

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR
AREA GENÉTICA
2004

GENETICA MICROBIANA

Material de Apoyo Docente al Curso de Microbiología

Dra. Phd. Silvia Llambí
Prof. Adjunto Area Genética

Contenido:

⇒ **Mecanismos de Intercambio de Información genética. Transposones, mutación bacteriana, Test de Ames, Resistencia microbiana a sustancias antibióticas, biotecnología, direcciones de internet.**

MECANISMOS DE INTERCAMBIO DE INFORMACIÓN GENÉTICA

La transferencia de ADN entre microorganismos puede ocurrir básicamente por cuatro procesos : a) transformación, b) conjugación, c) transducción y d) sexducción. Mediante estos mecanismos los microorganismos pueden incorporar material genético o donar material genético dando lugar a formas recombinantes.

Transformación

Podemos definir el proceso de transformación bacteriana como la capacidad que presenta una bacteria para incorporar un fragmento de ADN que se encuentra en el medio externo. Este mecanismo fue descubierto en el año 1928 por F. Griffith en *Streptococcus pneumoniae* (transformación de cepas rugosas no patógenas a cepas lisas patógenas). Posteriormente Avery, MacLeod y McCarty (1944) demuestran que el principio transformante era el ADN (experiencia que muestra por primera vez que la información genética estaba codificada en las moléculas de ADN).

En el proceso de transformación natural el ADN a ser captado debe encontrarse en estado de doble cadena y el número de moléculas de ADN que puede captar una bacteria es limitado existiendo una cinética de saturación.

El fenómeno de transformación ocurre en varias etapas, y la bacteria que va a recibir el ADN exógeno debe encontrarse en estado "competente" (estado en el cual la bacteria es capaz de incorporar ADN del medio e integrarlo al cromosoma bacteriano).

El estado de competencia depende de varios factores y es diferente para cada especie bacteriana. Los factores que influyen son varios como la densidad celular del cultivo, temperatura, pH, nutrientes (fuente de carbono o de nitrógeno). Las bacterias pueden llegar al estado de "competencia" cuando se acercan al final de la fase de crecimiento exponencial y entran en la fase estacionaria. En el estado de "competencia" en general se encuentran entre un 10% a 20% de la población bacteriana aunque esto puede variar según la especie bacteriana. Por ejemplo el *Streptococcus pneumoniae* el estado competente afecta al 100% de las células

durante la etapa exponencial mientras que el *Bacillus subtilis* solo entre el 1 y el 20% se encuentran en estado competente y este se manifiesta en la etapa estacionaria. El primer paso de la transformación consiste en la unión de la molécula de ADN a la superficie de la célula bacteriana. Por ejemplo el *Streptococcus pneumoniae* presenta entre 20 y 50 puntos de unión. Una vez que el ADN se une, sufre una serie de cortes en las dos cadenas mediante la acción de endonucleasas. Cuando los fragmentos de ADN entran a la célula, pierden una de las dos cadenas. En el interior de la célula, el ADN forma un complejo con proteínas quedando protegido de la ADNasa I.

Existe en este momento un estado denominado fase de eclipse cuando el ADN que entró por transformación (exogenote) si sale de la célula no va a poder ejercer el efecto transformante.

Este ADN posteriormente se integra al cromosoma bacteriano en zonas de homología de secuencias.

Conjugación

Lederberg y Tatum en 1946 descubren un proceso por el cual las células de *E. coli* pueden intercambiar material genético mediante un contacto físico entre ellas (fig 1). Hoy día este fenómeno tiene gran importancia evolutiva y ecológica puesto que la transferencia de ADN puede establecerse no solo entre células de la misma cepa bacteriana sino entre especies distintas y alejadas evolutivamente. El plásmido F conocido originalmente como factor de fertilidad fue el primero que se descubrió que podía pasar de una bacteria donante a una receptora mediante el mecanismo de conjugación (fig 2).

El plásmido F es de tipo conjugativo y tiene la capacidad de interactuar con el cromosoma bacteriano e integrarse en él (forma denominada "episoma")

El contacto físico se establece mediante la formación de un "pelo" o "pili" sexual constituido por proteínas. Para la formación del "pili" intervienen no menos de 16 productos génicos. Dentro de las bacterias donantes se pueden diferenciar tres tipos 1) las F^+ , que presentan al plásmido F y pueden transferirlo, 2) las Hfr (células de alta frecuencia de recombinación) que contienen al factor F integrado en su propio cromosoma bacteriano, y lo pueden transferir junto con genes bacterianos, y 3) las F' (F-prima) que son células Hfr que portan el genoma del factor F pero este tiene la capacidad de excindirse y recircularizarse (forma de plásmido) llevando consigo genes bacterianos. El primer factor F-prima (F') fue aislado por Jacob & Adelberg y llevaba genes del operón *Lac*. A este fenómeno de transferencia de F' de una bacteria donante a una receptora se le conoce con el nombre de **sexducción**. A las bacterias receptoras se le denomina F^- , ellas no contienen al plásmido F y lo reciben de las bacterias donantes. Previo al proceso de conjugación, el Plásmido F se replica y transfiere su información a la célula F^- convirtiéndola en F^+ sin perder ella misma dicha capacidad.

