

24
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE GENES ESPECIFICOS
 QUE SE EXPRESAN DURANTE LA SIMBIOSIS DE
 Rhizobium phaseoli**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A
ALMA IRMA AYALA LOPEZ

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
- Fijación de nitrógeno	1
- Simbiosis planta-bacteria	2
- Introducción al proyecto	8
- Objetivo	8
MATERIALES Y METODOS	11
- Pregerminación del frijol	11
- Siembra en las macetas	12
- Crecimiento en vida libre de <u>Rhizobium phaseoli</u>	12
- Inoculación de las macetas	13
- Regado de las macetas	14
- Cosecha de los nódulos	15
- Aislamiento de RNA total de nódulo	15
- Aislamiento de RNA de <u>R. phaseoli</u>	19
- Electroforesis en gel de agarosa en presencia de glioxal para ver la integridad del RNA	21
- Electroforesis en gel de agarosa en presencia de hidróxido de metil mercurio para ver la integridad del RNA	23
- Transferencia tipo northern	25
- Marcaje radioactivo del RNA con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$	25
- Hibridización en colonia	26
- Prehibridización e hibridización en presencia de formamida	27

- Prehibridización e hibridización en buffer fosfatos	29
- Lavado de los filtros después de la hibridización	30
- Aislamiento de plásmidos recombinantes	31
- Extracción de DNA total de <u>R. phaseoli</u>	36
- Digestiones de DNA con endonucleasas de restricción	38
- Electroforesis de DNA en gel	39
- Transferencia a filtros de nitrocelulosa tipo Southern	40
- Técnica de "nick translation"	42
- Técnica de Hirsch - Aislamiento de plásmidos de cepas de <u>Rhizobium</u>	42
- Eckhardt - electroforesis de plásmidos de <u>Rhizobium</u>	44
- Aislamiento de RNA de bacteroide	46
 RESULTADOS	 48
- Análisis comparativo de la información genética que se expresa en la bacteria y en el bacteroide	48
- Identificación de genes de <u>R. phaseoli</u> que se expresan durante la simbiosis	49
- Selección de clonas específicas de nodulación	50
- Localización de las clonas seleccionadas en los plásmidos de <u>R. phaseoli</u>	51
- Análisis de la organización genómica de las posibles clonas simbióticas	53
 DISCUSION	 58
 LITERATURA CITADA	 65

ESQUEMA

- 1. Eventos metabólicos que se llevan a cabo en el nódulo maduro 76

FIGURAS

- 1. Estrategia experimental 77
- 2. Análisis comparativo de la información genética que se expresa en la bacteria y en el bacteroide 78
- 3. Patrones de restricción de algunas de las clonas seleccionadas 79
- 4. Localización de las posibles clonas simbióticas en plásmidos de R. phaseoli 80
- 5. Organización genómica de las clonas simbióticas 81
- 6. Reiteraciones de las clonas simbióticas 82

TABLAS

- I Clasificación de Rhizobium de acuerdo al tipo de leguminosa que infecta 83
- II Selección de clonas que se expresan específicamente en el nódulo 84

INTRODUCCION

FIJACION DE NITROGENO

El nitrógeno gaseoso es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre, sin embargo muy pocos son los organismos capaces de reducirlo a amonio (fijación de nitrógeno) e incorporarlo en compuestos orgánicos (asimilación de nitrógeno) (1).

La enzima nitrogenasa es la responsable de la reducción del nitrógeno atmosférico hasta amonio; lo cual involucra la ruptura de un triple enlace y un alto gasto energético (2, 3). A través de este proceso algunos organismos obtienen de la atmósfera el nitrógeno necesario para biosíntesis de macromoléculas. Los organismos que pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno son únicamente microorganismos procarióticos que incluyen bacterias y algas azul verdes (1). Algunos de estos microorganismos fijan nitrógeno en vida libre (4) y hay otros que sólo pueden hacerlo en asociaciones simbióticas (5, 6). En el último caso, se encuentran los actinomicetos que fijan nitrógeno asociados con las angiospermas formando nódulos en su raíz (7b). Otro ejemplo de esto son las bacterias gram negativas del género Rhizobium que para poder fijar nitrógeno requieren interactuar con las leguminosas a través de formar nódulos en la raíz (7a, 8).

SIMBIOSIS PLANTA-BACTERIA .

Uno de los ejemplos mejor estudiados de la relación planta-bacteria, es el de la simbiosis entre Rhizobium y las leguminosas (7a, 8). La interacción entre la bacteria y la planta es específica. Ambos organismos han desarrollado un sistema de reconocimiento, hasta ahora desconocido, que les permite distinguirse de otras plantas y otros microorganismos del suelo. Las diferentes especies de Rhizobium se clasifican en base al tipo de huésped al cual son capaces de nodular (Tabla 1).

La interacción de Rhizobium con las leguminosas tiene como resultado la formación del nódulo y la fijación de nitrógeno en éste.

Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento, la bacteria infecta a su huésped a través de los pelos radicales. La primera respuesta de la planta a la infección es el enroscamiento de estos pelos. Los nódulos de la raíz se producen como consecuencia de la invasión bacteriana a las células corticales.

A través de invaginaciones de la pared celular vegetal se da lugar a la formación del hilo de infección; hay entonces inducción de actividad meristemática en las células de la corteza de la raíz. Dentro de estas células el Rhizobium se divide hasta ocupar totalmente el citoplasma de la célula. Es aquí cuando el Rhizobium experimenta un aumento de tamaño y se diferencia a bacteroide. Los bacteroides quedan rodeados por membranas

sintetizadas por el huésped. Una vez diferenciado, el Rhizobium sintetiza la enzima nitrogenasa (7a, 8). Esta enzima es capaz de reducir el N_2 a amonio en una reacción que involucra un gran gasto energético (2, 3). En todos los organismos que fijan nitrógeno atmosférico, otro producto de la reacción de la nitrogenasa es el hidrógeno gaseoso el cual puede disipar hasta un tercio de la energía que se gasta en la reacción de la nitrogenasa. Algunas bacterias que fijan nitrógeno, incluyendo ciertas cepas de Rhizobium, poseen una hidrogenasa de captura que hace que el hidrógeno se recicle y entonces parte de la energía que se gasta en la fijación de nitrógeno se recupera.

El amonio formado por la nitrogenasa en la bacteria es excretado al citoplasma de la célula vegetal donde es asimilado (8, 9). La planta por su parte provee a la bacteria de fotosintato, es decir, de la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. En el esquema 1, se muestran algunas de las reacciones metabólicas que ocurren en el nódulo.

Durante este tipo de asociación simbiótica se sintetiza la leghemoglobina, la cual es una proteína que facilita la difusión dosificada de O_2 al Rhizobium; proveyéndolo de O_2 suficiente para su respiración y metabolismo, pero a concentraciones tales que la nitrogenasa no resulte inactivada (7a, 8, 10).

La leghemoglobina sólo se sintetiza durante la simbiosis y en el nódulo es detectable antes de que aparezca la nitrogenasa.

La parte proteica de la leghemoglobina está codificada por la planta y el grupo hemo es sintetizado por la bacteria (11, 12, 13). Parece ser que el grupo hemo es el inductor de la síntesis de la globina (14).

El desarrollo y mantenimiento normal del nódulo implica diferentes etapas que, para que puedan llevarse a cabo en forma adecuada, seguramente requieren de la interacción y función coordinada de ciertos genes y productos génicos de la bacteria y de la planta (15-21).

Se han utilizado diferentes enfoques experimentales para tratar de identificar y aislar genes importantes para la simbiosis en ambos organismos. Sin embargo, hasta la fecha, todavía se sabe muy poco sobre el número, localización y regulación de los genes que participan en el proceso (22-25a).

En las plantas, existe variabilidad genética para responder a una infección por Rhizobium. Diferentes cultivares de la misma leguminosa, tienen distintas potencialidades para responder a la asociación con bacterias simbióticas. Asimismo, algunas cepas de Rhizobium fijan altas cantidades de nitrógeno con un cultivar y no con otro.

Se han identificado genes de la planta involucrados en el proceso de la nodulación, ya que existen plantas mutantes que no pueden ser noduladas (25b).

