ve influenciada por la raíz de las plantas (Atlas y Bartha, 1998). En este microambiente reside una gran diversidad microbiana donde se llevan a cabo diversas interacciones, ya sean benéficas, neutrales o perjudiciales con factores bióticos o abióticos (Ahmad *et al.*, 2006). Dentro de las interacciones abióticas, la estructura de las comunidades microbianas se pueden ver influenciadas por factores como la temperatura, el tipo de suelo, el pH, la humedad, entre otros (Fierer y Jackson, 2006). Así mismo, existen diversas interacciones ecológicas entre los microorganismos y la planta, así como entre los mismos microorganismos, ya sean patógenos o aquellos que son benéficos para la salud vegetal (Figura 1).

Se sabe que los microorganismos han evolucionado diversos mecanismos que pueden ser exitosos en la ocupación de espacios, y así, obtener nutrientes excretados por la raíz de la planta. Por ejemplo, diferentes especies bacterianas (*Pseudomonas*, *Burkholderia*) y de hongos (*Penicillium*, *Aspergillus*) sintetizan y excretan compuestos quelantes de hierro (sideróforos), antibióticos y bacteriocinas (Weller *et al.*, 2002; Haas y Keel, 2003; Validov *et al.*, 2005; Krishnan *et al.*, 2007).

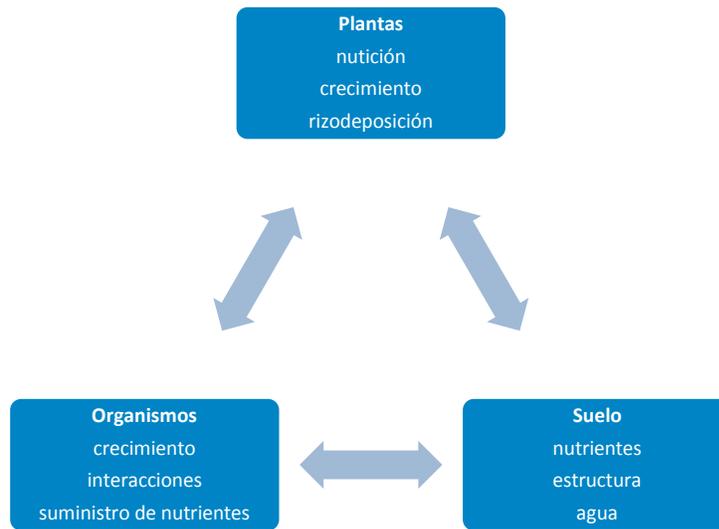


Fig. 1. Interacciones y actividades suceden entre factores bióticos y abióticos en la rizósfera de plantas.

1.3. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

Existen diversas especies bacterianas que son conocidas como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), las cuales son habitantes comunes de la rizósfera. (Ahmad, *et al.*, 2006). Estas incluyen géneros como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*, por mencionar algunos (Barea, *et al.*, 2005; Ahmad, *et al.*, 2006; Valencia-Cantero, *et al.*, 2007).

El término PGPRs refiere a las bacterias asociadas a las raíces de las plantas (“rizósfera”) que son capaces de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper y Schroth, 1978). Los mecanismos pueden ser diversos; por ejemplo, ya sea que mejoren la nutrición de la plantas solubilizando nutrientes, o debido a la producción de reguladores de crecimiento vegetal, así como también por prevenir o inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. Las PGPR varían en su grado de asociación con la planta; existen aquellos

que pueden penetrar el tejido vegetal y vivir de forma intracelular, también se conocen aquellos microorganismos que viven asociados a la raíz y por lo tanto viven de forma libre en la rizósfera (Gray y Smith, 2005). Desde hace tiempo se han estudiado algunas bacterias u otro tipo de microorganismos PGPR que se les ha encontrado un uso en la agricultura, por lo que están disponibles comercialmente como inoculantes (Lucy *et al.*, 2004).

Se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluyen efectos de acción directos o indirectos de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

1.3.1. MECANISMOS DIRECTOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL

En los efectos directos, los metabolitos producidos por la bacteria son capaces de estimular el crecimiento de la planta. Han sido reportadas PGPRs que mejoran directamente el crecimiento de plantas por una variedad de mecanismos: la fijación del nitrógeno atmosférico que se transfiere a la planta, la producción de sideróforos que quelan el hierro y lo hacen disponible para la raíz de la planta, la solubilidad de los minerales como el fósforo, y la síntesis de fitohormonas (Glick 1995), mejora directamente la absorción de minerales debido a los aumentos en los flujos de iones específicos en la superficie de la raíz en la presencia de PGPR también se ha reportado (Bashan y Levanoni., 1991; Bertrand *et al.*, 2000). Líneas de PGPR pueden utilizar uno o más de estos mecanismos en la rizosfera. Los enfoques moleculares utilizando mutantes microbianos y de plantas alteradas en su capacidad de sintetizar o responder a las fitohormonas específicas han aumentado nuestra comprensión de la función de la síntesis de fitohormonas como un mecanismo directo de la mejora del crecimiento vegetal por PGPR (Glick 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003) además, se han identificado PGPR

que sintetizan auxinas y citoquininas (Glick 1995; García de Salamone *et al.*, 2001; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

1.3.2. MECANISMOS INDIRECTOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL.

En los efectos indirectos, la bacteria podría libera algún metabolito que a su vez afecta a otros factores rizosféricos y se manifiestan en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta, por ejemplo la producción de antibióticos y antifúngicos capaces de controlar bacterias y hongos fitopatógenos.

Las bacterias PGPR que estimulan el crecimiento de plantas a través de la supresión de fitopatógenos lo hacen por una variedad de mecanismos. Estos incluyen la capacidad de producir sideróforos que quelan el hierro, por lo que no está disponible a los patógenos, la capacidad de sintetizar metabolitos como los antibióticos, las enzimas celulares que lisan la pared de los hongos, o el cianuro de hidrógeno, que suprimen el crecimiento de hongos patógenos, la capacidad de competir con éxito con los patógenos por los nutrientes o nichos específicos en la raíz, y la capacidad de inducir resistencia sistémica (Glick., 1995; Bloemberg *et al.*, 2001; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). La bioquímica y el enfoque molecular están proporcionando una nueva visión de la base genética de estos rasgos, las vías de biosíntesis involucradas, su regulación, y la importancia para el control biológico en estudios de laboratorio y de campo (Bowen y Rovira., 1999; Bloemberg y Lugtenberg., 2001; Glick., 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

1.4. LA METAGENÓMICA

Hoy en día, una de las estrategias más ampliamente adoptadas para estudiar la diversidad microbiana es la investigación metagenómica. El metagenóma se define como el total de la composición genética de las comunidades microbianas de un medio

ambiente. La frase “metagenoma del suelo” se utilizó por primera vez por Handelsman *et al.* (1998) para describir el genoma colectivo de la microflora del suelo. En el área de ecología microbiana, el término “metagenómica” es ahora sinónimo de aplicación independiente de cultivo de técnicas genómicas para el estudio de los microbios y las comunidades en sus ambientes naturales (Chen y Pachter., 2005). Para su estudio, se basa en el aislamiento directo del ADN total de una muestra ambiental, así como la construcción de bibliotecas con vectores y la amplificación de genes como los 16S ribosomales que ayudan a conocer la diversidad de dicho ambiente y el análisis general basado en métodos masivos de secuenciación (Santos Pontes *et al.*, 2007). En la figura 2 se describe de manera general el proceso de análisis del metagenoma de una muestra ambiental.

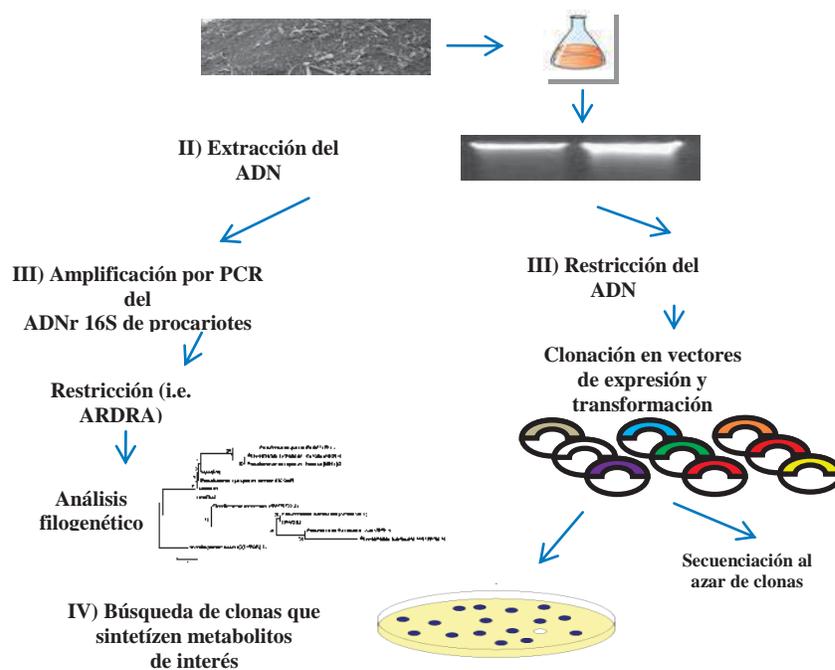


Fig.2. Pasos estándar de un análisis metagenómico. Basado en el aislamiento de ADN total de una muestra ambiental, por una parte, la construcción de bibliotecas con vectores y el análisis general mediante métodos masivos de secuenciación y por la otra la amplificación de genes 16S ribosomales y el análisis filogenético.

La Metagenómica es una ciencia reciente que surgió como reacción a la observación de que la mayoría de los microorganismos en la tierra son difíciles de cultivar en el laboratorio. Una estimación que a menudo se cita es que, hasta un 99% de la vida microbiana sigue siendo no cultivable. La Metagenómica explota el hecho de que mientras que algunos microorganismos son cultivables y otros no lo son, todos ellos (es decir el 100%) tienen una forma de vida basada en el ADN como portador de información genética. La metagenómica como herramienta permite acceder, almacenar y analizar este ADN, y puede servir para alcanzar conocimientos de la biología y evolución de los microorganismos del medio ambiente independientemente de su condición cultivable (Hernández-León, *et al.*, 2010).

Podemos utilizar las secuencias metagenómicas para ayudar a entender la complejidad de las comunidades microbianas y como las bacterias interactúan dentro de estos nichos (Figura 3). Las bacterias en diversos entornos naturales pueden ser una fuente química compleja de muchos compuestos biodinámicos sin descubrir, con un potencial para la bioprospección, el descubrir nuevos antibióticos, enzimas, y proteínas con novedosas o mejores actividades catalíticas. De esta manera, se han identificado a partir de diversas bibliotecas de suelo, diferentes compuestos como los antibióticos turbomicina A y B, actividades de lipasa, amilasa, nucleasa, entre otras con interés biotecnológico. (Guillespie *et al.*, 2002; Riesenfeld *et al.*, 2004; Rondon *et al.*, 2000).

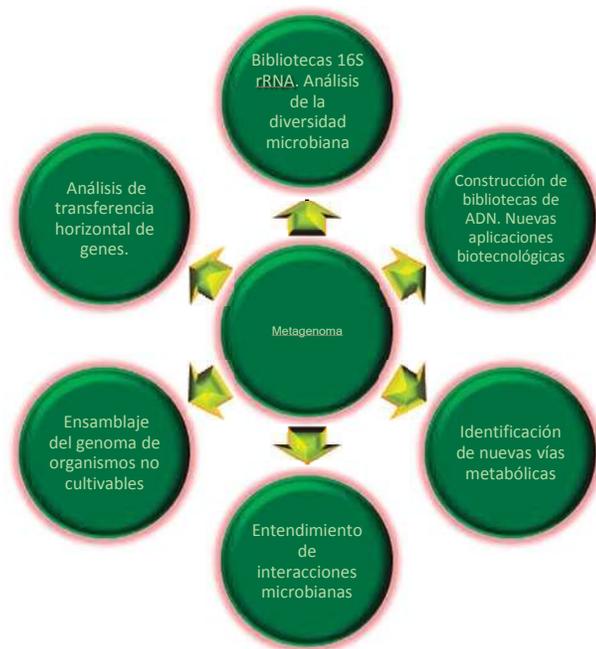


Fig. 3. Aplicaciones de los estudios metagenómicos.

Por tal motivo, la construcción de bibliotecas metagenómicas es una opción importante para tener acceso a todo este material genético que podría codificar para la síntesis de nuevos metabolitos (Handelsman, 2004; Hernandez-León *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha reportado que bacterias patógenas de humanos pueden ser parte de la comunidad rizosférica (Rainey, 1999; Paulsen *et al.*, 2005; Valencia Cantero *et al.*, 2004). Incluso, se han reportado actividades de tipo hemolítico en bibliotecas metagenómicas de suelos abiertos (Rondon *et al.*, 2000). De esta manera, se ha propuesto que los microorganismos del suelo son la principal fuente de aislamiento y descubrimiento de diversos metabolitos, así como de otros compuestos químicos relevantes (Handelsman *et al.*, 1998).

1.5. BIBLIOTECAS METAGENÓMICAS

Las bibliotecas pueden ser clasificadas en dos grupos con respecto al promedio de tamaño de inserto: Bibliotecas de inserto pequeño en plásmidos (menos de 15Kb) y bibliotecas de inserto grande en cósmidos y fósmidos (ambos arriba de 40 Kb) o vectores tipo BAC (más de 40 Kb) (Daniel, 2005) Tabla 1.

Tabla 1. Pros y contras de bibliotecas de suelo de inserto pequeño e inserto grande.