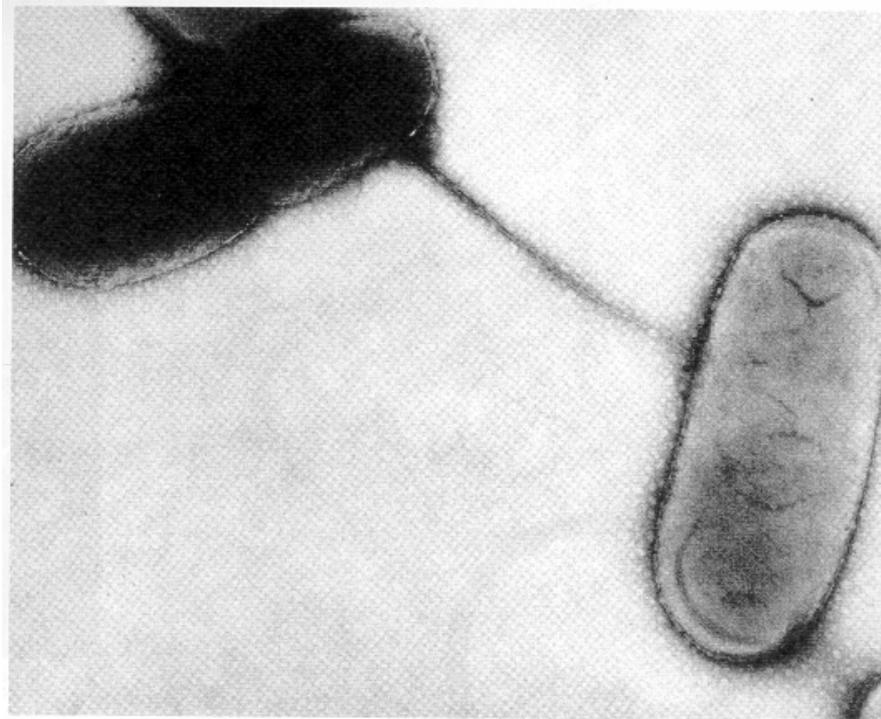


Fig 1: Observación al microscópio electrónico del mecanismo de Conjugación.

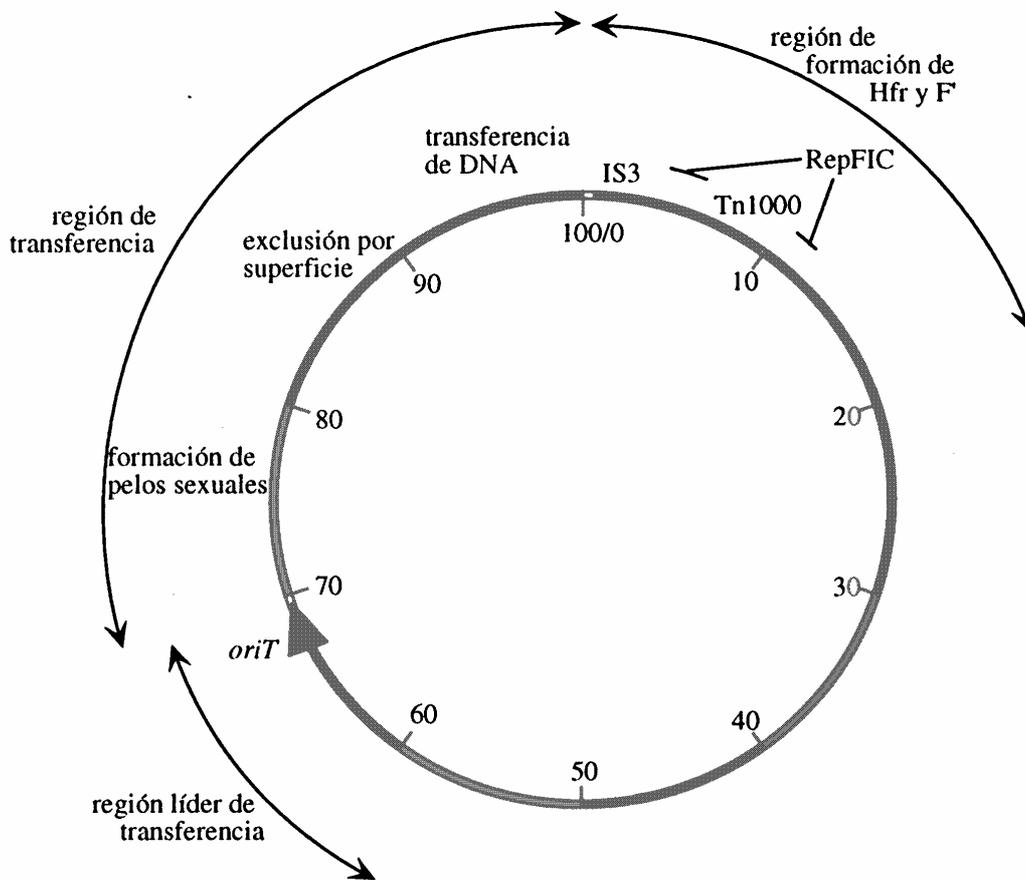


Fig 2 : Mapa físico y funcional del plásmido F (100 Kb).

Transducción

Este mecanismo se puede definir como la transferencia de material genético no vírico de una bacteria a otra por intermedio de un bacteriófago. Estos fagos llevan la información genética de la bacteria en el interior de su cápsida (partículas transductoras) (fig 3).

Originalmente este fenómeno se describió en *Salmonella* aunque hoy se conoce en distintas especies bacterianas. Varios fagos presentan capacidad transductora como el P1, T4, Mu y el fago λ . Existen dos tipos de transducción: a) la transducción generalizada en la cual el fago puede portar un fragmento cualquiera del genoma bacteriano, b) la transducción especializada en la cual el fago lleva información de regiones específicas del cromosoma bacteriano (ej el operón *gal* de *E.coli* en el fago λ) pudiendo transducir e infectar.