Una de las estrategias que ha sido empleada para identificar funciones bacterianas necesarias para la formación del nódulo, ha sido la obtención de mutantes de Rhizobium en diferentes pasos del proceso de nodulación. Así se han aislado y caracterizado mutantes con bloqueos en etapas específicas de este proceso (25a). Para la obtención de dichas mutantes se han hecho tratamientos con mutágenos químicos o con transposones, seleccionado el fenotipo mutante en la planta. De esta forma se han aislado mutantes simbióticas de R. meliloti (14, 26-36), de R. leguminosarum (37, 38), R. trifolii (39, 40), R. japonicum (41) y R. phaseoli (42a) (G. Espín, D. Noel, G. Soberón, observaciones no publicadas).

Para el aislamiento de los genes estructurales de la enzima nitrogenasa (nif) también se ha utilizado la mutagénesis con transposones. A partir de estas mutaciones se han clonado los genes mutados y por hibridización se han obtenido los genes silvestres (25-27, 30, 32, 34, 39, 41, 42b-44); se han aislado también en base a que la secuencia nucleotídica de los genes estructurales de la nitrogenasa está conservada en las especies fijadoras de N₂ (45). Los genes estructurales de la nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae ya han sido aislados y clonados en un plásmido (pSA30) (46). Los genes estructurales de la nitrogenasa de diferentes especies de Rhizobium han sido aislados al hibridizar el plásmido PSA30 marcado radioactivamente contra bancos de genes de las diferentes especies (45, 47-58).

En las especies de Rhizobium de crecimiento rápido se ha reportado la existencia de uno o varios plásmidos de un alto peso molecular; en el rango de 90×10^6 - 300×10^6 daltones (42a, 42b, 48, 59-61).

Algunos de los genes de fijación de nitrógeno y los involucrados en nodulación están localizados en estos plásmidos (14, 25a, 30, 34-36, 38, 42a, 42b, 43, 44, 47-58, 61-68a, 69).

Johnston et al (62, 64, 65), fue el primero en demostrar la localización en plásmidos de genes simbióticos. Entre ellos, se encontraron los genes que determinan la especificidad por el hospedero.

Una de las características más interesantes de la fijación simbiótica de nitrógeno es el agrupamiento de los genes simbióticos, incluyendo los genes estructurales de la nitrogenasa, en estos grandes plásmidos (14, 25a, 35, 36, 42a, 46, 48-54, 63, 65-68a).

En la literatura existen evidencias de que los genes involucrados en la nodulación y en la fijación simbiótica de nitrógeno se transcriben preferencialmente en los nódulos (34, 54, 66a). Existen también datos de que los plásmidos se transcriben activamente en el bacteroide; mientras que en la bacteria en vida libre, la transcripción de los plásmidos casi no se detecta (34, 54, 66a). Sin embargo, hay regiones del plásmido simbiótico que se expresan tanto en la bacteria como en el bacteroide (54).

Es importante que una vez que se identifiquen algunos de los genes que se expresan en el nódulo, se determine si su expresión es específica del proceso de diferenciación a bacteroide o si corresponde al establecimiento de la simbiosis per se.

Utilizando cepas de Rhizobium japonicum en microaerofilia, con una fuente de nitrógeno fijada y una fuente de carbono, se han logrado diferenciar bacterias a bacteroides con activa fijación de nitrógeno en vida libre (66b). En un futuro, si se lograra diferenciar a bacteroide a R. phaseoli en vida libre, sería interesante determinar si todos los genes que se expresan en el nódulo, lo hacen en este estado.

En R. leguminosarum y R. meliloti, se ha observado que una región relativamente pequeña del plásmido simbiótico se transcribe activamente en los nódulos (35, 54). Este es el único plásmido que puede considerarse desempeña algún papel en la simbiosis. Hasta la fecha no existe evidencia de que los otros plásmidos tengan algún papel en el estado simbiótico o aún en el crecimiento de la bacteria en vida libre. Más aún, existen cepas de Rhizobium que contienen un sólo plásmido y nodulan y fijan nitrógeno.

El RNA mensajero específico de los genes estructurales de la nitrogenasa sólo se detecta en los bacteroides y no en la bacteria (14, 15, 34, 43, 54, 66a, 68, 68 a y b). En Azotobacter vinelandii, R. meliloti y R. leguminosarum, estos genes estructurales aparentemente se transcriben como parte de un mismo operón (58, 70). Los productos de estos genes, ya han sido analizados en minicélulas (71a, 71b).

INTRODUCCION AL PROYECTO

El cultivo del frijol en México tiene importancia económica, agrónomica y alimenticia por ser parte de la dieta básica de la mayoría de la población (72-74). Es la leguminosa que más se consume en nuestro país (72) y constituye la principal fuente de proteínas para la población de recursos limitados. Es por esto que la asociación simbiótica que se establece entre Rhizobium phaseoli y Phaseolus vulgaris adquiere una particular importancia. El entender y conocer las bases moleculares de esta asociación es un prerrequisito importante para tratar de manipular la fijación simbiótica de nitrógeno y por ende el crecimiento y rendimiento del frijol.

La identificación y el aislamiento de genes bacterianos y vegetales que participan en el establecimiento y mantenimiento del proceso de nodulación son necesarios para el entendimiento más profundo de esta interacción. En este trabajo, el modelo experimental fue la simbiosis que se establece entre R. phaseoli y P. vulgaris.

OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es la identificación y el aislamiento de genes de R. phaseoli que participan en el establecimiento y mantenimiento del nódulo. Para lograr este objetivo, se utilizó un enfoque experimental diferente a la obtención de mutantes, lo que se ha usado extensamente.

La estrategia que se utilizó en este trabajo, puede observarse en la figura 1.

En este trabajo se aislaron genes bacterianos que se expresan específicamente durante el proceso de nodulación, al hibridizar RNA total de nódulo, marcado radioactivamente, con el banco de genes de R. phaseoli construido en el vehículo pBR328 (57).

Las secuencias aisladas en dicha hibridización, se contraseleccionaron con RNA total de Rhizobium crecido en vida libre, con el fin de eliminar aquellos genes que se expresan tanto en la bacteria como en el bacteroide ya que estos se espera no son específicos del nódulo.

Por otro lado, también se analizó si estos genes se localizaban en plásmidos o en el cromosoma de R. phaseoli, marcando radioactivamente cada una de las secuencias e hibridizándolas contra el patrón de plásmidos de la cepa silvestre de R. phaseoli (CFN42). Se estudió además la organización genómica de estas secuencias hibridizando cada una de ellas por separado contra el DNA total de la cepa CFN42, digerido con endonucleasas de restricción.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan las evidencias anteriores que sugieren que el plásmido sim se transcribe preferencialmente en el nódulo. Sin embargo, también mostramos que además de este plásmido, el cromosoma y por lo menos otro plásmido (p42C), se expresan específicamente durante la simbiosis. Esto sugiere que genes localizados en el resto de los plásmidos y aún en el cromosoma posiblemente

tengan un papel durante la simbiosis. Por otro lado, se muestra que la reiteración que se ha encontrado en los genes nif (57) no es una característica particular de estos genes, sino que se presenta también en otras secuencias simbióticas.

El aislamiento y caracterización de genes tanto vegetales como bacterianos que participan en el establecimiento y mantenimiento del nódulo, contribuirá de manera muy importante a un mejor conocimiento de la interacción bacteria-planta.

MATERIALES Y METODOS

PREGERMINACION DEL FRIJOL

Se utilizaron en todos los experimentos, frijoles de la variedad negro jamapa.

Material:

- aproximadamente 300 semillas
- agua corriente
- hipoclorito de sodio al 10%
- agua bidestilada estéril
- cajas de petri de vidrio grandes estériles
- papel Whatman
- pipetas estériles

Los frijoles se remojaron en agua corriente durante 15 minutos, cambiando el agua para lavarlos y ablandar la testa.

Las semillas se esterilizaron durante 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10%.

Se colocaron aproximadamente 50 frijoles en cada caja de petri con papel Whatman y se humedecieron con 15 ml de agua estéril. A las 24 hrs fueron regados con 15 ml de agua estéril, dejándose germinar en la oscuridad durante 48 hrs.