Ventajas	Desventajas
Bibliotecas de inserto pequeño (plásmidos)	
Alto número de copias que permite la detección de genes expresados ampliamente	Tamaño de inserto pequeño
Expresión de genes a través del promotor del vector	Se debe analizar un gran número de clonas para obtener positivas
Es posible la clonación de ADN fracturado o contaminado con sustancias del suelo	No es factible para la clonación de grandes grupos de genes
Es técnicamente fácil	
Biblioteca de inserto grande (cósmidos, fósmidos, BACs)	
Tamaño de inserto grande	El bajo número de copias puede frenar la detección de genes expresados ampliamente
Un número pequeño de clonas puede ser analizado para obtener positivas	Expresión limitada de genes por el promotor del vector
Es posible clonar actividades enzimáticas o vías que sean codificadas por grupos grandes de genes	Se requiere ADN de alto peso molecular y gran pureza para la construcción de la biblioteca
Es posible la caracterización genómica parcial de microorganismos no cultivables del suelo	Técnicamente difícil

Las bibliotecas de inserto pequeño son usadas para el aislamiento de genes solos o de operones pequeños que codifican nuevas funciones metabólicas, por otra parte, las bibliotecas de inserto grande son más apropiadas para recuperar vías complejas que son codificadas por grandes grupos de genes o fragmentos grandes de ADN para la caracterización de genomas de microorganismos de suelo no cultivables (Daniel 2005).

Las clonas pueden ser analizadas con marcadores filogenéticos como los genes RNAr 16S y *recA*, con otros genes conservados por hibridación, PCR, por la expresión de tratamientos específicos como actividad enzimática, producción de antibióticos o pueden ser secuenciadas al azar y saber qué tipo de material genético se ha clonado (Handelsman, 2004).

Tabla 2. Aplicaciones de trabajos metagenómicos realizados.

Aplicaciones	Objetivo	Ejemplos	Referencias
Construcción de bibliotecas de ADN	Nuevas aplicaciones biotecnológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Construcción de bibliotecas de metagenoma de suelo en Madison Wisconsin. • Construcción de una megabiblioteca de ADN de suelo del desierto de Utah. 	<p>Rondon <i>et al.</i>, 2000.</p> <p>Jacob <i>et al.</i>, 2008.</p>
Amplificación <i>in situ</i>	Identificación de nuevas vías metabólicas	<ul style="list-style-type: none"> • Detección <i>in situ</i> de elementos de resistencia a antibióticos en las esporas de <i>Bacillus cereus</i>. 	Laflamme <i>et al.</i> , 2009.

Bibliotecas 16S rDNA	Análisis de diversidad microbiana	<ul style="list-style-type: none"> Análisis de bacterias rizosféricas de trigo en Argentina. Análisis de endófitos en tallo y raíz en China. 	Fischer <i>et al.</i> , 2007. Tian <i>et al.</i> , 2006.
Quorum sensing	Entendimiento de interacciones microbianas cel-cel	<ul style="list-style-type: none"> Clonación e identificación de gen <i>qlcA</i> que codifica una actividad de NAHL a partir del metagenoma de bacterias de suelo de pastura en Francia. Aislamiento y caracterización de tres clonas derivadas de metagenoma que interfieren con QS bacteriano. 	Riaz <i>et al.</i> , 2008. Riaz <i>et al.</i> , 2008.
Genómica de célula simple	Ensamblaje de organismos no cultivables	<ul style="list-style-type: none"> Drenaje ácido de la mina de Richmond. Secuenciación de cerca de un millón de pares de bases en el mar Sargasso. 	Bond <i>et al.</i> , 2000. Venter <i>et al.</i> , 2004.
Metagenómica móvil	Análisis de transferencia horizontal de genes	<ul style="list-style-type: none"> Análisis del retrotransposón ruta 66 en genomas completos de maíz, sorgo y trigo. 	Roulin <i>et al.</i> , 2009.

II. ANTECEDENTES

2.1. ESTUDIOS METAGENÓMICOS EN AMBIENTES MARINOS

Los pioneros en el campo de la metagenómica fueron Schmidt *et al.* 1991, ellos estudiaron la diversidad filogenética de una comunidad de fitoplancton marino oligotrófico en una zona del Océano Pacífico. Su protocolo original involucró el aislamiento de ADN genómico de fitoplancton recogidos por filtración de flujo tangencial, la fragmentación por tamaño (10-20kb) y la clonación del ADN mezclado de la población en el bacteriófago lambda. La biblioteca resultante de la recombinación de fagos por hibridación con sondas de ADNr 16S, la secuencia 16S ADNr amplificadas por PCR de clonas positivas y el análisis de la secuencia de ADN a partir de clonas únicas en las bases de datos para revelar alguna de la diversidad no cultivable en la vida fitoplanctónica del Océano Pacífico (Schmidt *et al.*, 1991).

Venter *et al* en el 2004 aplicando la secuenciación shotgun para poblaciones microbianas recogidas en masa a partir de muestras de agua del Mar de los Sargazos (Tabla 2), cerca de las Bermudas, generó un total de 1045 millones de pares de bases de secuencias no redundantes, anotadas y analizadas para dilucidar el contenido de genes, y la diversidad y abundancia relativa de los organismos dentro de estas muestras ambientales (Venter *et al.* 2004). Estos datos se estima que derivan de al menos 1800 especies basadas en secuencias, incluyendo 148 nuevos filotipos bacterianos. En sus resultados también han logrado identificar más de 1,2 millones de nuevos genes representados en estas muestras, incluyendo más de 782 nuevos fotorreceptores de la rodopsina. Una característica común de los proyectos de secuenciación shotgun del

medio ambiente es la increíble cantidad de datos que se generan (Schloss y Handelsman 2005). El proyecto del Mar de los Sargazos solo, produjo 2 millones de secuencias de lecturas, o 1.600 Mbp de la secuencia de ADN (Venter *et al.*, 2004).

En esta explosión de datos de secuencias del medio ambiente, varios autores (DeLong., 2004; Handelsman., 2005) se refieren a la metagenómica como “megagenómica” o “mega-metagenómica” respectivamente. Esta “genómica a gran escala” plantea considerables desafíos para la recopilación de datos y anotaciones. El exitoso montaje y lectura de los distintos “contigs” es inversamente proporcional a la complejidad de la comunidad procariota de la cual el ADN se originó.

2.2. METAGENÓMICA DE AMBIENTES TERRESTRES

Los métodos de aislamiento del ADN para los suelos y los sedimentos se basan tanto en la recuperación de las células bacterianas y la lisis posterior o en la lisis directa de células de la muestra seguida de la purificación de ADN. Por ejemplo, para el aislamiento de las enzimas a partir de una muestra del medio ambiente el procedimiento es: enriquecer, aislar y analizar una amplia variedad de microorganismos para la actividad enzimática deseada. La enzima se recupera del organismo identificado, un enfoque alternativo es usar la diversidad genética de los microorganismos en un determinado entorno en su conjunto para encontrar genes previamente desconocidos y productos de los genes para diversos fines.

En 1999, Henne *et al.*, construyeron tres bibliotecas de ADN ambiental a partir de tres muestras diferentes de suelo. Las clonas recombinantes fueron analizadas para identificar la presencia de genes que confirieran la utilización de 4-hidroxibutirato, se obtuvieron 36

clonas positivas en el análisis inicial, cinco de ellas conteniendo el plásmido recombinante que confiere el fenotipo positivo para 4-hidroxiacetato, siendo capaces de utilizar como única fuente de energía al carbono del 4-hidroxiacetato y mostrando una actividad de 4-hidroxiacetato deshidrogenasa. (Hanne *et al.*, 1999).

Rondon *et al* en el 2000 utilizando un cromosoma artificial bacteriano como vector (BAC) construyeron dos bibliotecas de ADN metagenómico aislado directamente de suelo en *Escherichia coli*. El análisis filogenético de las secuencias del gen de RNAr 16S de una de las bibliotecas indicó que contiene una alta diversidad de organismos microbianos. El análisis inicial identificó varias clonas que expresan genes heterólogos, confirmando que los vectores BAC pueden ser usados para mantener, expresar y analizar ADN ambiental. Los fenotipos expresados por estas clonas incluyeron actividades, antibacterianas, lipasas, amilasas, nucleasas y hemolíticas (Rondon *et al.*, 2000).

En el 2002 Gillespie *et al* identificaron en las mismas bibliotecas tres clonas productoras de un polímero tipo melanina que les brindaba una coloración café, el cual fue caracterizado, dando como resultado el descubrimiento de los antibióticos Turbomicina A y Turbomicina B. Posteriormente fueron aislados y se determinó su estructura. Se sintetizaron los compuestos antibióticos y se observó que tanto los productos naturales como sintéticos fueron activos al inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *S. aureus*, teniendo la misma concentración mínima inhibitoria (Gillespie *et al.*, 2002)

Por medio de la metagenómica también es posible la reconstrucción de genomas completos a partir de organismos no cultivables o desconocidos. Tal es el caso del estudio realizado en la Mina Richmond de California, donde se encontró una limitada diversidad microbiana, conformada principalmente por los géneros bacterianos *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y *Acidimicrobium*, además de la especie bacteriana,

Ferroplasma acidarmanus. Cabe destacar que la mina tiene un pH de 0 a 1, contiene altos niveles de Fe, Zn, Cu y As, el agua tiene poco oxígeno y su temperatura es de 42 °C. Adicionalmente las únicas fuentes de carbono y nitrógeno sólo son en forma de gases. Estas condiciones ambientales son extremas para cualquier tipo de vida microbiana; sin embargo, para estudios metagenómicos son perfectas e interesantes, debido a que la limitada diversidad bacteriana encontrada permitió la reconstrucción casi total de los genomas de *Leptospirillum* grupo II y *Ferroplasma* tipo II. En consecuencia, se reportaron diversos genes que codificaban para resistencia a metales pesados y bombas de expulsión de protones. Lo anterior muestra la adaptación que han tenido estos organismos a estos ambientes extremos, siendo la metagenómica muy importante para acceder al conocimiento de estos genomas no cultivables en laboratorio (Tyson *et al.*, 2004).

Existen otros estudios metagenómicos, tales como la secuenciación completa de una bacteria del género *Buchnera*, un endosimbionte de áfidos (Pérez-Brocal *et al.*, 2006), metagenómica del intestino (Gill *et al.*, 2006) y dentadura de humanos (Rudney *et al.*, 2010), entre otros. Además mediante la metagenómica se pudo reconstruir en gran parte el genoma del mamut, una especie extinta (Poinar *et al.*, 2006). Lo anterior nos muestra el potencial que tienen los estudios metagenómicos, y que pronto veremos más publicaciones que generarán un mayor conocimiento de los más diversos ambientes, incluyendo aquellos relacionados con el suelo.

Hasta la fecha, dos categorías de actividades biológicas se han detectado en bibliotecas metagenómicas de suelo: enzimática y antibiótica. En cada uno de los estudios que se resumen en la tabla 3, se extrajo el ADN por el método de lisis directa, se clonó y se expresó en *E. coli*. En algunos casos, las secuencias fueron completamente nuevas. El

producto de los siguientes genes que se expresaron de forma heteróloga fueron: indirrubina, violaceina y deoxiviolaceina, derivados de tirocina y Turbomicina A y B.

Tabla 3. Principales actividades biológicas encontradas en trabajos metagenómicos.

Vector	Hospedero	Actividad biológica	Método de detección	Referencia
Plásmido				
pBluescript SK ⁺	<i>E.coli</i> DH5 α	Transportadores Na ⁺ /H ⁺	Complementación de la cepa deficiente en el antiportador.	Majernik <i>et al.</i> 2001
pBluescript SK ⁺	<i>E.coli</i> DH5 α	Lipasa	Halos naranja en agar LB+trioleina+rhodminaB	Henne, <i>et al.</i> 2000
pBluescript SK ⁺	<i>E.coli</i> DH5 α	Esterasa 4-Hidroxobutirato deshidrogenasa	Halos claros en agar LB + tributirina Cajas con indicador Tetrazolium y 4-hidroxobutirato como única fuente de carbono	Henne, <i>et al.</i> 1999
BAC				
pBeloBAC11	<i>E. coli</i> DH10B	Lipasa Amilasa	Halos claros en agar LB+Bactolípidos Halos naranja en agar almidón con solución de yodo	Rondon <i>et al.</i> 2000
pBeloBAC11	<i>E. coli</i> DH10B	DNAsa Hemolisinas Antibacterial	Halos naranja en agar verde de metilo. Halos claros en agar sangre. Producto de la purificación de los genes con hemolisis y pigmento café en agar LB	Gillespie <i>et al.</i> 2002, Rondon <i>et al.</i> 2000
pBTP2	<i>E. coli</i> DH10B	Antibacterial	Zonas de inhibición en agar con <i>Bacillus subtilis</i>	MacNeil <i>et al.</i> 2001
Cósmido				
SuperCos I	<i>E. coli</i>	Antibacterial	Producto de la purificación de los genes con pigmento azul	Brady, <i>et al.</i> 2001
SuperCos I	<i>E. coli</i> XL1	Anibacterial	Zonas de inhibición en agar con <i>Bacillus subtilis</i>	Brady, <i>et al.</i> 2000

2.3. METAGENÓMICA DE SUELOS SUPRESORES DE ENFERMEDADES

Un suelo supresor es aquel en el cual el patógeno no consigue condiciones ideales para establecerse o persistir. También se puede hablar de aquel suelo donde ciertas enfermedades vegetales no progresan, incluso si el fitopatógeno está presente (Van Elsas et al., 2008). Si bien el patógeno puede encontrarse y persistir en el suelo, sus ataques no provocan daños o enfermedades importantes. En gran parte, debido a los microorganismos benéficos que son los responsables de inhibir dichas enfermedades (Steinberg 2006; Van Elsas et al., 2008). Estos suelos tienen microorganismos (Hongos, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y Levaduras) productores de elementos protectores contra fungosis, bacteriosis, virosis e insectos plaga. Se pueden mencionar diferentes factores; sin embargo, la gran diversidad de compuestos inhibitorios o antibióticos sintetizados en estos suelos juega un papel fundamental en dicha capacidad supresora. Las principales características bióticas de los suelos supresivos naturales o inducidos son las altas tasas de actinomicetos y un elevado potencial de metabolismo y cometabolismo de los agentes vivos necesarios para la alta productividad de las tierras de cultivo. Algunos mecanismos de control son: Parasitismo directo y muerte del patógeno, competencia rizósferica con el patógeno por el alimento y espacio, efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de liberación de sustancias antibióticas o aleloquímicas (Ac.Orgánicos, aminoácidos y azúcares específicos, sideroforos, antibióticos), inducción de resistencia sistémica de la planta.