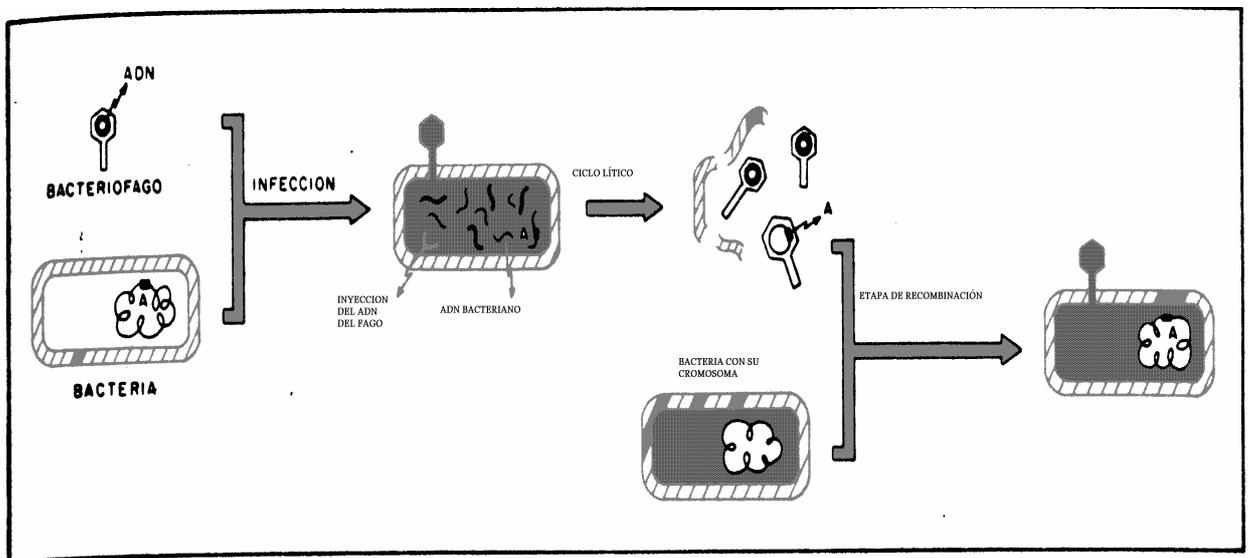


Fig 3: Esquema general del proceso de transducción.

TRANSPOSONES

Se conocen también con el nombre de elementos genéticos móviles, genes saltarines, casetes, etc. Los primeros genes saltarines los descubrió Barbara McClintock en la década del 40 cuando estudiaba la genética del maíz y en 1967 se descubren en organismos procariontes (*E.coli*). Son secuencias de ADN que tienen la capacidad de saltar de un lugar a otro del genoma. Los transposones

más simples se denominan elementos IS (secuencias de inserción) y presentan una región central de 700 a 1500 bp rodeados de una secuencia invertida de 10 a 30 bp. En la región central se encuentran los genes encargados de realizar el salto o transposición. También se encuentran los llamados transposones compuestos que presenta una región central rodeada por dos elementos IS, estos transposones llevan información genética adicional. En el mecanismo del salto o transposición intervienen enzimas tales como la transposasa (produce cortes) y la resolvasa (actúa en el proceso de recombinación).

En algunos casos el elemento móvil puede replicarse antes de saltar dejando una copia en el lugar original mientras que otras veces puede saltar sin dejar copia e insertarse en otra región del genoma. Estos elementos genéticos móviles los podemos encontrar tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos y pueden ser transferidos entre bacterias por los mecanismos de conjugación, transducción y transformación.

MUTACIÓN EN MICROORGANISMOS

El material genético de un microorganismo puede alterarse por factores endógenos (origen espontáneo) o exógenos (origen inducido). Existen distintos niveles mutacionales, por ejemplo cuando la mutación tiene un efecto puntual en un gen se denomina mutación génica mientras que si esta afecta a diversas partes del genoma, la denominamos mutación genómica. Si la mutación afecta la estructura del cromosoma (en bacterias) o de los cromosomas (microorganismos eucariotas; levaduras) las denominamos mutaciones cromosómicas. Al hablar de mutaciones en microorganismos debemos tener en cuenta la variabilidad microbiana existente así como el tamaño de sus genomas (Tabla 1).

Microorganismos	Tamaño del genoma (Mb)	Proporción del genoma codificante de proteínas	Número de proteínas por genoma
<i>E. coli</i>	4.64	88	4288
<i>H. influenzae</i>	1.83	85	1703
<i>H. pylori</i>	1.70	91	1590
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0.82	89	677
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.1	72	5885

Tabla 1: Comparación de genomas de distintos microorganismos

Las mutaciones que afectan al fenotipo del microorganismo nos permiten diferenciarlo en algún carácter en particular respecto del microorganismo con fenotipo "normal" que sirve de referencia (fenotipo silvestre).

En última instancia los fenómenos mutacionales tienen su efecto a nivel de la molécula de ADN y pueden verse alteradas secuencias o elementos necesarios para la expresión de un gene o de varios genes (promotores, secuencias reguladoras, terminadores, etc.). Por otro lado las mutaciones pueden afectar secuencias moduladoras tales como operadores.

Las células bacterianas crecen y se dividen de tal forma que en uno o dos días una célula origina millones de ellas, todas genéticamente idénticas (clones). Las células que derivan de una de ellas se mantienen juntas formando la colonia bacteriana (visible al ojo humano, aproximadamente 10 millones de bacterias). Por lo tanto la colonia constituye la unidad más importante para la identificación de células mutantes. Uno de los desafíos del genetista microbiano consiste en diseñar estrategias experimentales para el reconocimiento de colonias mutantes; a tales efectos se emplean los procesos de réplica, selección y contraselección (Fig 4).