SIEMBRA EN LAS MACETAS

Material:

- macetas
- matriz: vermiculita
- gasa
- solución nutritiva
- agua bidestilada
- autoclave

Las macetas se esterilizaron remojándolas 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio y después se enjuagaron con agua. La vermiculita fue lavada y esterilizada con vapor en la autoclave durante 20' a escape rápido. En el fondo de las macetas fue colocada una gasa, para evitar se drenara toda el agua y se saliera la matriz por abajo.

La vermiculita fue colocada en las macetas.

Los frijoles ya germinados se colocaron con el hipocotilo hacia abajo a una profundidad aproximada de 5 cm de la superficie de la maceta.

Durante la primera semana las macetas se regaron únicamente con agua. A partir de la segunda, se alternó cada tercer día, agua o solución nutritiva.

CRECIMIENTO EN VIDA LIBRE DE Rhizobium phaseoli

Material:

- medio TY:

triptona al 0.5%

extracto de levadura al 0.3%

CaCl₂ 7mM

agar al 1.5% (sólo para preparar medio sólido)

- estreptomycin 20 mg/ml
- cepa CFN42 de R. phaseoli
- incubadora a 30°C
- incubadora con agitación a 30°C

Se prepararon 100 ml de medio TY y esterilizaron 20'.

Se agregó al medio 1 ml de una solución de estreptomycin 20 mg/ml. El antibiótico se adicionó para mantener la presión selectiva sobre la cepa que es resistente y no pierda el marcador. La cepa resistente fue utilizada para que pudiera distinguirse de otras cepas al aislarse de los nódulos.

Con varias asadas de una caja donde había crecido la cepa fueron inoculados 100 ml de medio TY líquido. La cepa se dejó crecer con agitación a 30°C durante toda la noche.

INOCULACION DE LAS MACETAS

Material:

- cultivo de la cepa R. phaseoli CFN42 crecido durante 12 hr en medio TY
- pipetas estériles

Para inocular las macetas, se agregó sobre cada plántula aproximadamente 1 ml del cultivo. Las macetas fueron inoculadas a los 10 días después de germinadas las semillas.

REGADO DE LAS MACETAS

Material:

- agua bidestilada

- solución nutritiva para plantas:

A) CaCl_2 0.1M (100X); 11.0994 g/l

B) KH_2PO_4 0.05M (100X); 6.8045 g/l

C) Na_2EDTA 0.0055M (100X); 1.865 g/l

$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005M (100X); 1.39 g/l

Esta solución se calentó para formar el complejo

D) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025M (100X); 6.1624 g/l

K_2SO_4 0.025M (100X); 4.35 g/l

E) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001M (10000X); 0.169 g/l

H_3BO_3 0.002M (1000X); 0.1236 g/l

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005M (1000X); 0.143 g/l

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0002M (1000X); 0.0499 g/l

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0001M (1000X); 0.0237 g/l

Na_2MoO_4 0.0001M (1000X); 0.024 g/l

Durante la primera semana en que se sembraron los frijoles, se regaron cada tercer día, únicamente con agua. A partir de la segunda semana se regaron alternando con agua o solución nutritiva.

COSECHA DE LOS NODULOS

Material:

- plantas noduladas
- cuba con hielo seco
- tubos para guardar los nódulos
- agua para enjuagar las raíces

A los 18 días después de inoculadas las plantas, se sacó una para ver los nódulos y cuando estaban de color rosado, se procedió a la cosecha de los nódulos localizados en la raíz primaria.

Las plantas fueron enjuagadas con agua, teniendo cuidado de que no se arrancaran los nódulos. Los nódulos fueron desprendiéndose con pinzas uno por uno, e inmediatamente se congelaron. Se guardaron en un congelador a -70°C hasta el momento de usarse.

AISLAMIENTO DE RNA TOTAL DE NODULO (75)

Material

- buffer A:

tiocianato de guanidina 5M

EDTA 25mM

Tris 20 mM PH 7.6

sarcosil 2%

2-mercaptoetanol 0.1% ++

++ se agregó después de esterilizado el buffer. El buffer A, se filtró en un embudo Buchner por papel Whatman y por millipore de poro de 0.45um. Se esterilizó en la autoclave.

- buffer B:

CsCl 5.7M

EDTA 50mM

Fue filtrado por millipore

- buffer C:

Tris 10mM PH 8

NaCl 10mM

EDTA 5mM

SDS 0.1%

- mortero

- politrón

- centrífuga sorvall

- tubos de centrifuga de polialómero

- probeta de 25 ml

- espátula

- ultracentrífuga Beckman

- tubos de nitrocelulosa de 6 ml

- rotor SW55 Ti Beckman

- rotor SS34 Sorvall

- NaCl 3M

- etanol de Merck

- LiCl 2M, EDTA 5mM

- agua estéril filtrada y tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)

El aislamiento de RNA se hizo con sumo cuidado para evitar tener actividad de ribonucleasas. Se trabajó con guantes y todo el material fue esterilizado. El material de vidrio se horneó a 150°C durante por lo menos 2 hrs.

El método de aislamiento de RNA resultó muy efectivo ya que toda la extracción del RNA se hizo en presencia de tiocianato de guanidina que es un agente desnaturalizante muy fuerte. Este método ha sido utilizado para aislar RNA de páncreas donde existen una gran cantidad de ribonucleasas (75). Esta técnica se basa en la precipitación selectiva del RNA en presencia de cloruro de cesio (CsCl). El método fue modificado para adecuarlo a tejidos vegetales.

Los nódulos se maceraron en el mortero con hielo seco. Una vez que ya estaban pulverizados, se vaciaron a dos tubos de polialómero. A cada tubo se le agregaron 10 ml de buffer A.

Lo anterior, se molió en el politrón, que es un homogenizador que muele tanto por la presión que se ejerce contra las paredes del tubo (tiene unas navajas que facilitan el rompimiento) como con sonido.

El extracto se centrifugó en la centrífuga Sorvall en el rotor SS34 a 17,000 rpm 30' a 15°C. Con esta centrifugación, se empastillaron los desechos celulares vegetales y también la fracción bacteriana. En la fracción soluble estaba el citoplasma de las células y en ésta iba el RNA tanto de la fracción bacteriana como de la vegetal.

El sobrenadante se aforó a un volumen final de 20 ml con buffer A. Se agregaron 5 ml de buffer B. Se mezcló todo perfectamente y fue colocado sobre colchones de 1.2 ml de buffer B en los tubos de nitrocelulosa.

Se llevó a cabo una ultracentrifugación a 35,000 rpm durante 12 hrs a 15°C en el rotor SW55Ti.

A las 12 hrs se sacaron los tubos y con una pipeta pasteur conectada a una trampa de vacío, se aspiró el líquido de la parte superior, hacia abajo, teniendo cuidado de no tocar las paredes para que el extracto crudo de la parte superior, no estuviera en contacto con el RNA precipitado.

Se absorbió casi todo el líquido, pero dejando un residuo de 1.5 ml que no se eliminó para evitar despegar la pastilla. El tubo fue cortado a que quedara de una profundidad de aproximadamente 1.5 cm.

Se volteó el tubo boca abajo para que escurriera todo el líquido. Una vez seca la pastilla, se resuspendió en aproximadamente 1.5-2 ml.

El resuspendido se precipitó con 1/10 volumen de NaCl 3M y 2 volúmenes de etanol a -70°C, 30'.

El precipitado fue sometido a centrifugación durante 30' a 10,000 rpm a 4°C en el rotor HB4.

La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de agua estéril y volvió a precipitarse con NaCl 3M y etanol a -70°C en las mismas condiciones.

Cuando el sobrenadante fue precipitado 3 veces, la última pastilla se resuspendió en LiCl 2M EDTA 5mM para lavar el RNA. Este lavado precipitó selectivamente el RNA por ser insoluble en LiCl, eliminándose así el DNA contaminante, ya que éste es soluble en LiCl.

Después de haber resuspendido parcialmente la pastilla, se centrifugó 10' a 7,000 rpm y la pastilla volvió a lavarse 2 veces más con LiCl, centrifugando cada vez en la misma forma.