Las enzimas líticas producidas por los PGPR son del tipo Hidrolasa (degradan las paredes celulares de los hongos patógenos), las quitinasas (degradan la quitina de los hongos e insectos fitopatógenos), las proteasas (bacteriocinas), glucanasas (viricidas, micocidas, insecticidas). Las enzimas detoxificantes degradan enzimas consideradas

factores de patogenicidad (cutinasa, endo y exo-poligalacturonasas, esterases, liasas, proteasas, etc). Con ello se controlan las primeras etapas del ataque de hongos a los tejidos de las plantas. Pero uno de los mayores efectos positivos de la producción de sustancias aleloquímicas de las rizobacterias antagonistas mencionadas son los de degradación de las señales autoinducidas de los patógenos (Quorum Sensing), bloqueando así la expresión de numerosos genes de patogenicidad producidos por varias especies de hongos y bacterias.

Por tal motivo, se ha propuesto y desarrollado recientemente un proyecto internacional para explorar los suelos supresores en diversas regiones del planeta, en busca de nuevos antibióticos y otros compuestos antimicrobianos, con un enfoque metagenómico. Actualmente el proyecto se conoce como METACONTROL Project (Van Elsas et al., 2008) e inició en el año 2002 como colaboración entre laboratorios, principalmente de Europa. Hasta el momento se pueden mencionar algunos resultados, ya que se han reportado el descubrimiento de diversas moléculas que muestran actividades antagonistas hacia diversos patógenos, tales como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. y *Pythium ultimum* (Courtois et al., 2003; Ginolhac et al., 2004; Van Elsas 2010). Diferentes clonas de bibliotecas metagenómicas construidas se han analizado por secuenciación y han mostrado similitud a genes que codifican poliquetido sintetasas y quitinasas. Algunos de estos genes codifican para nuevos antibióticos poliquetidos (Van Elsas et al., 2008). Sin duda se espera que en años siguientes se den mayores resultados en este tipo de mega proyectos, donde de manera importante convergen diversas instituciones en un mismo objetivo: desarrollar a través de la metagenómica nuevos métodos de biocontrol de fitopatógenos, aprovechando la diversidad microbiana de suelos supresores de enfermedades.

2.4. EMPLEO DE OTROS HOSPEDEROS DIFERENTES A *E. coli*

Uno de los hospederos más usados en la metagenómica es la bacteria *E. coli*, que por su versatilidad genética y otros factores es un huésped idóneo para la expresión heteróloga de ADN. Sin embargo, es también una limitante para la expresión de algún tipo de proteína que requiera de ciertos factores metabólicos, genéticos o que simplemente sean tóxicos para *E. coli* (Wang et al., 2000). De hecho, algunos trabajos muestran que genes que producen ciertos compuestos naturales que no pueden ser sintetizados en *E. coli*, si se producen en otros huéspedes, tales como la bacteria *Ralstonia metallidurans* (Craig et al., 2009). Por todo esto, se han construido bibliotecas metagenómicas en hospederos diferentes a *E. coli*, tal como *Streptomyces* spp. (Wang et al., 2000; Craig et al., 2009). Además que, conforme se generen mayores datos metagenómicos, se podrá disponer de nuevos hospederos que permitan la expresión de una mayor diversidad de elementos genéticos.

2.5. ESTUDIOS SOBRE LA DIVERSIDAD METAGENOMICA EN DIVERSOS AMBIENTES EN MÉXICO

La filogenia de las poblaciones de procariontes en diez muestras de agua tomadas de la cuenca de Cuatro Ciénegas y dos valles vecinos, así como de tres muestras de sedimentos húmedos, se determinó mediante la caracterización de los organismos cultivados y mediante amplificación por PCR y secuenciación de los genes 16S ARNr del ADN total de la comunidad. La composición de las comunidades microbianas también se evaluó mediante la determinación de los perfiles de los polimorfismos terminales de sitio de restricción de los genes 16S ARNr en el ADN total de la comunidad, encontrándose 250 filotipos diferentes entre las 350 cepas cultivadas. Se obtuvieron y clasificaron

noventa y ocho secuencias parciales del gen 16S ARNr, donde, los clones representaron 38 filotipos únicos de diez grandes linajes de Bacterias y uno de Arqueas. (Souza et al., 2006; Desnues et al., 2008).

En otro trabajo, se analizó la diversidad bacteriana asociada a un biofilm corrosivo en una tubería de acero del Golfo de México utilizada para inyectar agua marina en el depósito de aceite. Varias bacterias aerobias y heterótrofas fueron aisladas e identificadas por el análisis del gen 16S ARNr. El ADN metagenómico fue extraído, se realizó un análisis de electroforesis en un gel con gradiente de desnaturalización de los genes ribosomales y se construyó una biblioteca metagenómica de genes ribosomales 16S encontrándose una diversidad bacteriana limitada. La mayoría de las especies detectadas en la biblioteca o aisladas de la tubería fueron asignadas a la clase Proteobacteria (*Halomonas* spp. *Idiomarina*, *Marinobacter aquaeolei*, *Thalassospira*, *Silicibacter*, *Chromohalobacter* sp.) y Bacilos (*Bacillus* spp. y *Exiguobacterium* spp.). Este es el primer informe que asocia algunas de estas bacterias con un biofilm corrosivos (López 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

La gran mayoría los microorganismos que se analizan en una muestra ambiental no son cultivables. Por lo tanto, se necesitan emplear nuevas metodologías que nos permitan acceder a todo este material genómico desconocido. De esta manera, la construcción y análisis de bibliotecas metagenómicas son una poderosa herramienta que nos permite analizar elementos genéticos que podrían contener novedosos o mejores genes que codifiquen para diversas aplicaciones biotecnológicas.

IV. HIPÓTESIS

La construcción de una biblioteca metagenómica de rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) permite la identificación de nuevos genes con posible aplicación biotecnológica.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Construir y realizar un análisis funcional de una biblioteca metagenómica de rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.).

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir y caracterizar una biblioteca metagenómica de rizósfera de plantas de trigo.
- Determinar el promedio del tamaño de los insertos clonados.
- Determinar las funciones codificantes de las secuencias clonadas.
- Realizar un análisis funcional en busca de actividades hemolíticas y de resistencia a antibióticos de la biblioteca.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. COLECTA DE MUESTRAS

Se tomaron las muestras de suelo proveniente de la rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) de la región de Zamora, Michoacán a una profundidad de 10 cm. Posteriormente se transportaron en bolsas estériles y se mantuvieron en hielo hasta conservarse a 4°C. Dichas muestras de suelo fueron enviadas al INIFAP-Celaya para su análisis físico-químico.

6.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN METAGENÓMICO

Para aislar el ADN metagenómico de la rizósfera de trigo se emplearon dos métodos:

1) Mediante un kit de extracción Power Soil DNA Kit marca MO BIO, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

1.- Añadir a los tubos Power Bread 0.25 g de muestra de suelo

Después de que la muestra ha sido cargada en el tubo Power Bread, el siguiente paso es el proceso de homogenización y lisis. El tubo Power Bread contiene un buffer que: a) ayuda a dispersar las partículas del suelo, b) comienza a disolver los ácidos húmicos y c) protege los ácidos nucleicos de la degradación.

2.- se mezcló en vortex.

3.- Se revisó la solución C1. Si la solución C1 se encuentra precipitada, se coloca la solución a 60°C hasta que el precipitado se haya disuelto.

La solución C1 contiene SDS y otros agentes de ruptura requeridos para la lisis celular completa. Además de ayudar en la lisis celular, el SDS es un detergente aniónico que precipita ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de muchos organismos. Si hace frío se formará un precipitado blanco en la botella. Colocarla a 60°C disolverá el SDS y no dañará el SDS u otros agentes de rompimiento. La solución C1 puede ser usada mientras esta todavía caliente.

4.- Se añadieron 60 μ l de solución C1 y se mezcló por inversión varias veces o ligeramente en el vortex.

5. Se aseguraron los tubos Power Bread horizontalmente usando un soporte adaptador para vortex MO BIO. Se agitó en vortex a máxima velocidad por 10 min.

Nota: El paso de agitación en vortex es crítico para la completa homogenización y la lisis celular. Las células se lisan por la combinación de agentes químicos de los pasos 1-4 y por la agitación mecánica de este paso. Agitando las cuentas de forma aleatoria en presencia de los agentes de ruptura, la colisión de las cuentas con las células microbianas hará que las células se rompan.

6.- Se centrifugaron los tubos a 10 000 g por 30 segundos a temperatura ambiente.

7.- Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.

Nota: Se esperó entre 400 y 500 μ l de sobrenadante en este paso. El volumen exacto recuperado no es crítico para que el procedimiento sea efectivo. El sobrenadante puede tener una apariencia oscura y contener aun algunas partículas del suelo. La presencia de suelo o de un color oscuro en la mezcla es esperada en muchos tipos de suelo en este paso. Los pasos siguientes removerán tanto el suelo como la coloración de la mezcla.

8.- Se añadieron 250 μ l de solución C2 y se agitó en vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 min.

La solución C2 contiene un reactivo para precipitar materia orgánica diferente a ADN y materia inorgánica, incluyendo sustancias húmicas, restos celulares y proteínas. Es importante para remover materia orgánica e inorgánica contaminante que puede reducir la pureza del ADN e inhibir aplicaciones posteriores del ADN.

9.- Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente por 1 min. a 10 000 g.

10.- Cuidando el precipitado, se transfirieron arriba de 600 μ l de sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.

El precipitado en este punto contenía materia orgánica diferente a DNA y materia inorgánica, incluyendo ácidos húmicos, restos celulares y proteínas. Para un mejor rendimiento y calidad de DNA, se cuidó no transferir nada de precipitado.

11.- Se añadieron 200 μ l de solución C3 y se agitó en vortex cuidadosamente. Incubando a 4°C por 5 min.

La solución C3 es el segundo reactivo para precipitar materia inorgánica y materia orgánica diferente de ADN adicional incluyendo ácidos húmicos, restos celulares y proteínas. Es importante para remover materia orgánica e inorgánica contaminante que puede reducir la pureza del ADN e inhibir posteriores aplicaciones.

12.- Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente por 1 min. a 10 000 g.

13.- Se transfirieron arriba de 750 μ l de sobrenadante a un tubo limpio.

14.- Añadir 1.2 ml de solución C4 al sobrenadante y agitar en vortex por 5 seg.

La solución C4 es una solución alta en concentración de sales. Ya que el ADN se une fuertemente a la sílice a altas concentraciones de sal, esto modifica la concentración de sal de la solución de ADN para permitir la unión del ADN pero no del material inorgánico ni del material orgánico diferente a ADN que puede todavía estar presente a bajos niveles, a la columna de filtrado.

15.- Se colocaron aproximadamente 675 μ l a la columna de filtrado y se centrifugó a 10 000 g por 1 min. a temperatura ambiente. Se descartó el flujo, se adicionaron 675 μ l de sobrenadante a la columna de filtrado y se centrifugó a 10 000 g por 1 min. a temperatura ambiente. Se colocó el resto del sobrenadante en la columna de filtrado y se centrifugó a 10 000 g por 1 min. a temperatura ambiente. Nota: Se requiere un total de tres cargas por cada muestra procesada.

El ADN es selectivamente unido a la membrana de sílice en la columna de filtrado con solución alta en sal. Los contaminantes pasan a través de la membrana de filtrado, dejando solo el ADN unido a la membrana.

16.- Se añadieron 500 μ l de solución C5 y se centrifugó a temperatura ambiente por 30 seg a 10 000 g.

La solución C5 es una solución de lavado basada en etanol usada para mayor limpieza del ADN unido a la membrana de sílice de la columna de filtrado. Esta solución de lavado remueve residuos de sal, ácidos húmicos, y otros contaminantes mientras permite al ADN estar unido a la membrana de sílice.

17.- Se descartó el flujo del tubo de 2 ml.

Este flujo es de residuos inorgánicos y orgánicos diferentes de ADN removidos de la membrana de sílice de la columna de filtrado por la solución de lavado de etanol.

18.- Se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min.

La segunda centrifugación remueve los residuos de solución C5. Es crítico remover todos los restos de la solución de lavado por que el etanol de la solución C5 puede interferir con muchas aplicaciones posteriores del ADN como PCR, restricciones y electroforesis.

19.- Cuidadosamente se colocó la columna de filtrado en un tubo de 2 ml. Cuidando de no salpicar solución C5 en la columna.

20.- Se añadieron 100 μ l de solución C6 en el centro de la membrana de filtrado blanca.

21.- Se centrifugó a temperatura ambiente por 30 seg. a 10 000 g.

22.- Se descartó la columna de filtrado. El ADN en el tubo estaba ahora listo para aplicaciones posteriores.