Actualmente existe tecnología adecuada y costosa para poder identificar células mutantes en forma separada o sea que mediante estos métodos, la célula pasaría a ser la unidad de identificación de fenotipos mutantes.

Una de las técnicas de análisis reciente de células es la citometría de flujo; que consiste en tratar a una población celular con un agente mutagénico y luego se hace pasar por un tubo capilar iluminado por un rayo de luz que analiza varios parámetros celulares (tamaño, transparencia celular, emisión de fluorescencia). Posteriormente mediante un sistema separador es posible obtener células aisladas con diferentes características. La posibilidad de marcar a las células con compuestos fluorescentes aumenta las posibilidades de separación de las mismas en un citómetro de flujo.

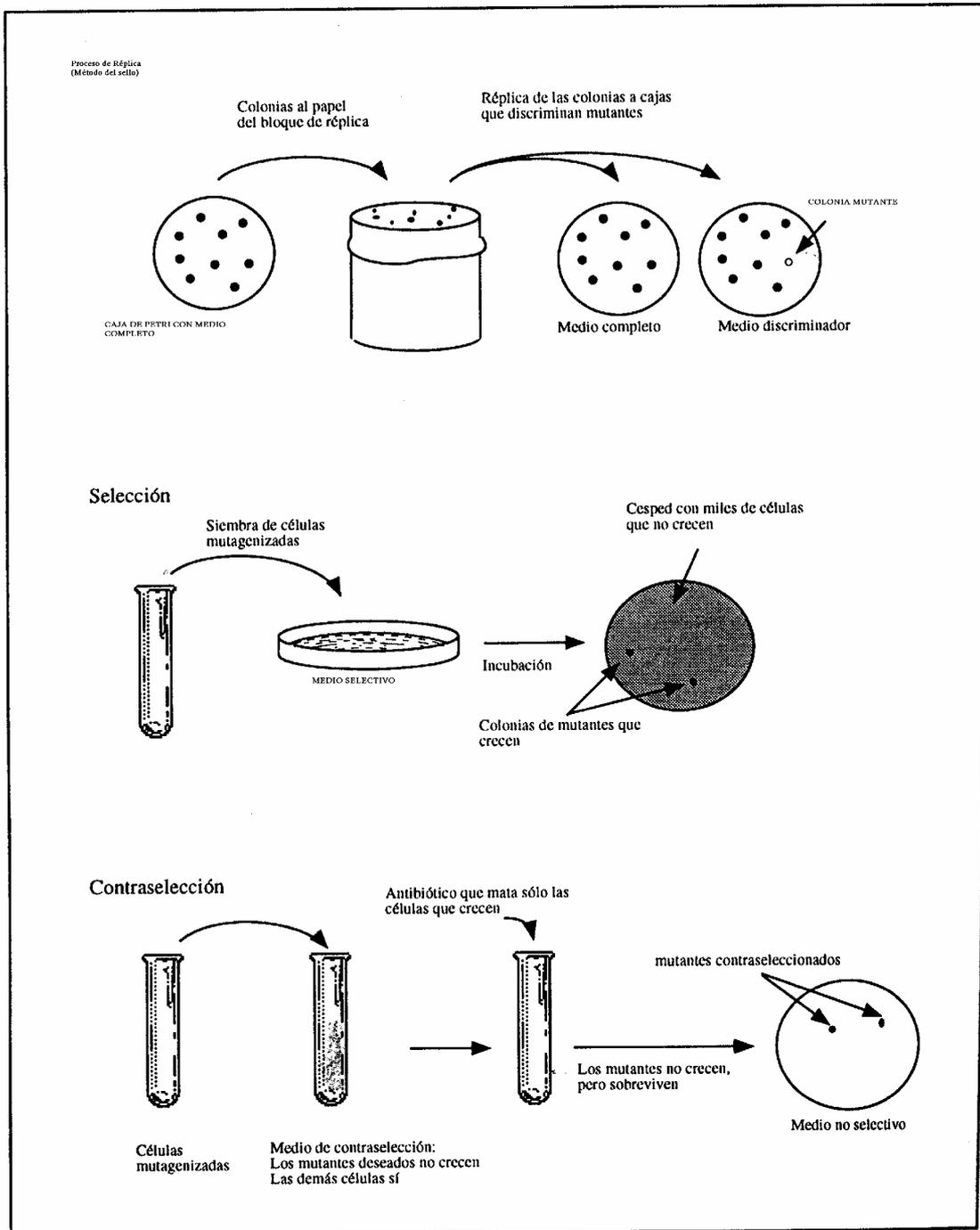


Fig 4: Procedimientos para la búsqueda de colonias mutantes. Mediante la réplica se comparan copias idénticas de colonias en dos o más cajas de Petri con distintos medios de cultivo (por ejemplo: medio completo y medio mínimo para identificar mutantes auxótrofos) o también con igual medio de cultivo pero distintas

condiciones de temperatura (por ejemplo: cultivos a 30° C y cultivos a 40° C, para identificar microorganismos termosensibles). El sistema de selección utiliza el agregado de sustancias que matan a unas células mientras que otras no se ven afectadas. El sistema de contraselección se utiliza para la identificación y análisis de las colonias mutantes ya que se eliminan primero las que crecen y posteriormente se dejan crecer en condiciones óptimas a las colonias supervivientes.

Protótrofo: Cepa de microorganismo capaz de crecer en un medio mínimo definido a partir del cual puede sintetizar la totalidad de las moléculas biológicas complejas que requiere.