Finalmente, la pastilla se resuspendió de nuevo en agua estéril y se precipitó a -70°C , pero usando 1/10 vol de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol. Se precipitó 3 veces en las mismas condiciones. Por último la pastilla se resuspendió en agua y se leyó su densidad óptica a una longitud de onda de 260 y 280 nm con luz ultravioleta para conocer su concentración y pureza.

AISLAMIENTO DE RNA DE R. phaseoli (76)

Material:

- 50 ml de medio TY
- medio para la obtención de protoplastos (a):
 - Tris 0.015M PH 8
 - sacarosa Bio Rad 0.45M
 - EDTA 0.008M
- solución saturada de NaCl

- buffer de lisis:

Tris 0.01M PH 8

NaCl 0.01M

citrate de sodio 0.001M

SDS 1.5%

- lisozima 10 mg/ml en el medio (a)

- dietilpicrocarbonato (DEPC) de Sigma

Con una asada de la cepa R. phaseoli CFN42, se inocularon 5 mls de medio TY y se dejaron creciendo toda la noche. Con 1 ml de este cultivo, se inocularon 50 ml de medio TY y se dejaron creciendo durante 24 hrs a que el cultivo llegara a la fase estacionaria de crecimiento.

Las células fueron colectadas centrifugando a 7,000 rpm, 15' a 4°C en el rotor SS34.

Los protoplastos se generaron incubando las células en 25 ml del medio (a) durante 5' a 0°C. Esto se hizo en presencia de lisozima a una concentración final de 80 ug/ml. Los protoplastos se colectaron centrifugando a 10,000 rpm durante 6' a 0°C en el rotor SS34.

La pastilla se lisó adicionando simultáneamente 2.5 ml de buffer de lisis y 50 ul de DEPC a una concentración final de 20 ul/ml. El DEPC es un desnaturizante de protefmas y por ello impidió la degradación por ribonucleasas del RNA.

El lisado claro y viscoso fue incubado a 37°C durante 5' y enfriado a 4°C.

Se adicionó 1/2 vol. de cloruro de sodio saturado; a 4°C, se formó un precipitado de SDS y proteína. Así fue posible separar la fase proteica de la zona de ácidos nucleicos.

El precipitado se centrifugó en el rotor SS34 a 10,000 rpm durante 15' a 4°C.

El sobrenadante de ácidos nucleicos se separó tomando el líquido con una pipeta. Los ácidos nucleicos fueron precipitados a -20°C con 3 volúmenes de etanol absoluto. En este caso ya no fue necesario adicionar más sal para la precipitación.

El precipitado se colectó centrifugando en el rotor HB4 a 10,000 rpm durante 20' a 4°C.

La pastilla se lavó con LiCl 2M EDTA 5mM 3 veces. El RNA fue precipitado con 1/10 vol. de acetato de sodio 3M y 2 vol. de etanol durante aproximadamente 30' a -70°C.

El precipitado se centrifugó a 10,000 rpm, 30' a 4°C en el rotor HB4.

La pastilla se resuspendió en agua estéril. Se leyó la densidad óptica (DO) del resuspendido a 260 y 280 nm con luz ultravioleta (UV).

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA EN PRESENCIA DE GLIOXAL PARA VER LA INTEGRIDAD DEL RNA (77, 78)

Material:

- agarosa
- buffer fosfato de sodio 100mM PH 7 (10X)
- buffer de corrida (fosfato de sodio 1X)
- glioxal 2M
- dimetil sulfoxido (DMSO)
- sacarosa de Bio-Rad al 25%

El glioxal es un agente desnaturalizante que impide la formación de estructuras secundarias en el RNA.

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en buffer fosfato de sodio 10mM PH 7 (1X).

Las muestras se desnaturalizaron incubándolas 1 hr a 50°C en glioxal 1M, DMSO al 50% y buffer fosfato de sodio 10mM. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y antes de ser sometidas a la electroforesis, se les agregó sacarosa al 25% a una concentración final del 5% para aumentarles la densidad.

La electroforesis fue hecha a 30V durante 12 hrs o a 80V durante 4 hrs.

El gel se lavó 10' con 100mM NaOH y bromuro de etidio 5ug/ml. La sosa hidrolizó el RNA. El bromuro de etidio se intercala en la estructura secundaria del RNA y fluoresce al eliminar el gel con luz ultravioleta.

El gel fue neutralizado en NaOAc 200mM PH 4. El gel se observo con luz UV y fue fotografiado.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA EN PRESENCIA DE HIDROXIDO DE METIL MERCURIO (CH_3HgOH) PARA VER LA INTEGRIDAD DEL RNA (79)

El hidróxido de metil mercurio es un desnaturalizante muy fuerte que se intercala en sitios específicos del RNA, desbaratando su estructura secundaria y esto permite separar el RNA por su peso molecular en geles de agarosa. En este caso, tanto el gel como la muestra, contienen hidróxido de metil mercurio. Esta técnica tiene la ventaja sobre otro tipo de geles de RNA de que se obtienen bandas discretas muy bien definidas. Sin embargo, el hidróxido de metil mercurio es muy tóxico y hay que manejarlo con mucho cuidado.

Toda la manipulación se hizo con guantes y en la campana, ya que este compuesto es además muy volátil.

Material:

- agarosa
- buffer boratos 10X PH 8.2 :
 - 50 mM borato de sodio
 - 100 mM sulfato de sodio
 - 10 mM EDTA
 - 500 mM ácido bórico
- RNA 5-10 ug/carril
- glicerol al 10%
- azul de bromofenol
- CH_3HgOH 1M
- H_2O estéril

- fuente de poder
- cámara de electroforesis

Se disolvieron 0.6 gr de agarosa en 50 ml de buffer boratos 1X, y enfriaron hasta una temperatura de 50°C. Se agregaron 250 ul de una solución de CH_3HgOH 1M para que quedara a una concentración final en el gel de 5mM. Se dejó solidificando el gel en la campana. El RNA resuspendido en H_2O , se mezcló con un volumen igual de buffer boratos 1X que contuviera glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0.06% y 10mM hidróxido de metil mercurio.

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel durante 10 hrs a 50 V. El buffer de corrida se recirculó durante todo el tiempo de la electroforesis.

El material que estuvo en contacto con el hidróxido de metil mercurio se sumergió en una solución de 2-mercaptoetanol para inactivar el CH_3HgOH .

Al terminar la electroforesis, el gel se lavó varias veces para inactivar el agente desnaturizante y se tiñó:

- 1) 30' en cloruro de amonio .5M
- 2) 5' en agua, Br Et 5ug/ml, 2-mercaptoetanol 5mM
- 3) 20' en 100 mM NaOH, 5mM 2-mercaptoetanol. La sosa hidrolizó el RNA.
- 4) 2 lavados de 10' cada uno en acetato de sodio 200mM PH 4 iodacetato 7mM, para inactivar el metil mercurio.
- 5) 2 lavados de 5' cada uno en acetato de sodio 200 mM PH 4.

Después del segundo paso, el gel se observó con luz UV y se fotografió.

TRANSFERENCIAS TIPO NORTHERN (78)

Cuando ha sido RNA lo que se transfirió a un filtro de nitrocelulosa, se le llama northern.

Para transferir un RNA que fue sometido a electroforesis en gel ya sea de glioxal o de metil mercurio, no se requiere de tratamientos adicionales al gel. La transferencia se hizo de la misma forma que en un Southern (84), pero en el northern la transferencia se llevó a cabo a una mayor concentración de sales, en SSC 20X.

MARCAJE RADIOACTIVO DE RNA CON γ ³²P-ATP (80)

Material:

- 3 ug de RNA/reacción
- Tris 50mM PH 9.5
- baño a 90°C
- MgCl₂ 50mM
- DTT 100mM
- 250 uCi de γ ³²P-ATP/reacción
- 2 unidades de polinucleótido cinasa/reacción
- baño a 37°C
- RNA de transferencia o RNA de levadura para usarlos como acarreador de precipitación
- fenol bidestilado saturado

- etanol absoluto
- acetato de amonio 4M

El volumen de RNA equivalente a 3 ug se aforó a 40 ul con Tris 50mM PH 9.5 y se incubó 30' a 90°C. El RNA a esa temperatura y en un medio alcalino, se hidrolizó parcialmente.