Se recomienda guardar de -20 a -80 °C.

2) Protocolo propuesto por Zhou (1996).

Se mezcló la muestra con el buffer de extracción (Tris HCl, fosfato de sodio, NaCl, EDTA, CTAB y PVP) y la proteinasa K, se añadió SDS 20% incubando 2h, se centrifugó y lavó la pastilla dos veces con buffer de extracción y SDS el sobrenadante se mezcló con cloroformo, isopropanol y acetato de sodio por 1hr. se centrifugó y lavó con etanol 70% frío, se resuspendió en agua desionizada esteril. El ADN extraído se purificó nuevamente mediante una minicolumna Wizard SV Genomic DNA purification System de Promega.

Posteriormente se observó la integridad del ADN en un gel de electroforesis al 1%. Una vez que se comprobó que obtuvimos un ADN lo suficientemente puro, se digirieron aproximadamente 300 ng de ADN con la enzima HindIII (PROMEGA) durante 4 hrs a 37°C. La digestión se observó nuevamente en un gel de electroforesis al 1%. Después, se inactivó la enzima a 65°C en un Fisher Scientific Dry Bath Incubator por 20 min. Se purificó nuevamente por minicolumna (Wizard SV Genomic DNA purification System, Promega). Se observó en un gel de agarosa al 1%.

6.3. CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA.

Para llevar a cabo la clonación del ADN metagenómico se emplearon 50 ng de ADN y 10 ng del vector pIndigoBAC-5 (previamente digerido con HindIII), así como 4U de enzima Ligasa T4 durante 12 horas continuas a 4°C. La ligación se transformó por electroporación en células de *E. coli* electrocompetentes en un electroporador 2510 eppendorf.

Para llevar a cabo la electroporación en células de *E. coli* estas se prepararon de la siguiente manera.

- Se inocularon 100 ml de medio LB con 1 ml de cultivo o/n de la cepa de *E. coli* TOP 10.
- Se incubaron a 37°C con agitación vigorosa hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 (A_{600}).
- Se enfrió el cultivo en hielo durante 30 min. A partir de este momento fue crítico mantener las células a 4°C.
- Se colectaron las células centrifugando 5700 rpm/15 min. a 4°C y se decantó el sobrenadante.

- Se lavó dos veces con 50 ml de glicerol al 10% pre enfriado en hielo.
- Después de dos lavados la pastilla resultante se resuspendió en 0.2 ml de GYT (glicerol 10%, 0.125% de extracto de levadura y 0.25% de peptona de caseína) pre enfriado en hielo.
- Se prepararon alícuotas de 50 μ l en tubos eppendorf pre enfriados. Las células en ese momento competentes pueden emplearse de inmediato, congelarse en hielo seco o mantenerlas en un ultracongelador.

Para electroporar, se añadió el ADN a las células (5 μ l) y se mezcló con la punta de la pipeta. Transferir a una cubeta de electroporación pre enfriada. Se mantuvo la celda en el hielo hasta que se electroporó.

La electroporación se llevó a cabo aplicando los siguientes parámetros: 25 μ F, 200 ohms y 1.8 Kv.

Se añadió a la cubeta 1ml de medio SOC (2% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10mM de NaCl, 10mM de MgSO₄ y 10mM de MgCl₂).

Se incubó 1 hr. a 37°C para permitir la expresión del gen de resistencia a cloranfenicol.

Se tomaron 100 μ l y plaquearon en cajas petri con medio LB, Cm²⁰. Se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Se centrifugaron el resto de las células a 6000 rpm durante 5 min se desechó el sobrenadante y resuspendió en 100 μ l de LB para plaquear en las cajas. Incubando de 20 a 24 hrs a 37°C.

Se picaron 1075 clonas en placas de medio LB con 10 μ g/ml de cloranfenicol más 40 μ l de X-gal 60 μ g/ml e incubaron durante 24 hrs a 37°C.

6.4. EXTRACCIÓN DEL VECTOR DE CLONACION (BAC)

Los BACs se extrajeron por el método de Lisis alcalina. (Sambrook y Russell 2001)

- Se partió de una fase estacionaria crecida durante toda la noche en 3 ml de medio LB líquido.
- Se transfirieron 1.5 ml de cultivo en un tubo eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm por 30 seg. Desechando el sobrenadante.
- Se resuspendió la pastilla en 200 μ l de solución I (50mM de glucosa, 25 mM de TrisHCl pH 8.0, 10mM de EDTA pH8.0).
- Se adicionaron 2 μ l de lisozima (100mg/ml) se mezcló cuidadosamente e incubó a 37°C durante 5 min.
- Se adicionaron 200 μ l de solución II (NaOH 0.2N/SDS 1%) se mezcló vigorosamente e incubó durante 5 min. a 25°C.
- Se agregaron 150 μ l de solución III (acetato de potasio 5M pH 4.8 con ácido acético glacial). Mezclando por inversión e incubando en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 20 min.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml (este contiene el plásmido), cuidando que el precipitado se eliminara completamente.
- Se adicionó 1 ml de etanol absoluto. Se mezcló por inversión e incubó 2 min a 25°C. se centrifugó 10 min. A 12000 rpm y descartó el sobrenadante.
- A la pastilla de ácidos nucleicos se le agregaron 0.5 ml de etanol al 70% y se agitó brevemente.
- Se centrifugó a 12000 rpm 2 min. y decantó el sobrenadante.

- Se secó la pastilla y disolvió en 30 μl de agua estéril desionizada. Se agregó 1 μl de RNAsa libre de DNAsa 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Se visualizó el vector en gel de agarosa al 1%.

6.5. LIBERACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS.

Los fragmentos clonados fueron liberados por medio de una restricción con la enzima HindIII para determinar su tamaño promedio.

Tabla. 4. Cantidades de reactivos utilizados para la liberación de los fragmentos.

Agua	6.7 μl
Buffer	2 μl
BSA	0.3 μl
DNA	10 μl (20 ng/ μl)
Enzima <i>HindIII</i>	1 μl (10 u/ μl)
Vol. Final	20 μl

Se visualizaron en gel de agarosa al 1%.

6.6. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES HEMOLÍTICAS

La búsqueda de actividades hemolíticas se realizó mediante la resiembra de la biblioteca o clonas en placas de agar sangre de carnero. Las placas se incubaron a 28°C durante 24

hrs. Las actividades hemolíticas se determinaron mediante la observación de un halo hemolítico alrededor de la colonia o clona resembrada. Las clonas seleccionadas se volvieron a replicar en agar sangre de carnero para corroborar el fenotipo hemolítico.

6.7. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La búsqueda de actividad de resistencia a antibióticos se realizó mediante la resiembra de las clonas en agar LB con diferentes antibióticos.

Tabla 5. Concentraciones de los antibióticos usados.

Espectinomicina (Sp)	100 µg/ml
Ampicilina (Amp)	100 µg/ml
Ácido Nalidixico (Nal)	20 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	12 µg/ml
Eritromicina (Em)	100 µg/ml

Las placas se incubaron a 37°C por 24 hrs. La actividad de resistencia a antibióticos se determinó mediante el crecimiento de la clona en el medio respectivo utilizando como control la ausencia de crecimiento de la cepa silvestre.

6.8. PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES DE CLONACIÓN (BAC) PARA SECUENCIACIÓN.

75 BACs producto de la lisis alcalina se purificaron por medio de una minicolumna Wizard SV Genomic DNA purification System de Promega para mandar secuenciar sus extremos a una casa comercial. Las 1075 clonas se guardaron en glicerol y medio LB 50:50.

VII. RESULTADOS

7.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUELO

Las muestras de suelo que se aislaron se enviaron al Laboratorio de Análisis de Suelos del INIFAP-Celaya para conocer sus condiciones físico-químicas. Los resultados obtenidos muestran que la textura del suelo es de tipo franco arcilloso con un pH neutral de 7. En general las condiciones del suelo son ricas en nutrientes, con un buen índice de fertilidad, así como condiciones bajas en sodio (Tabla 6). Lo anterior nos sugiere que el suelo es óptimo para el cultivo de trigo, además de que las condiciones representan un buen pH para el desarrollo de microorganismos en el suelo y probablemente en la rizósfera.

Tabla 6. Índice de fertilidad del suelo rizosférico de plantas de trigo.

Textura del suelo	pH
Franco arcilloso	7.17 neutro

FERTILIDAD													
Muy Alto													
Alto													
Mod. Alto													
Mediano													
Mod. Bajo													
Bajo													
Muy Bajo													
Determinación	MO	N-Inorg	P-Bray	K	Ca	Mg	Na *	Fe	Zn	Mn	Cu		
Unidades	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm		
Resultados	3.73	16.9	53.8	653	4938	1416	153	22.8	0.91	55.9	2.55		

* Es deseable que este elemento sea bajo

7.2. AISLAMIENTO Y DIGESTIÓN DEL METAGENÓMA DE RIZÓSFERA DE TRIGO

Aislar ADN metagenómico altamente puro del suelo representa un reto. Por tal motivo, se emplearon diversos métodos para el aislamiento del metagenoma de la rizósfera de plantas de trigo, los cuales se modificaron y se mejoraron las condiciones. En la figura 4 podemos observar (A) una banda con un ligero barrido característico de la extracción de ADN metagenómico. (B) La purificación del ADN se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial productora del kit que utilizamos (carril 1) pero el ADN se perdió prácticamente en su totalidad. Por lo tanto se modificaron algunos pasos durante la purificación y se logró obtener ADN puro y en buena cantidad aparentemente (carril 2).

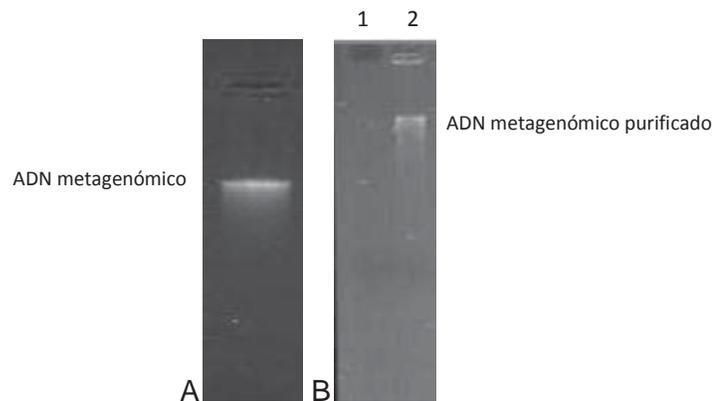


Fig. 3. Gel de electroforesis que muestra el ADN metagenómico de rizósfera de plantas de trigo. (A) Se observa una banda con un ligero barrido característico de la extracción de ADN metagenómico. (B) La purificación del ADN se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial productora del kit que utilizamos (carril 1) pero el ADN se perdió prácticamente en su totalidad. Por lo tanto se modificaron algunos pasos durante la purificación y se logró obtener ADN puro y en buena cantidad aparentemente (carril 2).

Una vez que se logró mejorar las condiciones del ADN aislado de la rizósfera de plantas de trigo se llevó a cabo la digestión para obtener fragmentos mayores a 10 kb pero menores

a 100 kb. Lo anterior con el fin de obtener una biblioteca de fragmentos grandes con la posibilidad de clonar operones o rutas metabólicas completas (Daniel 2005).

En la figura 5 se observa la digestión del metagenóma con la enzima *HindIII* en un gel de agarosa. Como se puede observar, la digestión fue parcial y se obtuvo un ADN con fragmentos grandes de más de 10 kb.

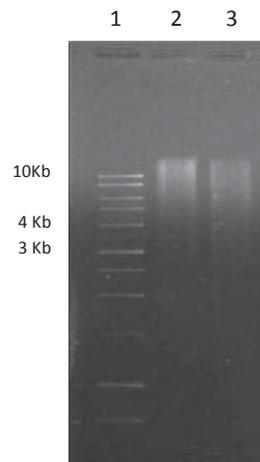


Fig.5. Digestión de ADN metagenómico. Carril1: marcador de tamaño molecular de 1 kb. La banda de mayor tamaño es de 10 kb. Carril 2: digestión con 1µl de enzima (10u/µl), carril 3: digestión con 2 µl de enzima. Se observa en ambas digestiones un barrido característico de una digestión de ADN metagenómico que va desde por arriba de las 10 Kb hasta aproximadamente 3Kb.

7.3. CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA METAGENÓMICA Y DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO PROMEDIO DE LOS INSERTOS.

Una vez que se había digerido el ADN metagenómico se decidió clonarlo en el vector pIndigoBAC-5 para su posterior electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* TOP 10. Como resultado de este experimento se logró obtener una biblioteca de 1075 clonas. Para determinar el tamaño promedio de los insertos clonados se tomaron al azar 26 clonas para aislar el vector y se digirieron con *HindIII* para liberar el inserto. La figura 6 muestra el resumen de resultados. Se puede observar que la mayoría de los insertos tiene un tamaño de entre 21 y 30 kb aproximadamente. Sin embargo es de resaltar que se

obtuvo fragmentos de gran tamaño, iguales o mayores a 80 kb. En promedio, estos resultados nos sugieren que se obtuvo una biblioteca de insertos grande, con un promedio de 38 kb.