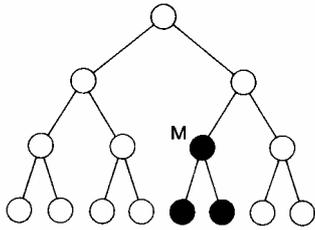
Auxótrofo: Cepa de microorganismo incapaz de sintetizar una molécula orgánica determinada necesaria para su crecimiento. Se produce su crecimiento cuando se suministra en el medio de cultivo el compuesto requerido.

¿Son frecuentes las mutaciones?

En general las mutaciones espontáneas son poco frecuentes. Para cuantificar las mutaciones se suelen usar dos parámetros a) tasa de mutación, y b) frecuencia de mutación.

La tasa de mutación nos mide la tendencia que tiene un gen de sufrir mutaciones, y se expresa como el número de mutaciones que ocurren por cada unidad que mida la oportunidad de mutar. Dicha unidad puede ser el tiempo de generación celular o de división celular (tiempo biológico).

Por frecuencia de mutación se entiende como la frecuencia de aparición de un mutante en la población final de bacterias.



Ejemplo: Tasa de mutación será el cociente entre un evento mutacional (M) en 7 divisiones celulares reales. Mientras que la frecuencia mutacional se calculará como el cociente entre la frecuencia de células mutadas en el total final de la población ($2/8 = 0.25$).

Tasas mutacionales en *Escherichia coli*

Fermentación de lactosa	$lac \rightarrow$	lac^+	2×10^{-7}
Auxotrófia para histidina	$his^- \rightarrow$	his^+	4×10^{-8}
	$his^+ \rightarrow$	his^-	2×10^{-6}

Tasa= células mutantes por división celular.

Test de AMES

Dicho test fue desarrollado por el microbiólogo Bruce Ames con la finalidad de poder determinar el poder mutagénico de determinadas sustancias químicas. Este nos permite en forma rápida evaluar aquellas sustancias químicas que pueden tener poder carcinogénico.

En este tipo de análisis se parte de la premisa de que si una sustancia química ocasiona daño en el ADN con un efecto mutagénico, también pueden llegar a tener un efecto carcinogénico. A pesar de esto existen sustancias que causan cáncer en animales de laboratorio y son negativas al mismo.

En el test de Ames se emplean diferentes cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* de las cuales se le conocen los tipos de mutaciones que presentan. Estos mutantes han perdido la capacidad de sintetizar el aminoácido histidina (His) por lo tanto se dice que son histidina auxotróficos (His⁻) pues solo crecen en medios de cultivo a los que se les adiciona dicho aminoácido. Las cepas salvajes de *Salmonella typhimurium* contienen todas las enzimas necesarias para fabricar el aminoácido His (cepas prototróficas, His⁺).

Por lo tanto se evaluara la capacidad o habilidad que presentan determinados compuestos químicos para producir mutaciones revertientes (back mutation) o sea que las cepas mutantes histidina auxotróficas reviertan a cepas salvajes de *Salmonella typhimurium* (prototróficas) (Fig 5).

Los principales tipos de mutaciones observadas son a) de cambio del marco de lectura de genes, que traen como consecuencia una traducción errónea de los mismos y b) mutaciones puntuales con sustitución de una base produciendo un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por dicho gen.

Las cepas de *Salmonella typhimurium* que se utilizan en el test han sido seleccionadas basándose en la sensibilidad a sufrir mutaciones. Estas cepas presentan una serie de características: a) un aumento de la permeabilidad de la pared celular para permitir el ingreso rápido de la sustancia a testar (mutantes **rfa**), b) mutaciones en el sistema de reparación de daños en el ADN (mutantes **uvrB**), c) plásmidos R y plásmidos multicopias que agregan errores durante la acción del sistema reparador de daños del ADN. Estas cepas se conocen con el nombre de TA97A, TA98, TA100, TA102 y TA1535.

Con el correr de los años se observó que existían sustancias que si bien no eran mutagénicas pero que al ser metabolizadas en organismos superiores producían metabolitos intermediarios que si tenían capacidad mutagénica y podían ser potenciales carcinógenos. Para solucionar parcialmente este problema; al medio de cultivo empleado en el test de AMES se le adicionó una mezcla de enzimas de hígado de rata para simular el metabolismo que sufre la sustancia en un organismo superior. Este sistema que simula al hígado de un mamífero se conoce

con el nombre de S-9 y nos permite detectar metabolitos intermediarios posiblemente carcinogénicos.

Las ventajas del empleo de dicho test son muchas: es rápido (las bacterias crecen y se dividen rápidamente), es muy simple (El tiempo aproximado para obtener un resultado final en este test es de 30 días), tiene bajo costo económico, es posible testar varias sustancias al mismo tiempo, utilizando las mismas condiciones es repetible el resultado obtenido.

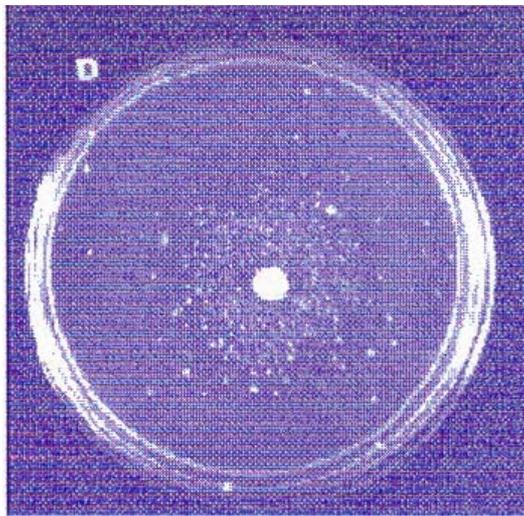


Figura 5: Se observa una versión cualitativa del test de Ames. En la placa de Petri se sembraron cepas de *Salmonella typhimurium* que requieren His para su crecimiento (auxotróficas, His⁻). El disco de papel blanco está impregnado con una sustancia carcinogénica (2-aminofluorine). Dicha sustancia produce un efecto mutagénico en dicha cepa y se observa crecimiento de diversas colonias alrededor del disco (los mutantes His⁻ mutan a cepas prototróficas que crecen en un medio carente de His).