Una vez hidrolizado el RNA, el volumen de reacción se aforó a 50 ul agregando $MgCl_2$ 500mM a que quedara a una concentración final de 10mM y DTT 100mM a que quedara final 2mM.

Por otro lado, los 200 uCi de $\gamma^{32}P$ -ATP se secaron en un evaporador. A la marca seca se le agregaron 50 ul de la mezcla de reacción. Esta se inició agregando 2 unidades de la enzima polinucleótido cinasa de DNA del fago T4. La reacción se incubó 30' a 37°C. Durante la reacción, el $\gamma^{32}P$ -ATP fue unido por la polinucleótido cinasa a los extremos 5' libres de RNA hidrolizado y de esta forma quedó marcado radioactivamente para ser usado como detector en una hibridización. El RNA marcado se separó de la marca libre pasándolo por una columna de Sephadex G-75.

HIBRIDIZACION EN COLONIA (81)

Material:

- filtros Whatman estériles
- cajas de petri con medio Luria más el antibiótico (en este caso fue ampicilina) que seleccionó la resistencia de la cepa utilizada que llevaba el plásmido de interés
- colonias aisladas de Escherichia coli que llevaban el

plásmido recombinante

- palillos de madera
- NaOH para desnaturalizar el DNA
- solución de Tris para neutralizar

Cada una de las colonias aisladas se picaron sobre filtros Whatman con números para identificar cada colonia.

Los filtros se incubaron a 37°C para permitir que crecieran las colonias.

Las células fueron lisadas sumergiendo los filtros en una solución de NaOH y así el DNA también se desnaturalizó. Los filtros se neutralizaron con la solución de Tris.

Los filtros se secaron en el horno a 80°C durante 2 hrs; a esta temperatura el DNA fue fijado a los filtros y quedaron listos para hibridizarse. Esta operación se realizó al vacío.

PREHIBRIDIZACION E HIBRIDIZACION EN PRESENCIA DE FORMAMIDA

La prehibridización se hizo en presencia de DNA de timo de ternera, lo que tuvo como fin saturar sitios inespecíficos de hibridización, para que cuando se llevara a cabo la hibridización con el detector radioactivo, sólo hibridizaran aquellas zonas donde hubiera un alto grado de homología. En algunas de las prehibridizaciones se utilizó formamida y cuando se hizo en presencia de ésta, se utilizó al 50%, lo cual permitió el apareamiento de bases en secuencias que sólo tenían menos de un 10 a un 12% de desigualdad.

Material:

- formamida desionizada
- SSC 20X:
 - NaCl 3M, citrato de sodio .3M
- SDS 10%
- EDTA 0.25M
- Tris 1M PH 7.5
- Denhardt's 100X:
 - ficoll 2%
 - polvinilpirrolidona (PVP) 2%
 - albúmina sérica bovina (BSA) 2%
- DNA de timo de ternera
- agua estéril

El filtro de nitrocelulosa se colocó dentro de una bolsa de plástico.

La mezcla de prehibridización fue hecha de la siguiente manera:

En un volumen final de 10 ml se agregaron secuencialmente las siguientes soluciones:

- DNA de timo de ternera a una concentración final de 10 ug/ml. Se agregó en volumen lo equivalente a 100 ug.
- formamida a una concentración final del 50%
- SSC20X a una concentración final de 5X
- SDS 10% a una concentración final del .1%
- EDTA a una concentración final de 1mM
- Tris 1M PH 7.6 a una concentración final de 1mM
- Denhardt's 100X a una concentración final de 5X
- el volumen de H₂O necesario para aforar a 10 ml

El agua y el DNA de timo de ternera se hirvieron durante 10' para desnaturalizar el DNA. Inmediatamente se pusieron en hielo para evitar la renaturalización. Al agregar el resto de las soluciones, se mezcló bien y se colocó en el interior de la bolsa donde estaba el filtro. La bolsa de plástico se selló y dejó prehibridizando durante 4 hrs a 42°C.

A las 4 hrs se preparó la mezcla de hibridización que fue la misma que la de prehibridización, pero incluyendo el detector radioactivo que se hirvió con el DNA de timo de ternera y el agua.

La mezcla de prehibridización se vació de la bolsa y la solución de hibridización se vertió en ésta, incubándose a 42°C durante 12-36 hrs.

PREHIBRIDIZACION E HIBRIDIZACION EN BUFFER FOSFATOS

Este tipo de hibridización y prehibridización tienen la misma finalidad que la que se hace en formamida, pero ésta puede sustituirse por fosfatos y el grado de severidad de la hibridización aumenta, ya que los fosfatos exigen un mayor grado de homología y además la hibridización se lleva a cabo a una mayor temperatura: 65°C.

La mezcla de hibridización consistió en lo siguiente:

- el detector radioactivo cuyo volumen se aforó a 1 ml con agua
- DNA de timo de ternera a una concentración final de 100 ug/ml

Lo anterior se hirvió 5' y después se puso en hielo inmediatamente.

- 0.5 ml Denhardt's 100X
- 0.5 ml buffer fosfatos 1M PH 8
- 1.25 ml SSC20X
- 1.75 ml de agua

La mezcla se colocó en la bolsa e incubó a 65°C 12-36 hrs.

La mezcla de prehibridización fue la misma que la de hibridización a excepción del detector radioactivo que en ésta no se incluyó. La prehibridización se llevó a cabo a la misma temperatura, pero únicamente durante 2 hrs.

LAVADO DE LOS FILTROS DESPUES DE LA HIBRIDIZACION

El lavado de los filtros tiene como objeto eliminar la marca radioactiva libre y además dependiendo de la severidad del lavado, que sólo se mantenga la hibridización de secuencias con un alto grado de homología.

Material:

- recipiente de plástico
- solución 1) SSC 2X, 0.1% SDS
- solución 2) SSC .1X, 0.1% SDS
- solución 3) SSC .1X

Se cortó una esquina de la bolsa de hibridización y la solución fue vertida en una botella de desecho radioactivo. Se enjuagó el interior de la bolsa y el filtro, con la solución 1, a temperatura ambiente. Este líquido fue desechado.

El filtro se sacó de la bolsa y se puso en un recipiente de plástico. El filtro se enjuagó en la solución 1 a temperatura ambiente en un volumen grande durante 15'.

Se pasó a un segundo recipiente y ahí fue lavado a 50°C durante 15' con agitación ocasional en la solución 2. El residuo de la radioactividad se fue siguiendo con el contador Geiger. El lavado en la solución 2, se hizo varias veces hasta que la radioactividad residual se mantuviera constante y ya no bajara.

El SDS fue eliminado lavando con la solución 3 durante 10' a temperatura ambiente.

El filtro se puso a secar sobre papel Whatman 3MM en el horno a 37°C.

El filtro seco se puso frente a una película de rayos X a exponer a -70°C con una pantalla para que amplificara la señal que iba a imprimirse por la radioactividad. Al tiempo deseado se reveló el autoradiograma.

AISLAMIENTO DE PLASMIDOS RECOMBINANTES (82)

Esta metodología permitió el aislamiento a pequeña escala de plásmidos recombinantes y por ello pudieron analizarse varias clonas a la vez y obtener material suficiente para diferentes experimentos.

Material:

- colonias aisladas que llevaban los plásmidos que interesaba aislar

- medio Luria:

extracto de levadura al 0.5%

triptona al 1%

NaCl al 1%

agar al 1.5% (en el caso de preparar medio sólido)

El PH se ajustó a 7 con NaOH 1N

- ampicilina a una concentración final de 50 ug/ml

- solución de espectinomycinina 30 mg/ml

- tubos de polialómero

- tubos corex de 30 ml

- solución de sacarosa al 25% en 50mM Tris PH 8 1mM EDTA

- EDTA 0.25M PH 8

- lisozima 5mg/ml en Tris 0.25M PH 8

- mezcla lítica tritón 3X:

0.3 ml tritón X-100

2.7 ml H₂O

75 ml EDTA 0.25M

15 ml Tris 1M PH 8

7 ml de H₂O

- ribonucleasa 5 mg/ml en acetato de sodio. Al prepararla se hirvió 10' para inactivar deoxirribonucleasas.