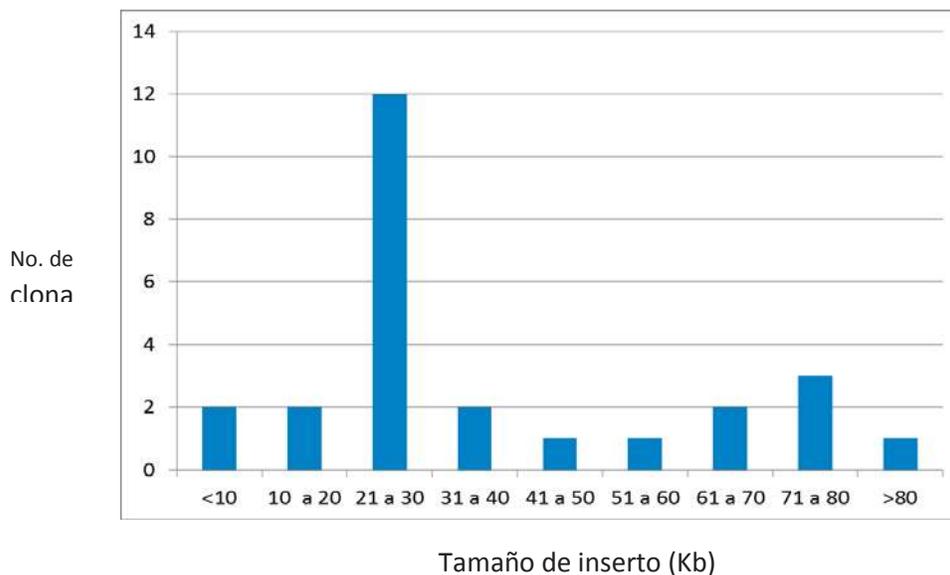


Figura 6. Representación del rango de tamaño de inserto de la biblioteca metagenómica de rizosfera de planta de trigo. Clonas con un rango de 10 Kb. Se agrupan juntas.

7.4. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS INSERTOS CLONADOS

Con el fin de conocer que tipo de secuencias se clonaron en nuestra biblioteca, así como saber a que organismos pertenecen se asilaron 96 vectores de clonas diferentes tomadas al azar y se mandaron secuenciar los extremos de los insertos clonados. La tabla 6 resume los resultados que se obtuvieron de 75 secuencias obtenidas, las cuales fueron analizadas en búsquedas de similitud tipo Blastn con otras secuencias ya reportadas en la base de datos del NCBI.

No. De secuencia	Gen	No. De acceso	Función	Localización	Especie	Grupo taxonómico	Identidad %
1		ACM31091	Proteína hipotética	Plásmido pAtK84c	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Alfa proteobacteria	100
2		ABM30629	Proteína hipotética conservada	Cromosoma	<i>Acidovorax citrulli AAC00-1</i>	Beta proteobacteria	97
3	<i>kefC</i>	ACP21541	Probable proteína del sistema de expulsión de potasio regulado por glutatión.	Plásmido pNGR234b	<i>Rhizobium sp.</i>	Alfa proteobacteria	99
4	<i>ilr1</i>	ABV34631	Amidohidrolasa	Cromosoma	<i>Shewanella sediminis</i>	Gamma proteobacteria	99
5	<i>gyrA</i>	AMB27028	Subunidad A de DNA girasa	Cromosoma	<i>Desulfovibrio vulgaris DP4</i>	Delta proteobacteria	99
6	<i>rpmH</i>	AM295250	Proteína 50S ribosomal L34	Cromosoma	<i>Staphylococcus carnosus</i>	Firmicute	97
7	<i>murC</i>	BX569689	Probable UDP-N-acetilmuramato-alanine ligasa	Cromosoma	<i>Synechococcus sp. WH8102</i>	Cyanobacteria	100
8		XP_001390841	Proteína hipotética con actividad catalítica.		<i>Aspergillus niger CBS 513.88</i>	Dikarya	100
9		ACQ62153	Proteína hipotética	Cromosoma 2	<i>Vibrio cholerae</i>	Gamma proteobacteria	100
10	<i>dnaA</i>	AE008923	Iniciador de la replicación cromosómica	Cromosoma	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Gamma proteobacteria	99
11	<i>dapA</i>	ACP21490	dihidrodipicolinato sintasa	Plásmido pNGR2346	<i>Rhizobium sp.</i>	Alfa proteobacteria	99
12		AAM29722	Proteína conservada		<i>Methanosarcina mazei</i>	Euryarchaeota	100
13	<i>thiJ</i>	CAA21228	Proteína de dominio ThiJ	Cromosoma III	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Dikarya	100
14		GU361605	Proteína hipotética conservada		<i>Escherichia coli serotype O78:K80:H9</i>	Gamma proteobacteria	100
15		BAH61199	Proteína de unión a ADN de cadena simple		<i>Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044</i>	Gamma proteobacteria	100
16		BAH63734	Componente de unión a ATP del sistema de transporte ABC		<i>Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044</i>	Gamma proteobacteria	100
17		AGCRV_s3g p1	Proteína VP3		<i>American grass carp reovirus</i>	dsRNA viruses	100
18		ACQ46665	Proteína de dominio PFH/ grupo7		<i>Bacillus anthracis</i>	Firmicute	98
19		ABJ90843	Proteína conservada		<i>Buchnera aphidicola</i>	Gamma proteobacteria	97
20		ABO56855	Mayor facilitador de la superfamilia MFS 1	Cromosoma 2	<i>Burkholderia vietnamiensis G4</i>	Beta proteobacteria	100
21		BAG50830	Replicasa		<i>Corynebacterium casei</i>	Actinobacteria	100
22	<i>pcrA</i>	AAO80541	Helicasa de ADN dependiente de ATP		<i>Enterococcus faecalis V583</i>	Firmicute	99
23		CBH40760	Lipoproteína P80	Cromosoma	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	Tenericutes	100
24		ABO58398	Regulador transcripcional de la familia LysR	Cromosoma 2	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Beta proteobacteria	100
25		CBL33199	Componente de la familia IIC del sistema PTS lactosa/celobiosa		<i>Enterococcus sp.</i>	Firmicute	100
26		ABB05850	Citocromo P450	Cromosoma III	<i>Burkholderia sp.</i>	Beta proteobacteria	97

27	CAJ38070	Proteína hipotética muestra ambiental		<i>methanogenic archaeon no cultivable RC-1</i>	Euryarchaeota	100
28	ABO42240	ADN de cloroplasto de <i>Triticum aestivum</i>		<i>Triticum aestivum</i>	Viridiplantae	98
29	<i>gcl</i> ABQ76432	glutamato-cisteína ligasa		<i>Pseudomonas putida F1</i>	Gamma proteobacteria	98
30	ABR83582	Probable proteína de membrana		<i>Pseudomonas aeruginosa PA7</i>	Gamma proteobacteria	100
31	<i>ompA /mot B</i> ABA05997	OmpA/MotB		<i>Nitrobacter winogradskyi Nb-255</i>	Alfa proteobacteria	100
32	<i>nuda</i> ABQ76772	Hidrolasa NUDIX		<i>Pseudomonas putida F1</i>	Gamma proteobacteria	98
33	ABQ66858	Proteína no caracterizada		<i>Sphingomonas wittichii RW1</i>	Alfa proteobacteria	98
34	FN821089	Transposón Tn5045 de resistencia a cromato Tik3		<i>Pseudomonas Sp.</i>	Gamma proteobacteria	98
35	AB231806	Secuencia no codificante	Plasmido pA1	<i>Sphingomonas sp.</i>	Alfa proteobacteria	100
36	CP001509	Peptidasa		<i>Escherichia coli</i>	Gamma proteobacteria	100
37	AB272627	Proteína hipotética Caul_3500		<i>Caulobacter sp. K31</i>	Alfa proteobacteria	100
38	CP001628	RNA ribosomal 23S		<i>Micrococcus luteus NCTC 2665</i>	Actinobacteria	100
39	CAF29559	Subunidad alfa de 2-oxoglutarato oxidoreductasa		<i>Methanococcus maripaludis</i>	Euryarchaeota	100
40	XM_389549	Proteína hipotética Mrna		<i>Gibberella zeae PH-1</i>	Dikarya	91
41	No	Se	Encontró	<i>Similitud</i>	Significante	
42	ACQ48133	Proteína de dominio fosfotransferasa		<i>Bacillus anthracis</i>	Firmicutes	99
43	No	Se	encontró	<i>Similitud</i>	Significante	
44	AF393466	Muestra ambiental		<i>crenarchaeote 74A4 no cultivable</i>	Arquea marina grupo 1	100
45	<i>dgkA</i> ACO30220	Cinasa B de esporulación		<i>Bacillus cereus</i>	Firmicute	100
46	AJ431260	Secuencia no codificante	Plasmido pB4	<i>Bacteria no cultivable</i>	Muestra ambiental	99
47	ACL07494	Proteína no caracterizada involucrada en la biogénesis del sistema respiratorio y fotosintético.		<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Delta proteobacteria	100
48	<i>thsA</i> GU059103	Subunidad alfa de chaperonina		<i>clon H10-kor arquea no cultivable</i>	Arquea; muestra ambiental	99
49	<i>zapA</i> ABA05985	Proteína de división celular ZapA		<i>Nitrobacter winogradskyi Nb-255</i>	Alfa proteobacteria	100
50	ADF36524	proteína de cobertura		<i>virus del enrollamiento de las hojas del tomate de Nueva Delhi</i>	Geminiviridae	98
51	ACU49174	Probable subunidad alfa/beta deacetoin dehidrogenasa	Cromosoma 2	<i>Brucella microti</i>	Alfa proteobacteria	100
52	GU897676	RNA ribosomal 16S		<i>Arquea muestra ambiental clone F77608Q02B1XHQ</i>	Arquea, muestra ambiental	100
53	<i>rdgC</i> AMB30642	Exonucleasa, RdgC		<i>Acidovorax citrulli</i>	Beta	98

				<i>AAC00-1</i>	proteobacteria	
54	ADA77685	aspartil-tRNA sintasa		<i>Francisella tularensis</i>	Gamma proteobacteria	100
55	ABV39153	KDPG y KHG aldolasa		<i>Serratia proteamaculans 568</i>	Gamma proteobacteria	100
56	ACU49145	Proteína hipotética	Cromosoma 2	<i>Brucella microti CCM 4915</i>	Alfa proteobacteria	98
57	ABQ384	Alfa,alfa-trehalosa-fosfato sintasa (formación-UDP)		<i>Acidiphilium cryptum JF-5</i>	Alfa proteobacteria	100
58	ABA03278	Proteína hipotética conservada		<i>Nitrobacter winogradskyi Nb-255</i>	Alfa proteobacteria	100
59	CP000933	Secuencia no codificante	Megaplásmido o pCL2100	<i>Campylobacter lari RM2100</i>	Epsilon proteobacteria	100
60	CP001883	Región no codificante	Plásmido pZZM403	<i>Zymomonas mobilis</i>	Alfa proteobacteria	98
61	CP000115	Proteína hipotética conservada		<i>Nitrobacter winogradskyi Nb-255</i>	Alfa proteobacteria	100
62	BAG16847	Proteína hipotética		<i>Streptomyces griseus</i>	Actinobacteria	100
63	ADE84933	Mayor facilitador de la superfamilia MFS 1		<i>Rhodobacter capsulatus SB1003</i>	Alfa proteobacteria	100
64	AAB91625	Probable serin proteasa periplasmática, de la familia DO/DeqQ	Plásmido pNGR234a	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	Alfa proteobacteria	100
65	<i>cydC</i>	ABG68915	Proteína transportadora de unión a ATP CydC	<i>Escherichia coli</i>	Gamma proteobacteria	100
66	<i>mcrA</i>	CAA50044	metil-coenzima M reductasa	<i>Methanothermus fervidus</i>	Euryarchaeota	99
67	<i>dnaA</i>	ABD75266	Proteína iniciadora de la replicación DnaA	<i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	Alphaproteobacteria	
68	ACB22044	Proteína de dominio formil transferasa		<i>Methylobacterium radiotolerans JCM 2831</i>	Alphaproteobacteria	
69	AAV35511	Proteína hipotética conservada		<i>Pseudomonas syringae pv. syringae B728a</i>	Gammaproteobacteria	100
70	AAV38869	Proteína helperHopAK1 tipo III		<i>Pseudomonas syringae pv. syringae B728a</i>	Gammaproteobacteria	
71	CAQ44010	Probable proteína endonucleasa/exonucleasa/fosfatasa	Cromosoma	<i>Stenotrophomonas maltophilia K279a</i>	Gammaproteobacteria	99
72	<i>mesJ/ycf62</i>	CBJ21314	Proteína de familia MesJ/Ycf62	<i>Streptococcus mitis B6</i>	Firmicutes	100
73	X02499	Operón atp		<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Firmicutes	100
74	No	Se	Encontró	<i>Similitud</i>	Significante	
75	CBE67733	Proteína de función desconocida		<i>Candidato Methylobacterium oxyfera NC10 bacteria 'Sedimento Holandés'</i>	Bacteria; candidato división NC10; muestra ambiental	100

Tabla 7. Resumen de las búsquedas de similitud tipo Blast.

La gran mayoría de los insertos tuvieron una similitud o identidad significativa con funciones relacionadas con el metabolismo, así mismo se encontró que un 20% de las

secuencias tuvo identidad con procesos de replicación y reparación del ADN. Otro 10% también se reporta que tuvieron similitud con actividades de transporte. Es interesante resaltar que también otro 10% mostró similitud con secuencias de función hipotética (Figura 7).