Resistencia Microbiana a sustancias antibióticas

En los últimos años el avance de la industria farmacéutica permitió generar nuevos antibióticos artificiales para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Por otra parte esto generó una adaptabilidad de los microorganismos producto del desarrollo de resistencia. Durante los años de 1940 al 1950 el uso de las sulfamidas y penicilinas produjo el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a esas drogas constituyendo un serio problema.

En Inglaterra el uso de penicilina G produjo en los *staphylococcus aureus* un aumento de la frecuencia de cepas resistentes del 10% al 60%. Existe una fuerte base genética que permite explicar la resistencia bacteriana a determinadas drogas. Dentro de los mecanismos genéticos-moleculares podemos citar: 1) la capacidad de que se generen nuevas mutaciones en genes localizados en el cromosoma bacteriano, 2) introducción de plásmidos R. Estos pueden pasar de una cepa bacteriana a otra mediante conjugación.

Los plásmidos R presentan una serie de ventajas adaptativas: a) han evolucionado como respuesta a la presión selectiva del ambiente como ser, los distintos antibióticos utilizados por humanos, b) presentan genes de resistencia a múltiples sustancias antibióticas, c) pueden trasladarse entre bacterias de la misma especie o de especies diferentes, d) presentan elementos genéticos móviles o transposones, e) al no existir presión selectiva (utilización de antibióticos) las células bacterianas los van perdiendo como una forma de "economía" f) no interfieren con otros genes bacterianos por lo cual las bacterias se desarrollan normalmente mostrando todo su potencial fenotípico.

En el tema de la resistencia, los seres vivos más abundantes del planeta (las bacterias) nos permiten comprobar la teoría "Darwiniana" de la supervivencia de los más aptos. Como mecanismos bioquímicos implicados en el fenómeno de la resistencia podemos citar: disminución en la permeabilidad a absorber el antibiótico, inactivación enzimática de la sustancia antibiótica, modificación del "blanco" o "diana" sobre la que actúa el antibiótico, síntesis de una enzima de resistencia.

La disminución de la permeabilidad puede estar dada por: modificaciones a nivel de la membrana externa (barrera natural), por la existencia de mecanismos de bomba de expulsión que envía al exterior al antibiótico luego de su entrada, alteraciones en el mecanismos, por alteraciones en el mecanismo de transporte del antibiótico.

En el caso de las tetraciclinas por ejemplo hay bacterias que presentan transposones tipo el Tn10 o el Tn1721 que codifican proteínas con la función de expulsar al antibiótico desde el interior al exterior de la célula. En el caso de los antibióticos beta-lactámicos (penicilina, cefalosporina) los plásmidos R presentan genes que codifican para enzimas beta lactasas (penicilasas, cefalosporinasa) que abren el anillo lactámico y hacen que el antibiótico pierda su acción. En el caso de la resistencia generada al cloranfenicol , esta viene dada por una enzima inactivante del mismo, denominada cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT). Uno de los genes que codifica para la CAT forma parte del transposón Tn9 . La presión selectiva continúa va generando nuevos mecanismos de resistencia como la creación de nuevas enzimas resistentes.

RESISTENCIA BACTERIANA Y SU RELACIÓN CON LA BIOTECNOLOGÍA

La construcción biotecnológica a gran escala de plantas modificadas genéticamente (plantas transgénicas) plantea una serie de problemáticas. Una de ellas es la posibilidad de generar resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias que habitan el mismo ecosistema. Este fenómeno podría producirse mediante la migración de genes de resistencia antibiótica desde la planta transgénica a las bacterias.

Este efecto boomerang (retorno de los genes hacia las bacterias) podría generar bacterias con alta resistencia a los antibióticos, patógenas para el hombre y los animales (Fig 6).

El proceso de transgénesis supone la introducción de un gen extraño, llamado transgén en el genoma de un organismo vivo. Este transgén aportará una ventaja

ecológica, nutricional, farmacéutica, o permitirá avanzar en las investigaciones sobre regulación génica en eucariotas. Para la realización de este proceso en los laboratorios de biología molecular es necesario manipular los genes para obtener la clonación de los mismos. Esta técnica exige el uso de vectores de clonación portadores de genes de resistencia a sustancias antibióticas (tabla 2).

Nombre del gen	Confiere resistencia a:	Planta transgénica portadora del gen
<i>Bla</i> TEM-1	Penicilina G, ampicilina, amoxycilina	Maíz
<i>aph 3'-2 (NPTII)</i>	Kanamicina, neomicina	Tomate
<i>Aph 3'-3</i>	Amikacina	Tomate
<i>Aad 9</i>	Estreptomycin, espectinomycin	Algodón

Tabla 2: genes de resistencia a sustancias antibióticas más frecuentemente utilizados en los procedimientos de transgénesis en vegetales.