- pronasa 5mg/ml en Tris 0.25M PH 8. Antes de usarse se predigirió 60' a 37°C para inactivar nucleasas.

- fenol bidestilado saturado con buffer TE

- buffer TE 1X:

Tris 10mM, EDTA 1mM PH 8

- cloroformo

- alcohol isoamílico

- NaCl 5M

- etanol absoluto de Merck

- etanol de Merck al 70%
- palillos de madera

Con una asada de cada una de las clonas se inocularon 5 ml de medio Luria con ampicilina 50 ug/ml. Se dejaron creciendo toda la noche a 37°C con agitación. Con 2 ml de cada uno de los cultivos fueron inoculados 100 ml de medio Luria. Se incubaron a 37°C con agitación.

A las 5-6 hrs se leyó la DO a 600 nm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO de 1, se les agregó 1 ml de una solución 30 mg/ml de espectinomicina, a que quedara a una concentración final de 300 ug/ml. Al agregar este antibiótico, se inhibió la replicación cromosómica y se favoreció la replicación del plásmido; de esta forma se amplificó el número de plásmidos por célula. Los plásmidos se dejaron amplificando en presencia del antibiótico durante toda la noche a 37°C con agitación.

Las células fueron cosechadas en tubos de polialómero al centrifugar el cultivo a 7,000 rpm durante 8' a 4°C en el rotor SS34.

El sobrenadante se descartó. Las células se congelaron a -70°C durante aproximadamente 15 minutos. El congelamiento sensibilizó la pared celular para el rompimiento.

Se agregaron 4 ml de la solución de sacarosa y las células se resuspendieron. La sacarosa hizo que el rompimiento no fuera tan drástico ya que mantuvo constante la presión osmótica. Se agregaron 2 ml de EDTA 0.25M, el EDTA es un quelante de iones divalentes y por ello provoca la formación

de poros en la membrana celular aumentando así la permeabilidad.

También se adicionó 1 ml de lisozima, la cual degradó la pared celular. Se dejó reposar en hielo 15'.

Se adicionaron 700 ul de la mezcla lítica tritón 3X. El tritón es un detergente que ayuda a que se lleve a cabo una lisis completa de la membrana celular. Se incubó en hielo 15'.

Una vez lisadas las células, se hizo una centrifugación a 18,000 rpm para separar la fracción de DNA cromosomal de la que contenía el plásmido. La centrifugación se llevó a cabo en el rotor SS34, durante 30' a 4°C.

El sobrenadante contenía la fracción plasmídica; éste fue decantado en tubos corex de 30 ml.

Con el fin de eliminar el RNA contaminante, la muestra fue tratada con ribonucleasa (40 ul de RNAsa 5mg/ml en acetato de sodio). Se incubó a 37°C 30'. Se agregaron 200 ul de pronasa, la cual además de inactivar la ribonucleasa, degrada las protefmas contaminantes. Se incubó 30' a 37°C.

Se agregaron 8 ml de una mezcla de fenol: cloroformo: isoamílico 25:25:1 y se extrajo agitando durante 5'.

Para separar las fases se centrifugó a 7,500 rpm 20' en el rotor HS4, tomándose después la fase acuosa.

Al separar las fases pudo purificarse la fracción de ácidos

nucleicos ya que estos son solubles en la fase acuosa; las proteínas son parcialmente solubles en la fase fenólica y en la fase acuosa. Quedaron tres fases: la acuosa en la que estaban los ácidos nucleicos, una interfase que incluía a las proteínas y por último la fase fenólica. El cloroformo se agregó a la extracción para que la fase orgánica fuera más densa y se lograra una mejor separación. El alcohol isoamílico se agregó para evitar que la fase fenólica absorbiera parte de la fase acuosa y concentrara la muestra; para esto mismo se saturó el fenol. Durante la purificación, se hicieron 2 extracciones fenólicas en total. Se hicieron también 2 extracciones con cloroformo para eliminar el fenol residual en la muestra.

La fase acuosa se precipitó con NaCl 5M a que quedara a una concentración final de .3M y 2 volúmenes de etanol. Se dejó precipitando a -20°C durante toda la noche.

El precipitado fue centrifugado a 7,500 rpm durante 15' a 4°C en el rotor HB4.

Para eliminar el exceso de sal, la pastilla se lavó con etanol al 70% sin despegar la pastilla de la pared del tubo. Se centrifugó a 7,000 rpm 5' a 4°C . Este lavado se hizo dos veces. La pastilla se resuspendió en buffer TE y volvió a precipitarse con NaCl 5M y etanol. Se dejó precipitando durante 4 hrs a -20°C .

El precipitado fue centrifugado a 10,000 rpm 30' a 4°C y la pastilla resuspendida en buffer TE.

El resuspendido se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml y para precipitarlo se agregó NaCl 5M y etanol.

Los ácidos nucleicos se dejaron precipitando a -20°C durante 4 hrs. El precipitado fue centrifugado en la microfuga durante 10' a 4°C .

El sobrenadante fue decantado y la pastilla secada al vacfo. Se resuspendió en el menor volumen posible y se utilizó aproximadamente 1 ug (1-2 ul) para las digestiones con las endonucleasas de restricción.

EXTRACCION DE DNA TOTAL DE R. phaseoli (83)

- 100 ml de medio TY
- buffer SET:
 - sacarosa al 25% en Tris 50mM PH 8, EDTA 1mM
- NaCl .85%
- EDTA 0.25M
- lisozima 5mg/ml en Tris 25mM PH 8
- RNAsa 10mg/ml en acetato de sodio
- mezcla lítica tritón 3X
- proteinasa K 5 mg/ml en Tris 50mM PH 7.5 EDTA 5mM
- NaCl 2M
- buffer TE PH 8:
 - Tris 50mM EDTA 20mM
- fenol bidestilado saturado con buffer TE
- cloroformo
- alcohol isoamflico
- etanol absoluto

- etanol al 70%

Con una asada de la cepa de R. phaseoli se inocularon 5 ml de medio TY con estreptomicina 200 ug/ml y se dejaron creciendo toda la noche a 30°C con agitación.

100 ml de medio TY más estreptomicina fueron inoculados con 2 ml del crecimiento de toda la noche. Se dejaron creciendo durante 16-18 hrs.

Las células fueron cosechadas centrifugando a 7,000 rpm durante 15' a 4°C. Las células se congelaron a -70°C. La pastilla celular fue resuspendida en 5 ml de sacarosa al 25%. Se adicionaron 1.5 ml de EDTA 0.25M PH 8, 0.5 ml de lisozima y 50 ul de RNAsa. Se mezcló y dejó reposar 15' en hielo.

Se adicionaron 1.5 ml de mezcla lítica tritón X-100 3X. Se mezcló con cuidado y se dejó reposando a 4°C otros 15'. Después de esta incubación el lisado se puso muy viscoso. Se adicionaron 850 ul de protefnasa K. Se incubó 60' a 37°C con agitaciones ocasionales.

Los ácidos nucleicos fueron extraídos dos veces con la mezcla fenol: cloroformo: isoamflico, centrifugando cada vez a 7,000 rpm 20' en el rotor HS4 y separando la fase acuosa. Se hicieron dos extracciones con cloroformo.

La fase acuosa fue precipitada con 1/10 volumen de NaCl 3M y 2 volúmenes de etanol. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 30' a 4°C. La pastilla fue secada y resuspendida en el menor vo-

lumen posible.

Se precipitó una vez más con 1/10 volumen de NaCl 3M y 2 volúmenes de etanol. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua estéril. Se leyó su DO a 260 y 280 nm.

DIGESTIONES DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las condiciones en que se llevó a cabo la digestión dependieron del tipo de endonucleasa de restricción que se utilizó. En el caso de las digestiones con la endonucleasa de restricción EcoR1 el procedimiento fue el siguiente:

Material:

- H₂O estéril
- buffer EcoR1 10X:
 - Tris 90mM PH 7.5
 - MgCl₂ 5mM
 - NaCl 100mM
- mezcla de parar:
 - urea 4M
 - sacarosa al 50%
 - EDTA 50mM
 - azul de bromofenol al 0.1%
 - xilen cianol al 0.1%
- EcoR1 10 u/ul

En un tubo eppendorf estéril se adicionó la cantidad de agua necesaria para obtener un volumen final de 20-30 ul después de agregados todos los componentes de la reacción.