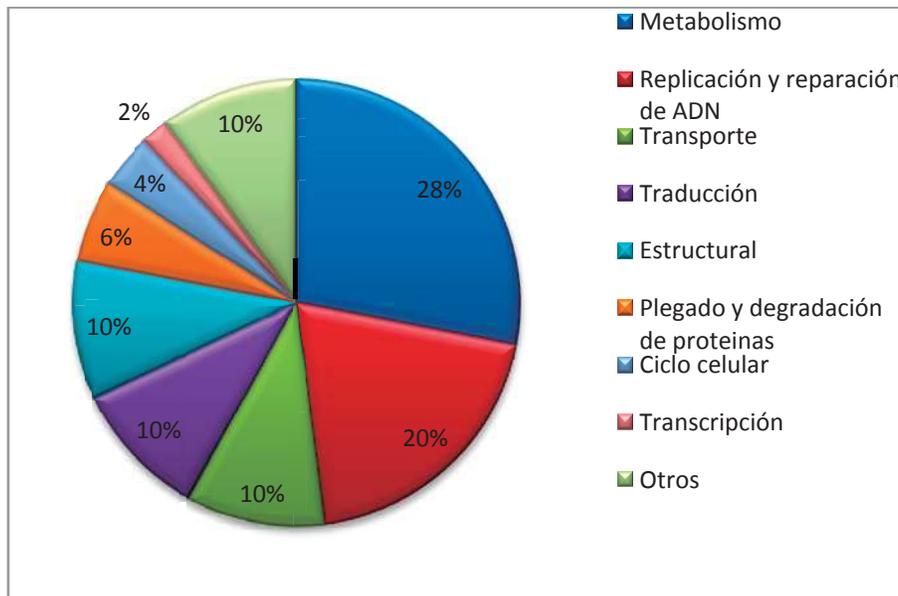


Fig.7. Distribución de los genes según los procesos celulares que realizan.

En el siguiente gráfico (Figura 8) se muestran las principales funciones celulares que se encontraron, derivadas de las búsquedas tipo Blastn. Cabe destacar que el tamaño de la letra de cada papel funcional es proporcional a su índice de abundancia. De esta manera podemos observar que las proteínas de membrana son las más abundantes seguidas de aquellas de la replicación, nucleasas y fosfotransferasas.



Fig. 8. Principales funciones celulares de los genes encontrados en el análisis de secuencias.

Ahora bien, las secuencias que se obtuvieron también se analizaron para conocer a que tipo de organismo pertenecen, encontrando que provienen principalmente del metagenoma de bacterias cultivables y no cultivables, así como de arqueas, algunos virus y hongos. Pocas secuencias mostraron identidad con secuencias de plantas, lo que sugiere que la biblioteca contiene principalmente genes provenientes de genomas bacterianos, incluyendo las Gamma y Alfa-proteobacterias (Figura 9).

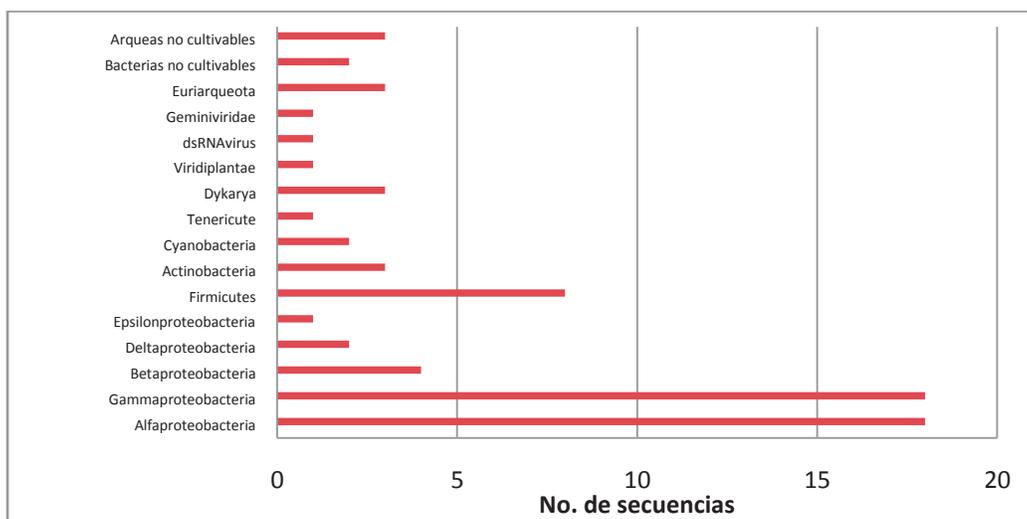


Figura 9. Distribución de las secuencias encontradas en la rizósfera de plantas de trigo.

Haciendo un análisis más detallado de los insertos y a que organismos pertenecen, nuestros resultados sugieren que una de las bacterias más abundantes es *Nitrobacter winogradskyi*, seguido de otras rizobacterias como *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*.



Figura 10. Especies bacterianas encontradas en la rizosfera de trigo. El tamaño de la letra de cada papel funcional es proporcional a su índice de abundancia

7.5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA BIBLIOTECA METAGENÓMICA

7.5.1 Actividades Hemolíticas.

Las actividades hemolíticas se presentan en bacterias de diferentes especies, principalmente en aquellas que tienen alguna función de defensa en contra de otros organismos. En nuestra biblioteca fue interesante encontrar que dos de las clonas parecían presentar actividad beta hemolítica (hemólisis completa de eritrocitos), mientras que otras cuatro mostraron una hemólisis del tipo alfa (Figura 11). Sin embargo, al repetir el experimento se encontró que únicamente una de las clonas presentó hemólisis del tipo beta.

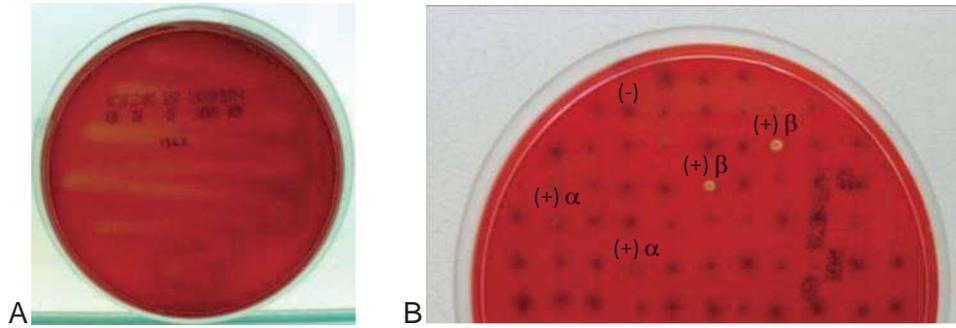


Fig.11. Actividad Hemolítica. (A) Clona con actividad beta hemolítica en agar sangre, donde podemos observar la decoloración característica de esta actividad alrededor de la estria. (B) Clonas con actividad alfa y beta hemolítica crecidas en agar sangre de carnero, donde se observan los halos claros (actividad beta) y verdes (actividad alfa) característicos.

7.5.2 Actividades de resistencia a antibióticos

Otra de las actividades que se analizaron en la biblioteca metagenómica fue la búsqueda de genes que confieran resistencia a antibióticos. Para ello, se encontraron dos clonas con resistencia a espectinomicina, siete a Acido Nalidixico y una con resistencia a Tetraciclina (Figura 12). Cabe resaltar que una de las clonas, la denominada 150152 resultó resistente a los tres antibióticos analizados.

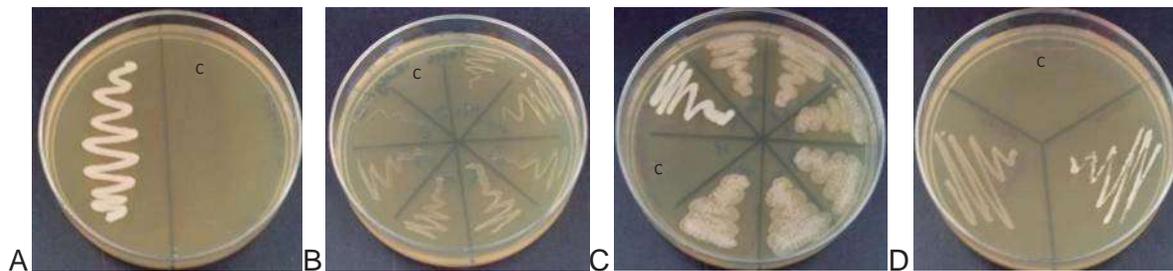


Fig. 12. Resistencia a antibióticos. (A) Izq. Clona que muestra resistencia a Tc der. Control sensible. (B) Clonas con resistencia a Tc y control sensible. (C) Clonas con resistencia a Nal. y control sensible. (D) Clonas con resistencia a Sp, en la parte superior el control sensible.

7.6. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE ADN RIBOSOMAL AMPLIFICADO (ARDRA) A LAS CLONAS CON ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Fue interesante observar que las clonas que presentaron actividad hemolítica y de resistencia a antibióticos presentaron algún cambio en su morfología, por lo que se analizaron por medio de restricción de ADN ribosomal amplificado o también conocido como ARDRA. El objetivo fue determinar que se estaba trabajando con cepas transformadas de *E. coli* TOP10. Los resultados obtenidos sugieren que dos de las cepas analizadas y que presentaron actividad hemolítica tipo alfa y beta presentan un patrón de restricción idéntico que la cepa *E. coli* TOP10 sin transformar, lo que sugiere que dichas clonas son de la misma especie *E. coli* TOP10 y no hubo algún tipo de contaminación durante la construcción de la biblioteca (Figura 13).

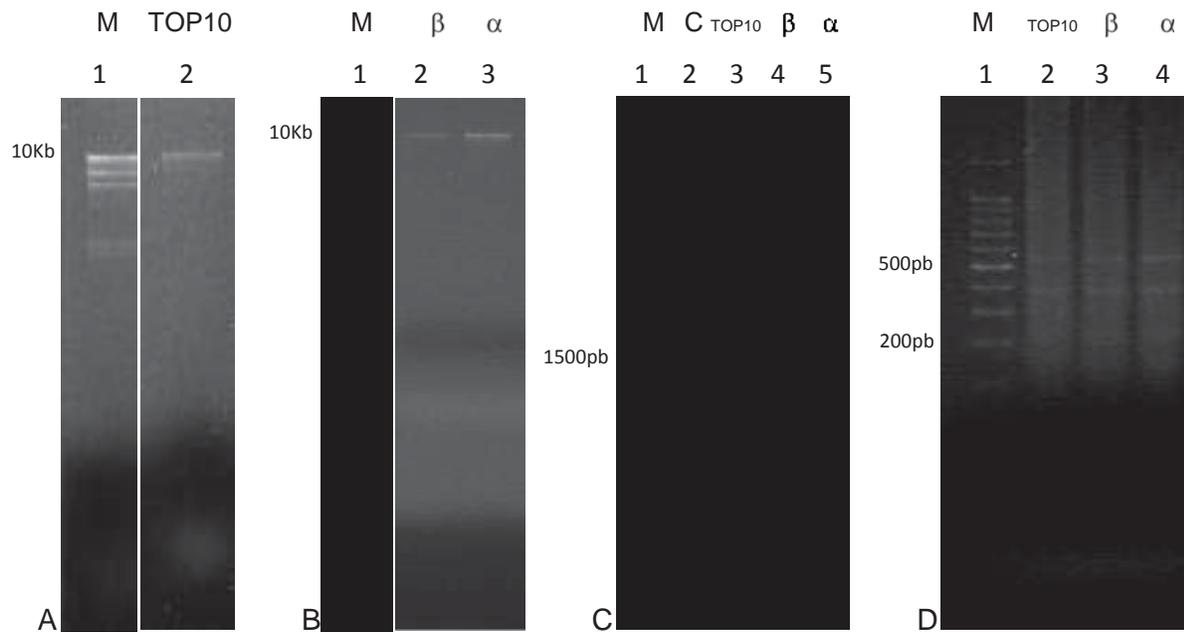


Figura 13. ARDRA de las clonas con actividad alfa y beta hemolítica. (A) Extracción de ADN genómico de *E. coli* TOP10. (B) Extracción de ADN genómico. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: clona con actividad beta hemolítica. Carril 3: clona con actividad alfa hemolítica. (C) Amplificación de gen 16S ARNr por PCR. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: control de PCR. Carril 3: gen 16S ARNr de *E. coli* TOP10. Carril 4: gen 16S ARNr de clona con actividad beta hemolítica. Carril 5: gen 16S ARNr de clona con actividad de alfa hemolisis. (D) Digestión con la enzima de

restricción HhaI de: carril 2: E.coli TOP10. Carril 3: clona con actividad beta hemolítica. Carril 4: clona con actividad alfa hemolítica.

7.7. AISLAMIENTO DE BACs DE CLONAS CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Las clonas que presentaron resistencia a algún antibiótico fueron analizadas para corroborar la presencia del vector pIndigoBAC-5 con su probable inserto. En la figura 14 se muestra la lisis alcalina de cinco clonas que presentaron diferentes actividades de resistencia a antibióticos. Es importante mencionar que no se aislaron todos los vectores de cada clona; sin embargo se sugiere realizar un análisis de digestión para conocer el tamaño del inserto.

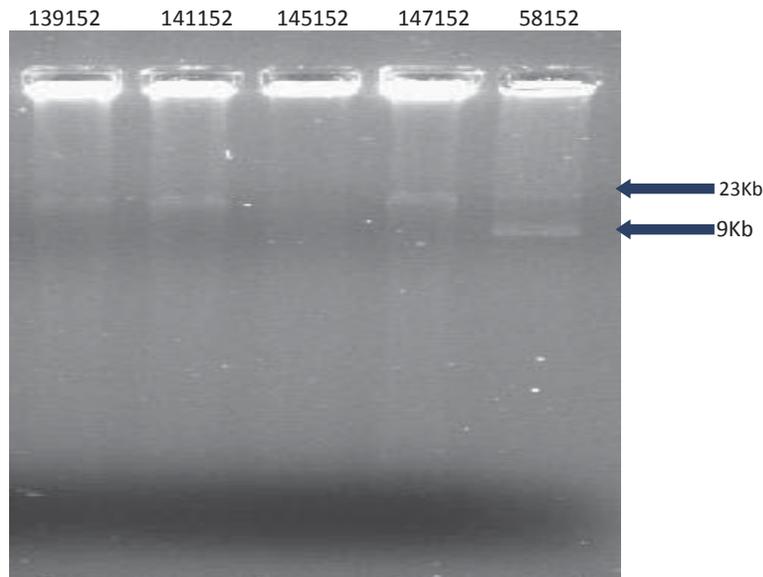


Figura .13. Lisis alcalina de algunas clonas que mostraron resistencia a antibióticos. Se observan en todos los carriles bandas por arriba de las 7.5 Kb. Indicativas del vector con el inserto.