Actualmente se ha demostrado que las transferencias de ADN pueden establecerse entre reinos muy alejados como el procariota (bacterias) y el reino vegetal. En este caso estaríamos hablando de transferencia entre un organismo eucariota (planta transgénica) y un organismo procariota (bacteria). Dicho proceso se muestra favorecido por el cultivo intensivo de una planta que porta un gen de resistencia a un antibiótico provocándose un aumento del número de copias de este gen en el ecosistema. En teoría este proceso es totalmente viable de ahí la preocupación de las empresas biotecnológicas destinadas a la producción de plantas mejoradas por estas técnicas.

La transferencia horizontal de información genética se efectúa en tres etapas: a) transferencia del ADN, b) estabilización del mismo en un nuevo ser vivo (huésped receptor), c) expresión del gen en dicho huésped.

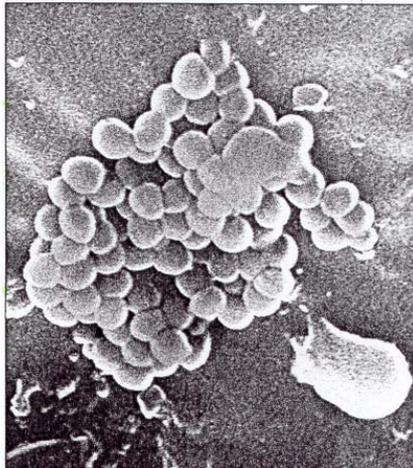


Fig 6: Bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*) que desarrollan una resistencia cada vez mayor a los antibióticos de uso frecuente. Problema preocupante en hospitales de salud humana y salud animal.

¿Cómo puede transferirse un gen de resistencia antibiótica desde una planta transgénica a una bacteria?

El efecto boomerang del cual hablamos puede producirse por dos mecanismos. El primero de ellos podría ocurrir en el tubo digestivo de animales o seres humanos que ingieren una planta transgénica o un derivado de la misma. Pensemos que en el tubo digestivo encontramos una gran variedad de cepas bacterianas comensales que se encuentran en distintos estados fisiológicos. Algunas bacterias podrían encontrarse en estados de competencia donde por permeabilidad pueden recibir un gen codificador de resistencia antibiótica liberado por la planta durante la digestión (ej. gen *bla* *TEM-1* de 858 bp). A su vez el contacto íntimo entre las bacterias podría favorecer el intercambio de este material genético dentro del tubo digestivo (transferencia horizontal entre distintas especies bacterianas) generándose cepas resistentes. El segundo mecanismo mediante el cual puede generarse el efecto boomerang sería el pasaje de genes desde la planta transgénica en descomposición (raíces) hacia bacterias del suelo. Este mecanismo se ve favorecido por la resistencia y estabilidad de la molécula de ADN en los suelos y por la eficacia de las bacterias del suelo para incorporar material hereditario.

¿Cómo puede estabilizarse el o los genes de resistencia incorporados?

La estabilización de dichas secuencias de ADN puede realizarse por la llamada recombinación homóloga entre secuencias que están a ambos lados del gen de resistencia y el ADN de la célula bacteriana receptora. Holliday en 1964 propone un modelo de recombinación mediante el proceso de rotura-reunión donde se constituye un ADN híbrido e intervienen una serie de proteínas (RecA, RecBCD, ligasas) (fig 7). En este proceso de estabilización, el gen se incorporará al cromosoma bacteriano y se transmitirá a la descendencia de manera estable. Otro de los procesos de estabilización de material genético extraño puede darse a través de elementos genéticos móviles (transposones) o plásmidos no

integrativos. En estos casos la transmisión puede ser vertical (a la descendencia) u horizontal (entre bacterias).

¿Qué alternativas existen para evitar estos problemas?

Si bien los genes de resistencia a sustancias antibióticas son los más utilizados como marcadores de selección en las técnicas de ingeniería genética, una de las alternativas viables sería sustituir a dichos marcadores por otros menos problemáticos. Actualmente se empezó a utilizar un gen de resistencia a un herbicida que sería de mayor utilidad en los procesos de selección de plantas transgénicas.

Otra solución sería realizar construcciones separadas o sea el gen marcador y el gen de interés (transgén) e integrarlos en sitios diferentes del genoma para posteriormente realizar cruzamientos entre estas plantas transgénicas y seleccionar aquellas que solo heredan el transgén y no el gen marcador.

La tercer alternativa consistiría en colocar a ambos lados del gen marcador secuencias especiales que posteriormente con la utilización de enzimas de restricción se podrían cortar y eliminarlas junto con el gen marcador.