Se adicionó buffer EcoRI 10X a que quedara a una concentración final de 1X.

Se utilizaron de 1-3 ug de DNA por reacción a que quedara diluido por lo menos 10 veces en el volumen final.

Se agregaron 5 unidades de enzima por cada microgramo de DNA que se deseaba digerir. La reacción se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se paró agregando 1/2 volumen de la mezcla de parar y calentando la reacción 5' a 65°C para desnaturalizar la enzima. La mezcla de parar se agregó cuando la muestra fue sometida a electroforesis ya que esto aumentó su densidad y además el colorante permitió seguirla visualmente a lo largo del gel. En el caso en que no se quiso someter a electroforesis, entonces la reacción se paró únicamente calentado 5' a 65°C.

ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL

Material:

- agarosa
- buffer Tris acetatos 10X:
 - para 4L: 193.6 gr Tris
 - 108.86 gr acetato de sodio
 - 29.6 gr EDTA

El PH fue ajustado a 8.5 con ácido acético glacial.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer Tris acetatos IX. La agarosa se fundió calentando, después se dejó enfriar hasta una temperatura de 50°C aproximadamente y se vació en la cámara para hacer el gel. Una vez gelificada se sacó

el peine.

Los pozos se llenaron con buffer de corrida 1X y las muestras se colocaron en cada pozo. El buffer de corrida se vació de la cámara.

La electroforesis se llevó a cabo a 75V durante 5 hrs.

Para visualizar el DNA, el gel se tiñó con bromuro de etidio 5 ug/ml durante 5'. Se enjuagó con H₂O y se observó con un transiluminador de luz UV.

TRANSFERENCIA A FILTROS DE NITROCELULOSA TIPO SOUTHERN (84)

Material:

- HCL 0.25N
- NaOH 0.5M NaCl 1M
- Tris 1M NaCl 3M PH 7.5
- SSC20x: 3M NaCl; .3M citrato de sodio

Los geles se trataron para la transferencia de la siguiente forma:

Cuando los pedazos de DNA que tenía el gel eran de tamaño grande (10-25 kb), el gel se trató sumergiéndolo durante 15' en la solución de HCl. El DNA se hidroliza en PH ácido. Este tratamiento se hizo porque la transferencia de pedazos grandes de DNA no es tan eficiente.

El tratamiento con ácido se omitió, cuando se transfirieron pedazos más pequeños.

El gel se incubó durante 45' en la solución de NaOH y NaCl,

para desnaturalizar el DNA. Fue neutralizado al incubarlo 45' en Tris 1M, NaCl 3M PH 7.5. El gel se enjuagó en SSC 6X que fue la solución en la que se llevó a cabo la transferencia.

Con guantes y la mayor limpieza posible se cortó una tira de papel Whatman 3MM de la altura del gel.

Se cortaron un papel Whatman y un filtro de nitrocelulosa exactamente de las mismas dimensiones del gel.

En una charola se puso aproximadamente 1 litro de SSC6X.

La tira de papel Whatman se humedeció en el SSC6X. Se colocó una gradilla dentro de la charola y sobre ésta un vidrio. La tira de papel húmeda fue colocada sobre el vidrio. El gel se colocó perfectamente centrado con los espaciadores a ambos lados. El papel de nitrocelulosa se colocó encima de tal forma que no quedaran burbujas entre el gel y el papel. Encima se colocó el papel Whatman y sobre éste una serie de toallas sanitas para que absorbieran el exceso de humedad. Arriba se colocó un peso para que ejerciera presión.

Durante la transferencia el buffer pasó a través del puente de papel Whatman y esto permitió que las bandas del gel se fueran transfiriendo del gel al filtro. El DNA fue fijado al filtro al poner a éste en un horno al vacío a 80°C durante 2 hrs.

TECNICA DE "NICK TRANSLATION" (85)

Esta metodología sirve para marcar el DNA radioactivamente. Al DNA se le produjeron cortes al tratarlo parcialmente con DNAsas. Estos sitios fueron rellenados parcialmente con la DNA polimerasa en presencia de ^{32}P -CTP y así el DNA quedó fragmentado y marcado radioactivamente. El DNA marcado fue separado de la radioactividad libre al cromatografiarlo por una columna de Sephadex G-75. El DNA se usó como detector para las hibridizaciones.

TECNICA DE HIRSCH- AISLAMIENTO DE PLASMIDOS DE CEPAS DE Rhizobium (61)

Material:

- medio TY líquido
- buffer TE: 50mM Tris PH 8, 20mM EDTA
- pronasa 3mg/ml en buffer TE
- SDS al 10% en buffer TE
- NaOH 3M
- HCl 2M PH 7
- NaCl 5M
- polietilenglicol (PEG) al 50% en H_2O
- colorante:
 - azul de bromofenol al .125%
 - ficoll al 20%
 - EDTA 50mM

Se crecieron 100 ml de medio TY durante toda la noche a 30°C con agitación. Se centrifugaron 60 ml del medio en un tubo

corex. Las células se lavaron y resuspendieron en 16 ml de buffer TE.

Para que fueran lisadas se les adicionaron 2 ml de una solución de pronasa 3mg/ml en buffer TE, y 2 ml de SDS al 10%. Se incubaron 1 hr a 37°C con agitación suave.

Se agregaron 0.5 ml de NaOH 3M hasta que se obtuviera un PH final de 12.4. A este PH el DNA fue desnaturalizado al incubarse 30' a temperatura ambiente. El PH se ajustó a 8.5 agregando buffer Tris 2M PH 7.

Al neutralizar el PH, los plásmidos se renaturalizan, pero el DNA cromosomal no alcanza a renaturalizarse.

Se agregó NaCl 5M a que quedara a una concentración final de 1M.

El lisado fue transferido a un tubo de centrifuga, mezclado por inversión suave e incubado a 4°C durante 2 hrs.

El complejo SDS/NaCl precipitó al centrifugar a 10,000 rpm durante 20' a 4°C.

Se tomaron 20 ml de la parte superior del sobrenadante y se pusieron en un tubo fresco para ser precipitados con 5 ml de PEG 6000 al 50% en H₂O. El contenido de los tubos se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo durante 2 hrs. El DNA fue precipitado por centrifugación a 7,000 rpm a 4°C, durante 15' en el rotor HB4.

El sobrenadante fue decantado y la pastilla resuspendida en 0.5 ml de buffer TE. Se tomó una alicuota de las muestras

para someterlas a electroforesis en gel. De esta forma los plásmidos de Rhizobium pudieron visualizarse en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio y con luz UV.

ECKHARDT.- ELECTROFORESIS DE PLASMIDOS DE RHIZOBIUM (86)

Este procedimiento consiste en lisar las células en el carril del gel, para mantener más eficientemente la integridad de los plásmidos y manipularlos menos.

Material:

- medio PY
- cultivo sólido de R. phaseoli cepas CFN42 y CFN2001
- sarcosil al 0.1% en buffer TE PH 8
- buffer TE PH 8:
 - Tris 50mM, EDTA 20mM
- microfuga
- solución A:
 - lisozima 7500 u/ml
 - RNasa I 0.3 u/ml
 - azul de bromofenol al 0.05%
 - ficoll al 20%
- capilares de vidrio
- solución B:
 - SDS 0.2%, ficoll al 10% en buffer Tris boratos 1X
- buffer Tris boratos 10X:
 - Tris base 89mM
 - EDTA 2.5 mM
 - ácido bórico 89mM

- pipeta pasteur sellada
- solución C:
SDS al 0.2%, ficoll al 5% en Tris boratos 1X
- gel de agarosa al 0.7% en buffer de corrida
- buffer de corrida: Tris boratos 1X

5 ml de medio PY, fueron inoculados con una asada de cada una de las cepas, dejándose crecer durante 16 hrs.

1 ml del cultivo (aprox. 10^8 células/ml) fue centrifugado en la microfuga durante 45-50".