VIII. DISCUSIÓN.

El suelo es uno de los hábitats que contienen grandes y diversas poblaciones de microorganismos. Su estudio representa un gran desafío por su complejidad, no sólo involucrando su diversidad, sino también por las interesantes interacciones ecológicas que ahí se dan entre los diferentes factores bióticos y abióticos. Por otra parte, el suelo representa un reservorio importante para la industria en busca de nuevos productos naturales, incluyendo antibióticos, compuestos químicos y medicamentos anticancer (Pettit, 2004).

Se sabe que los microorganismos del suelo tienen una increíble capacidad para producir metabolitos secundarios, los cuales pueden tener alguna actividad biológica relevante o de interés para los seres humanos. Anteriormente se requería del aislamiento y cultivo de aquellos organismos que sintetizaran el compuesto de interés para poder obtenerlo, limitando las posibilidades para poder estudiar la diversidad no cultivable. Ahora bien, se ha sugerido que sólo una pequeña fracción de los microorganismos del suelo son cultivables en el laboratorio, por lo que podemos imaginar que el estudio de los microorganismos se había limitado, dejando a un lado todo ese material genético desconocido y que comprende a la gran mayoría de los habitantes microscópicos del suelo (Hernández-León, *et al.*, 2010). Hoy en día, la metagenómica nos brinda la posibilidad de analizar la diversidad de microorganismos cultivables y no cultivables, ya sea de bacterias, hongos o virus por métodos moleculares. Podemos analizar su expresión y su función en huéspedes heterólogos (Handelsman, 2004).

En este trabajo se construyó una biblioteca metagenómica de rizosfera de plantas de trigo. La biblioteca consta de 1075 clonas y contiene un tamaño promedio de inserto de 38

kb, lo cual nos indica que se han clonado insertos grandes con la posibilidad de haber clonado genes completos, operones o vías metabólicas completas. En el trabajo de Rondon *et al*, en 2000 contruyeron una biblioteca metagenómica de un suelo de Wisconsin, E.U., empleando el vector pBeloBAC11, obtuvieron poco más de 3000 clonas e insertos con un tamaño promedio de 27 Kb. (Rondon *et al*, 2000). Cabe destacar que el vector empleado en nuestro trabajo es un derivado de este vector, el pIndigoBAC-5. En otro trabajo MacNeil, *et al*, en el 2001 reportan una biblioteca de suelo construida también con un cromosoma artificial bacteriano con promedio de inserto de 37 Kb.(MacNeil, *et al*, 2001). En ambos trabajos se encontraron actividades interesantes, en particular clonas con actividades antimicrobianas. En nuestro trabajo tenemos un tamaño promedio de inserto aceptable comparado con otros trabajos; sin embargo, se pretende aumentar el número de clonas de la biblioteca para ampliar las posibilidades de encontrar diferentes actividades de las analizadas hasta el momento.

Uno de los objetivos de este tipo de estudios es investigar el potencial biotecnológico de la biblioteca construida, además de analizar la accesibilidad de la diversidad genética en un entorno mediante la clonación directa de ADN del medio ambiente. Uno de nuestros resultados fue la obtención de 75 secuencias, cuyo análisis en busca de homología se realizó mediante herramientas como el Blastn del NCBI. Es interesante mencionar que de un porcentaje importante no se determinó o no se encontró identidad con secuencias conocidas, lo que indica que podrían codificar para funciones no conocidas o hipotéticas. Por otra parte, se obtuvo identidad a genes que participan en procesos celulares como el metabolismo, replicación y reparación de ADN, así como genes involucrados en el transporte, plegado y degradación de proteínas, traducción, transcripción y ciclo celular. Particularmente, las funciones principales que encontramos de estas secuencias son las de proteínas de membrana, fosfotransferasas, replicación y nucleasas. Cabe destacar que

también se encontraron genes de gran interés biotecnológico como la trehalosa fosfato sintasa, una enzima involucrada en la síntesis de trehalosa. La biosíntesis de la trehalosa implica un proceso de dos pasos catalizada por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). Este disacárido funciona como un metabolito de protección contra el estrés en la estabilización de las estructuras biológicas en virtud de la tolerancia a estrés y como almacenamiento de hidratos de carbono en las plantas y otros microorganismos (Goddijn Van Dun., 1999, Eastmond *et al.*, 2002). Se ha visto en otros trabajos que la trehalosa-6-fosfato (T6P) tiene un papel crítico en el crecimiento y desarrollo de la planta, es indispensable para la utilización de los hidratos de carbono y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Eastmond *et al.* 2002, Schlupepmann *et al.*, 2003). T6P se reconoce también como un regulador del metabolismo del azúcar en las plantas (Zhang, *et al.* 2009, Vuorio *et al.* 1993).

También se encontró homología a una amidohidrolasa o amidasa, que es un tipo de hidrolasa que actúa sobre los enlaces amida. Ejemplos de esto incluyen las Beta lactamasas. La Penicilinasas fue la primera β -lactamasa en ser identificada: se aisló por primera vez por Abraham y Chain en 1940 de *E. coli*. Otra de las secuencias clonadas posee 98% de identidad con un transposón Tn5045 de resistencia a antibióticos y cromato (Petrova, 2010). Dicho transposón contiene por lo menos 19 proteínas diferentes relacionadas con la resistencia antibióticos y a metales como el cromato.

Las secuencias que se obtuvieron principalmente pertenecen a la clase Alfa y Gamma-proteobacterias. Aunque también se reporta identidad con otras clases como Beta y Delta -proteobacterias, Firmicutes, arqueas, virus y bacterias y arqueas no cultivables. Lo anterior nos sugiere que las secuencias obtenidas en nuestra biblioteca son diversas. Así mismo, está de acuerdo con el trabajo de Velázquez-Sepúlveda (trabajo de tesis IIQB.2010) donde analiza por medio de la secuenciación de los genes ribosomales 16S la

diversidad filogenética del mismo suelo rizósferico de plantas de trigo. Ella reporta que la mayoría de los 16S secuenciados presentan una identidad con bacterias de la Clase Gammaproteobacteria (37%) y Betaproteobacteria (16%). Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos las mismas proporciones de secuencias pertenecientes a la Clase Bacilli o Actinobacteria, ya que fueron pocas las secuencias con identidad a esas Clases. Al analizar con más detalle a que especie probablemente pertenecen las secuencias, los resultados indican que la mayoría de las secuencias pertenecen a *Nitrobacter winogradskyi*, *Rhizobium* sp. *Pseudomonas putida* y enterobacterias como *E. coli*. *Nitrobacter winogradskyi* es una rizobacteria que habita comúnmente los suelos, además de jugar un papel relevante en el ciclo del nitrógeno, ya que puede convertir el nitrito en nitrato. Un proceso conocido como nitrificación. La Nitrificación tiene un papel crucial en la transformación de los fertilizantes nitrogenados en los sistemas agrícolas y es un componente clave en la eliminación del nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales. *N. winogradskyi* como quimiolitotrofo facultativo, gana energía a partir de la oxidación del nitrito y fija dióxido de carbono como fuente de carbono (Starkenburg, *et al.* 2006). Esto lo convierte en una rizobacteria deseable para el buen aprovechamiento de los nutrientes en los cultivos y por lo tanto un mejor rendimiento de estos. Finalmente, Sepúlveda-Velázquez (2010) reportan un alto índice de diversidad (Shannon-Wiener). Otra de las secuencias más abundantes encontradas en la biblioteca pertenecen a la rizobacteria *Rhizobium* sp. *Rhizobium* es un género que tiene igual importancia por su capacidad de formar una simbiosis con plantas de frijól, mediante la formación de estructuras globulares en la raíz llamadas nódulos. Es interesante mencionar que algunas cepas como *Rhizobium* sp. NGR234 pueden nodular más de 100 especies de leguminosas (Pueppke y Broughton. 1999). Otras de las secuencias encontradas en la biblioteca tienen una alta identidad con cepas de *Pseudomonas putida*. Esta especie es de gran interés en la biorremediación de lugares contaminados, debido a su capacidad de

degradar compuestos aromáticos y xenobióticos y su ubicuidad en ambientes de suelos contaminados (Timmis., 2002). Se sugieren mayores estudios para determinar el grado de promoción de crecimiento vegetal que estos géneros pueden tener sobre el cultivo de trigo. Algunas secuencias mostraron identidad con genes de cepas de *E. coli*. Esta, es una enterobacteria que puede ser patógena de humanos, aunque también existen diversas cepas no patógenas que pueden ser encontradas en suelos, aguas y otros ambientes. Las secuencias obtenidas no mostraron identidad con genes de patogenicidad de cepas de *E. coli*, sin embargo, sería bueno analizar estos datos más a detalle, ya que en algunos lugares los cultivos de trigo pueden ser regados con aguas residuales. En nuestro trabajo nos aseguramos de tomar muestras que fueran de un cultivo que no fue regado con este tipo de aguas contaminadas. Al construir una biblioteca metagenómica se pueden realizar diversos análisis o escrutinios en busca de diversas actividades biológicas o funciones metabólicas. En nuestro caso decidimos buscar clonas con actividad hemolítica y de resistencia a antibióticos. Uno de los motivos es por la facilidad que representa este tipo de análisis. Además de que las actividades hemolíticas pueden asociarse con otro tipo de funciones antimicrobianas o antifúngicas (Pettit, 2004). La resistencia a antibióticos puede darse por diversos factores, pero el desarrollo de vectores de clonación con genes de resistencia a antibióticos es una opción interesante en las industrias biotecnológicas, o para descubrir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos que involucren algún factor genético.

En el análisis de actividad hemolítica encontramos dos clonas con actividad beta hemolítica y cuatro con actividad alfa hemolítica. Estas actividades podrían estar formando parte de algún mecanismo de defensa en un ambiente tan competitivo como lo es la rizósfera de plantas, lo cual ha sido sugerido por otros autores (Rondon et al, 2000),

en donde la actividad hemolítica ha precedido el descubrimiento de nuevos antibióticos y actividades antimicrobianas (Gillespie et al, 2002).

En cuanto a la resistencia a antibióticos se encontraron ocho clonas con resistencia a Tc, siete clonas con resistencia a Nal y dos clonas con resistencia a Sp. La aparición de la resistencia a Acido Nalidixico es mediada por un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de *gyrA*. Otros mecanismos demostrados son los de las bombas de expulsión asociadas con resistencia a múltiples antibióticos (Levy, *et al.* 2004 y Hirose, *et al.* 2002). Por lo que nuestras clonas podrían haber sido afectadas en alguno de estos dos aspectos, mediante un polimorfismo o incluso a través de la clonación de una de estas bombas. Para dictaminar algo así son necesarios mayores análisis que determinen el mecanismo de acción por el cual se han adquirido dichas resistencias. Los altos niveles de resistencia ante aminoglucósidos, grupo al cual pertenece la Espectinomicina, son usualmente mediados por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs) de las cuales han sido reportadas varias con distintas especificidades (Mahbub, *et al.* 2005). A pesar de esto, no se ha identificado un mecanismo genético determinado. Por tal motivo, es de nuestro particular interés ahondar en este estudio. En el caso de Tetraciclina la aparición de la resistencia se debe a numerosos mecanismos mediados por una variedad de proteínas incluyendo bombas de expulsión, enzimas que modifican el fármaco y factores de protección al ribosoma (Thaker, *et al.* 2010). El impacto clínico significativamente negativo de la resistencia a las Tetraciclinas ha dado lugar a intensos esfuerzos por esclarecer los mecanismos de esta resistencia y el desarrollo de nuevos derivados de Tetraciclina que superen los mecanismos de resistencia. De igual manera podríamos sugerir que estas propiedades de resistencia podrían estar involucradas en procesos de defensa dentro de las interacciones que se dan en este ambiente. Nuestros resultados son congruentes con otros trabajos en

los que se reporta que recientes búsquedas funcionales y la acumulación cada vez mayor de datos metagenómicos revelan una densidad inesperada de genes de resistencia en el medio ambiente (por ejemplo, el suelo). También se ha sugerido el término de resistoma antibiótico (D'Costa et al, 2007). Sería muy interesante analizar de una manera más profunda y a detalle los genes que están brindando esta resistencia. Se propone la subclonación de los insertos y su transformación de nuevo en *E. coli* en busca de aquellas clonas que nuevamente presenten el mismo fenotipo. Así podríamos determinar la fracción de ADN que confiere la resistencia para posteriormente ser secuenciada y caracterizada. Lo mismo se sugiere para las clonas con actividades hemolíticas. También se propone analizar si estas clonas presentan alguna otra actividad inhibitoria contra algún patógeno, ya sea hongo o especie bacteriana.