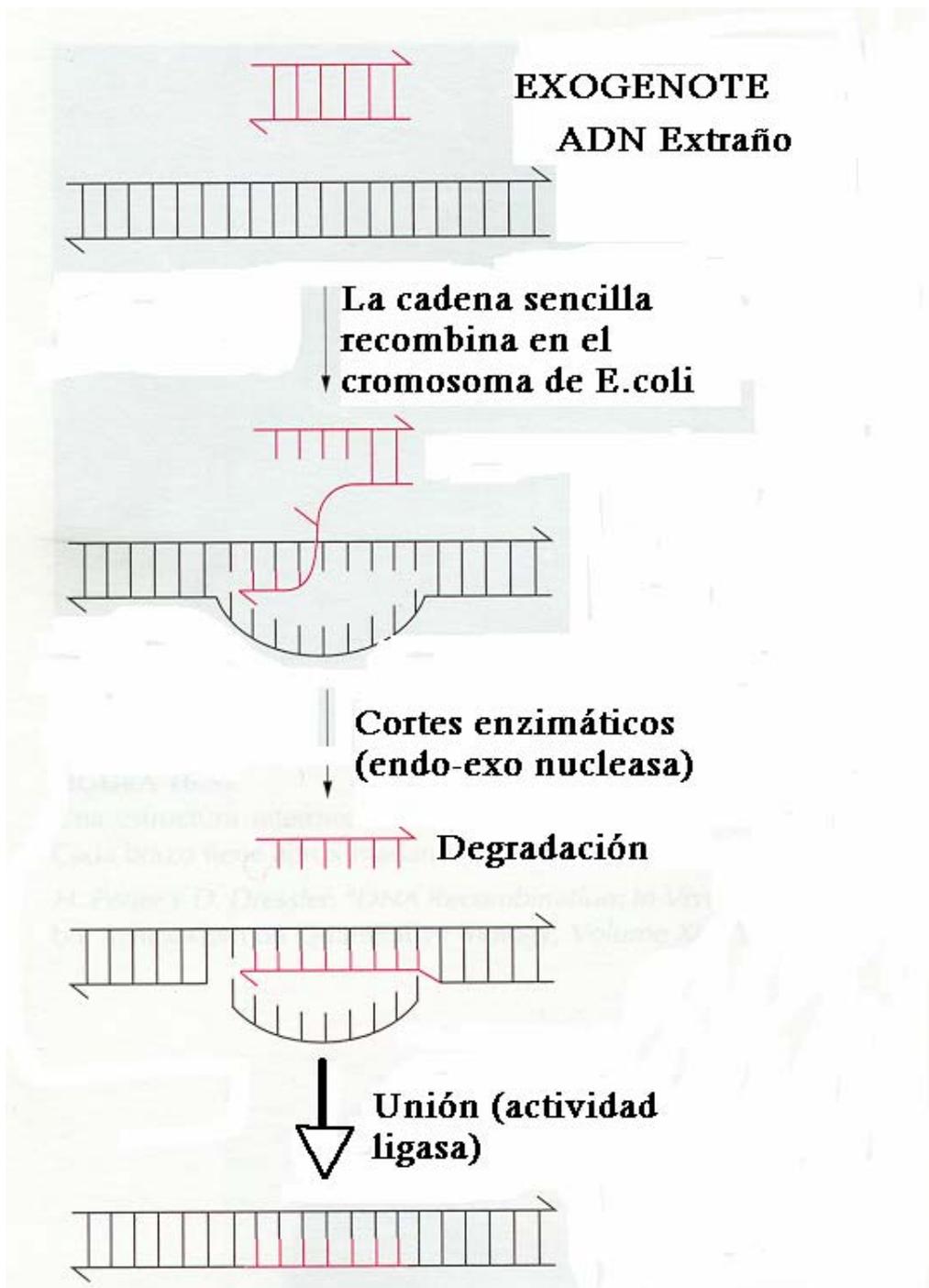


Fig 7: Modelo de Holliday para explicar los fenómenos de recombinación genética.

DIRECCIONES DE INTERNET DE IMPORTANCIA EN GENÉTICA MICROBIANA

<i>Dirección Internet</i>	<i>Comentario</i>
www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genomes/bacteria	GenBank, secuencia completa de <i>E. coli</i> y otras bacterias.
genome4.aist-nara.ac.jp	Secuencia completa de <i>E. coli</i> y análisis en red.
susi.bio.uni-giessen.de/ecdc.html	Secuencia completa de <i>E. coli</i> y análisis en red.
www.neb.com/rebase	Lista actualizada de enzimas de restricción con sus secuencias de reconocimiento, origen y comercialización.
http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html	EMBL, análisis de secuencias de DNA y proteínas.
http://sun1.bham.ac.uk/bcm4ght6/res.html	Bases de datos, protocolos de trabajo, grupos de investigación, compañías, etc, relacionados con <i>E. coli</i> .
http://www.ai.sri.com/ecocyc/ecocyc.html	Enciclopedia de los genes y de todo el metabolismo de <i>E. coli</i> .
http://cgsc.biology.yale.edu/cgsc.html	<i>E. coli</i> Stock Center, base de datos de estirpes y mutantes de <i>E. coli</i> .
http://www.horizonpress.com/gateway/protocols.html	Protocolos, libros y revistas de Biología Molecular.
http://expasy.hcuge.ch/	Servidor de Biología Molecular.
http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/lists?pombe.txt	Listado e información de todos los genes de <i>S. pombe</i> clonados.
http://gene-www.Stanford.edu/Saccharomyces	Información sobre todo el genoma de la levadura <i>S. cerevisiae</i> .
httpd-usr@sanger.ac.uk	Información sobre todo el genoma de la levadura <i>S. pombe</i> .

<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/genomics/genomes.html> **(secuenciación de genomas)**

<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/> **Genética microbiana**

<http://www.ucm.es/info/mfar/enlaces.htm> **(direcciones útiles en internet).**

<http://www.microbeworld.org/> **(portal de microbiología)**

BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Courvalin, P. Plantas Transgénicas y antibióticas. Mundo Científico. 192, 20-23, 1998.
- 📖 Griffiths y col. Genética. Editorial Interamericana. McGraw-Hill. 1995.
- 📖 Iañez, E. Curso de microbiología general. (1998). Web-internet. eianez@goliat.ugr.es.
- 📖 Pellón, J. La ingeniería genética y sus aplicaciones. Editorial Acribia. 1986.
- 📖 Sánchez, A & Martínez, J. Genética microbiana. Editorial Síntesis. 1998
- 📖 SRB, A; Owen, R & Edgar, R. Facetas de la Genética. Selecciones de Scientific American. 1978.
- 📖 Stanfield, D. Genética. Editorial Losa. 1992.
- 📖 Tamarin, R.H. Principios de Genética. Editorial Reverté, S.A. 1997.