Finalmente podemos concluir que la construcción de bibliotecas metagenómicas es una excelente opción en busca de genes de interés aplicado, o para conocer más a detalle la ecología o interacciones microbianas que se dan en microambientes como la rizósfera de plantas. Por ejemplo, se podría construir una biblioteca en ambientes extremos, contaminados por hidrocarburos (o de otro tipo) donde se limite la vida o diversidad microbiana, tratando de descubrir especies que han sobrevivido en tal hostilidad. También se podrían conocer sus mecanismos de resistencia a dichos contaminantes y proponer nuevas maneras de sobrevivencia. Tales investigaciones son interesantes para llevar a cabo en un futuro cercano.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se construyó una biblioteca metagenómica de rizósfera de plantas de trigo que consiste de 1075 clonas.
- Se determinó un tamaño promedio de inserto clonado de 38.3 Kb, aunque la mayoría de los insertos tienen un tamaño de entre 21 y 30 Kb.
- Se obtuvieron 75 secuencias de los extremos de los insertos, obteniéndose principalmente genes que participan en procesos del metabolismo.
- Las clases alfa y beta proteobacteria resultaron las mas dominantes dentro de las secuencias analizadas.
- Existen genes de interés biotecnológico como la trehalosa fosfato sintasa, amidohidrolasas y genes de resistencia a metales.
- Obtuvimos una clona con actividad beta hemolítica y cinco clonas con actividad alfa hemolítica, así como ocho clonas con resistencia a Tc, siete clonas con resistencia a Nal y dos clonas con resistencia a Sp.

X. CONCLUSIÓN

- El análisis de una biblioteca metagenómica de rizósfera de plantas de trigo mostró la existencia de genes con posible aplicación biotecnológica.

XI. PERSPECTIVAS.

- Aumentar el número de clonas de la biblioteca.
- Analizar los fragmentos de las clonas que muestran actividad hemolítica y de resistencia a antibióticos.
- Ampliar el análisis funcional de las clonas en busca otras actividades (lipasa, síntesis de sideróforos, actividades antibacterianas y antifúngicas, etc.).

XII. PUBLICACIONES.

Rocío Hernández-León, Itzi Velázquez-Sepúlveda, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Gustavo Santoyo. **2010**. Metagenómica de suelos: grandes retos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*. 79:4-11.

Hector A. Marquez-Santacruz, **Rocio Hernandez-Leon**, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Itzi Velazquez-Sepulveda and Gustavo Santoyo. **2010**. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot.) and its detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*. *Aceptado*.

Rocío Hernández-León, Itzi Velázquez-Sepúlveda, Gloria Solís-Guzmán, Miguel Martínez-Trujillo, Gustavo Santoyo. **2010**. Actividades hemolíticas en una biblioteca metagenómica de rizósfera de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Biológicas*. *Aceptado*.

XIII. LITERATURA CITADA.

1. Abraham, E.P. and Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*.146:837-837.
2. Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.*163:173-181.
3. Atlas, R. and Bartha, R. 1998. Microbial Ecology, fundamentals and applications. Fourth Ed. B/Cummings Editors.
4. Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. 2005. Microbial cooperation in the rizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1761-1778.
5. Bashan, Y. and Levanony, H. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant. Soil.* 137:99-103.
6. Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Toraine, B., Normand, P. Cleyet-Marel, J. C. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.* 46:229-236.
7. Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B. J. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4:343-350.
8. Bond, P.L., Druschel, G. K., Banfield, J. F. 2000. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4962-4971.
9. Bowen, G.D. and Rovira, A. D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66:1-102.

10. Brady, S.F., Chao, C.J., Handelsman, J., Clardy, J. 2001. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org. Lett.* 3:1981-1984.
11. Brady, S.F., Clardy, J. 2000. Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 122:12903-12904.
12. Chen, K., and Pachter, L. 2005. Bioinformatics for whole genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Computational Biology*, 1: 106–112.
13. Courtois, S., Capellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M. S., August, P.R., Nalin, R., Guerineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., Pernodet, J.L. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drugs discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:49-55.
14. Craig, J.W., Chang F.Y., Brady, S.F. 2009. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chemical Biol.* 4:23-28.
15. D'Costa, V.M., Griffiths, E., Wright, G.D. 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:481-9.
16. Daniel, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 470-478.
17. DeLong, E. F. 2004. Microbial population genomics and ecology: The road ahead. *Environ. Microbiol.* 6:875–878.
18. Desnues, C., Rodriguez-Brito, B., Rayhawk, S., Kelley, S., Tran, T., Haynes, M., Liu, H., Furlan, M., Wegley, L., Chau, B., Ruan, Y., Hall, D., Angly, F.E., Edwards, R. A., Li, L., Vega Thurber, R., Reid, R.P., Siefert, J., Souza, V., Valentine, D.L., Swan, B.K. Breitbart, M., Rohwer, F. Nature. 2008. Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. *Nature*. 452:340-343.

19. Diaz-Zorita, M., Baliña, R.M., Fernandez-Caniguia, M.V., Peticari, A. 2004. Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasiliense*. *INPOFOS Informaciones agronómicas*.29: 17-19.
20. Eastmond, P.J., Van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C., Graham, I.A. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J*.29:225–235.
21. Fierer, N. and Jackson, R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*.103:626–631.
22. Fischer, S.E., Fischer, S.I., Magris, S., Mori, G.B. 2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 23:895-903.
23. Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., and Nelson, L.M. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47:404-411.
24. Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.L., Relman, D.A., Freser-Liggett, C.M., Nelson, K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 312:1355-1359.
25. Gillespie, D.E., Brady, S.F., Bettermann, A.D., Cianciotto, N.P., Liles, M.R., Rondon, M.R., Clardy, J., Goodman, R.M. Handelsman, J. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*4301-4306.
26. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.

27. Goddijn, O.J.M. and van Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4:315–319.
28. Gray, E.J., and Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 395–412.
29. Haas, D. and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu rev of phytopathol.* 41:117-153.
30. Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:669-685.
31. Handelsman, J. 2005. Metagenomics or megagenomics? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 457–458.
32. Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy J. and Goodman R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5:245-249.
33. Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A. and Gottschalk, G. 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3901–3907.
34. Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., Gottschalk, G. 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3901.
35. Henne, A., Schmitz, R.A., Boonmeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3113.

36. Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. del C., Santoyo, G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes retos y nuevas oportunidades Biotecnológicas. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*. En prensa.
37. Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Solís-Guzmán, G., Martínez-Trujillo, M., Santoyo, G. 2010. Actividades hemolíticas en una biblioteca metagenómica de rizósfera de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Biológicas*. En prensa.
38. Hirose, K., Hashimoto, A., Tamura, K., Kawamura, Y., Sagara, H., Watanabe, H. 2002. DNA sequence analysis of DNA gyrase and DNA topoisomerase in the quinolone resistance determining regions of *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46:3249–3252.
39. Jacob, J. B. and Sean, F.B. 2008. Cloning and characterization of new glycopeptide gen clusters found in an environmental DNA megalibrary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:17273-17277.
40. Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. 1978. Plant growthpromoting rhizobacteria in radish. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. 879–882.
41. Krishnan, H.B., Beom Ryong, K., Ammulu, H.K., Kil Yong, K. and Young, C.K. 2007. *Rhizobium etli* USDA9032 engineered to produce a phenazine antibiotic inhibits the growth of fungal pathogens but is impaired in symbiotic performance. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:327-330.
42. Laflamme, C., Gendron, L., Turgeon, N., Filion, G., Ho, J., Duchaine, C. 2009. *In situ* detection of antibiotic-resistance elements in single *Bacillus cereus* spores. *Syst. Appl. Microbiol.* 32:323-333.
43. Levy, D.D., Sharma, B., Cebula, T.A. 2004. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar

- enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrob. Agents. Chemother.*48:2355–2363.
44. López, M.A., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., Jan-Roblero, J., Romero, J.M., Hernández-Rodríguez, C. 2006. Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58:145-154.
45. Lucy, M., Reed, E., and Glick, B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 1–25.
46. MacNeil, I.A., Tiong, C.L., Minor, C., August, P.R., Grossman, T.H.,Loiacono, K.A., Lynch, B.A., Phillips, T., Narula, S., Sundaramoorthi, R., Tyler, A., Aldredge, T., Long, H., Gilman, M., Holt, D.,Osburne, M.S. 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:301-308.
47. Mahbub, M., Kobayashi, N., Ishino,M., Sumi, A., Kobayashi, K., Uehara, N., Watanabe, N.2005.Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph[2'']-Ie*) conferring high-level Gentamicin resistance and a Spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia (aad9)* in clinical isolates of Enterococci. *Microb. Drug. Resist.*11: 239-247.
48. Majernik, A., Gottschalk, G., and Daniel, R. 2001. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁺ (Li⁺)/H⁺ antiporter activity on *Escherichia coli*: Characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J. Bacteriol.*183: 6645–6653.
49. Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S.A., Mavrodi, D.V., DeBoy, R.T., Seshadri, R. Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.S., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., Watkins,

- K.,Tran,K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Thomashow L.S. and Joyce E.L.2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23:873–878.
50. Perez-Brocal, V., Gil, R., Ramos, S., Lamelas, A., Postigo, M., Michelena, J.M., Silva, F.J., Moya, A., Latorre, A. 2006. A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science.* 314:312-313.
51. Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., and Robaglia, C. 2003. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant. Cell. Environ.* 26:189-199.
52. Petrova,M.A. 2010. Tn5045, a novel antibiotic and chromate resistance transposon from permafrost made up of three distinct entities. The integron database.
53. Pettit, R.K. 2004. Soil DNA libraries for anticancer drug discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:319–328.
54. Poinar, H.N., Schwarz, C., Ji Qi., Shapiro, B., MacPhee, R.D.E., Buigues, B., Tikhonov, A., Huson, D.H., Tomsho, L.P., Auch, A., Rampp, M., Miller, W., Schuster, S. C. 2006. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science.* 311:392-394.
55. Pueppke, S.G. and Broughton, W.J. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:293–318.
56. Rainey, P.B. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 1:243-257.
57. Rajendhran, J. y Gunasekaran, P. 2008. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv.* 26:576-590.

58. Riaz, K., Riaz, K., Elmerich, C., Raffoux, A., Moreira, D., Dessaux, Y., Faure, D. 2008. Metagenomics revealed a quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 73:3-6.
59. Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., Handelsman, J. 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6:981-989.
60. Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2541-2547.
61. Roulin, A., Piegu, B., Fortune, P.M., Sabot, F., D'Hont, A., Manicacci, D. and Panaud O. 2009. Whole genome surveys of rice, maize and sorghum reveal multiple horizontal transfers of the LTR-retrotransposon Route 66 in Poaceae. *BMC Evol. Biol.* 58:1-10.
62. Rudney, J.D., Xie, H., Rhodus, N.L., Ondrey, F.G., Griffin, T.J. 2010. A metaproteomic analysis of the human salivary microbiota by three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Mol. Oral. Microbiol.* 25:38-49.
63. Santos Pontes, D., Lima-Bittencourt, C.I., Chartone-Souza, E., Amaral Nascimento, A.M. 2007. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:463-473.
64. Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., Paul, M. 2003. Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 6849-6854.

65. Schmidt, T.M., Delong, E.F., and Pace, N.R. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S ribosomal-RNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173: 4371–4378.
66. Shaharoon, B., Jamro, G.M., Zahir, Z.A., Arshad, M., Memon, K.S. 2007. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:1300-1307.
67. Shewry, P.R. 2009. Wheat. *J. Exp. Bot.* 60:1537–1553.
68. Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Soberón, X., Dirzo, R., Elser, J.J. 2006. An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:6565-6570.
69. Starkenburg, S.R., Chain, P.S.G., Sayavedra-Soto, L.A., Hauser, L., Land, M.L., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Klotz, M.G., Bottomley, P.J., Arp, D.J. and Hickey W.J. 2006. Genome Sequence of the Chemolithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2050-2063.
70. Steinberg, C. 2006. Soil suppressiveness to plant diseases. En: J.D. van Elsas et al. (eds.) *Mod. Soil Microbiol.* II. 455-478.
71. Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G.D. 2010. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life. Sci.* 67:419-431.
72. Tian, X., Cao, L., Tan, H., Han, W., Chen, M., Liu, Y., Zhou, S. 2006. Diversity of cultivated and uncultivated Actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microb. Ecol.* 53:700-707.
73. Timmis, K.N. 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist *par excellence*. *Environ. Microbiol.* 4:779-781.
74. Torsvik, V.J., and Goksoyr, F.L.D. 1990. High Diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.

75. Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., & Richardson, P.M. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*. 428: 37–43.
76. Valencia-Cantero, E., Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yañez, J., Peña-Cabriales, J.J., Farias-Rodríguez, R. 2004. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*. 23:81-88.
77. Valencia-Cantero, E., Hernandez-Calderon, E., Velazquez-Becerra, C., Lopez-Meza J.E., Ruth Alfaro-Cuevas and Lopez-Bucio, J. 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil*. 291:263-273.
78. Validov, S., Mavrodi, O., De La Fuente, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L. and Mavrodi D. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 242: 249–256.
79. Van Elsas, J.D. (2010). A novel protocol for the metagenomic analysis of suppressive soil. *J. Microbiol. Methods*. En prensa.
80. Van Elsas, J.D. Costa, R., Jansson, J., Sjöling, S., Bailey, M., Nalin, R., Vogel, T.M., van Overbeek, L. 2008. The metagenomics of disease-suppressive soils-experiences from the METACONTROL project. *Trends. Biotechnol.* 26:591-601.
81. Velazquez-Sepulveda, I. (2010). Análisis filogenético de la diversidad bacteriana asociada a rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Maestría. IIQB. UMSNH.
82. Venter J. et al. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. 304:66-74.

83. Vuorio, O.E., Kalkkinen, N., Londesborough, J. 1993. Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 216:849–861.
84. Wang, G.Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R.J., Davies, J. 2000. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org Lett.* 2:2401-2404.
85. Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener B.B. Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual review of phytopathology.* 40:309-348.
86. Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc P.J., Mitchell, R.A.C., Powers, S.J., Schluemann, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J. 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149: 1860–1871.
87. Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316-322.