El sobrenadante fue removido, la pastilla celular lavada con sarcosil al 0.1% y resuspendida suavemente. Se centrifugó 50". El precipitado se lavó con 0.5 ml de TE y centrifugado 50". La pastilla fue resuspendida en 40 ul de solución A, e inmediatamente colocada en los carrillos del gel. Se incubó 10' a temperatura ambiente. Se adicionaron 40 ul de solución B y se mezcló gentilmente con una pipeta pasteur sellada. La lisis comenzó después de agregada la solución A. Por último, se adicionaron 100 ul de solución C.

Los pozos del gel se sellaron con agarosa al 0.7% hasta el tope de la cámara de electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo a 8mA durante 1 hora y a 40 mA durante 4 hrs a corriente constante.

El gel fue teñido con bromuro de etidio 5ug/ml durante 5', enjuagado con H₂O y fotografiado con luz UV.

AISLAMIENTO DE RNA DE BACTEROIDE (68b)

La primera parte de este procedimiento es semejante al método que se ha seguido para R. meliloti (68b), sin embargo, la segunda parte fue modificada.

Material:

- 10 gr de nódulos
- mortero
- nitrógeno líquido
- buffer A PH 7.5:

manitol .5M

Tris 50mM

succinato de sodio 20mM

2-mercaptoetanol al 0.1% ++

Este buffer fue filtrado por millipore y esterilizado en la autoclave.

++ agregar después de esterilizar

- gasa estéril
- pipetas estériles
- tubos corex de 30 ml
- centrífuga Sorvall
- rotor HB4
- buffer tiocianato de guanidina (ver aislamiento de RNA total de nódulo, buffer A)
- politrón
- buffer CsCl (buffer B, aislamiento de RNA total de nódulo)
- ultracentrífuga Beckman
- tubos de nitrocelulosa de 6 ml
- rotor Beckman SW55Ti

Los nódulos fueron molidos en el mortero con nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino.

Al polvo, se le agregaron 15 ml de buffer A, preenfriado en hielo. El manitol mantuvo la presión osmótica constante y evitó que los bacteroides tronaran.

El resuspendido se pasó a través de 2 capas de gasa, la cual se enjuagó con otros 15 ml de la misma solución.

El filtrado fue colocado en un tubo corex y centrifugado a 1,500 rpm 5' a 4°C en el rotor HB4. A esta velocidad las células vegetales se precipitaron y los bacteroides quedaron en el sobrenadante.

El sobrenadante se centrifugó a 9,000 rpm 5' a 4°C y el precipitado fue resuspendido en 7.5 ml de buffer de tiocianato de guanidina a temperatura ambiente.

A partir de este paso, el resto del procedimiento fue el mismo que el que se siguió para el aislamiento de RNA total de nódulo.

RESULTADOS

ANALISIS COMPARATIVO DE LA INFORMACION GENETICA QUE SE EXPRESA EN LA BACTERIA Y EN EL BACTEROIDE

Con el fin de hacer un análisis comparativo de la información genética que se expresa en la bacteria crecida hasta la fase estacionaria y la expresada en el bacteroide, se hizo una hibridización de RNA total de bacteria y bacteroide marcados en el extremo 5' con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$, contra digestiones de genoma total de las cepas R. phaseoli CFN42 y CFN2001.

La hibridización contra la cepa CFN2001, que es una cepa curada del plásmido d, fue hecha para ver qué proporción de la información expresada en el nódulo proviene del plásmido d.

El resultado de esta hibridización, se muestra en la figura 2.

Al hibridizar el RNA de bacteria marcado radioactivamente contra digestiones de éstas cepas, lo que se nota es que la mayoría de las bandas de hibridización obtenidas con la CFN42, se mantienen en la cepa CFN2001; esto sugiere que la mayor parte de la información que se expresa cuando la bacteria está creciendo en vida libre, se deriva principalmente del cromosoma o de otros plásmidos. Al hibridizar el RNA de bacteroide contra las mismas digestiones, se observa que la mayor parte de las bandas de hibridización que fueron obtenidas con la cepa CFN42 no se obtienen con la

cepa CFN2001; sólo dos bandas se mantienen. Este resultado indica que gran parte de la información expresada en el bacteroide proviene del plásmido d. Sin embargo, también hay secuencias que se expresan a partir del cromosoma o de otros plásmidos. Esto sugiere que no solamente el plásmido sim tiene un papel durante la simbiosis.

IDENTIFICACION DE GENES DE R. phaseoli QUE SE EXPRESAN DURANTE LA SIMBIOSIS

Para identificar y aislar genes de R. phaseoli que participen en el establecimiento del nódulo, la estrategia experimental que se utilizó fue la mostrada en la figura 1.

El banco de genes de R. phaseoli se hizo con DNA de la cepa CFN42, enriquecido para plásmidos, digerido parcialmente con EcoR1.

En este trabajo en particular, se identificó y analizó información genética de R. phaseoli que se expresa en el nódulo maduro, ya que el RNA total de nódulo fue aislado de nódulos que estaban en su fase madura.

Con el RNA radioactivo se hizo hibridización en colonia (81) de 6000 clonas del banco; se obtuvieron 17 clonas con hibridización positiva.

Cada una de las clonas seleccionadas, fue crecida por separado para aislar el plásmido recombinante. El plásmido aislado de cada clona, se digirió totalmente con la endonucleasa de restricción EcoR1 y fue sometido a electroforesis en gel de agarosa.

La figura 3, muestra el patrón de restricción de algunas de las clonas seleccionadas.

SELECCION DE CLONAS ESPECIFICAS DE NODULACION

Los geles de los patrones de restricción de los plásmidos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa por el método de Southern (84). Los filtros se hibridizaron contra:

A) RNA total de nódulo, hidrolizado parcialmente y marcado radioactivamente para asegurar que la hibridización original obtenida en la colonia era reproducida. Por otro lado, también interesaba saber el tamaño del fragmento de DNA que hibridizaba con el RNA total de nódulo. Entre las clonas seleccionadas (fig. 3) existen algunas que tienen insertos únicos, pero también hay otras que tienen más de un inserto. En el caso de estas últimas era importante saber cual de los insertos era el que hibridizaba con el RNA total de nódulo.

B) Se contraseleccionó hibridizando con RNA total de R. phaseoli crecido en vida libre (fase estacionaria), para seleccionar únicamente aquellas clonas específicas del nódulo.

C) Y finalmente contra la clona nif a (57), que lleva clonados en el plásmido vector pBR328, algunos de los genes nif de Rhizobium phaseoli; tales como el gene estructural de la nitrogenasa reductasa, nif H (C. Quinto, observación no publicada).

Los resultados de estas 3 hibridizaciones pueden verse en la Tabla II. Como puede observarse, las clonas 4, 5, 10,

11 y 15 se expresan tanto en el nódulo como en el Rhizobium cuando éste crece en vida libre. Estas clonas no son expresadas específicamente durante la simbiosis y por ello no siguieron analizándose.

Las clonas 1, 3 y 8 tienen homología con la clona nif a, por lo que se consideraron posibles clonas nif.

Los patrones de restricción con EcoRI de estas clonas no son idénticos a las clonas nif, ni tampoco su patrón de hibridización con DNA total de la cepa CFN42. Sin embargo, puede ser que las zonas adyacentes a los genes estructurales de la nitrogenasa sean los que están determinando esta homología o que las clonas identificadas sean algunas de las reiteraciones de nif a.

La clona 3 se continuó analizando para mantenerla como control.

Las clonas 6, 7, 9, 12, 13 y 14 mostraron homología únicamente con el RNA extraído de nódulo. Se les consideró específicas de simbiosis, ya que sólo en estas condiciones se detecta su expresión.

LOCALIZACION DE LAS CLONAS SELECCIONADAS EN LOS PLASMIDOS DE R. phaseoli

En la introducción se mencionó que, en las diferentes especies de Rhizobium, existen plásmidos de alto peso molecular en los cuales están localizados genes de nodulación y fijación de nitrógeno. También se comentó que algunos de estos

plásmidos se expresan preferencialmente durante la simbiosis. Por ello resultó muy interesante investigar si las clonas que se expresan específicamente en la simbiosis estaban localizadas en los plásmidos o en el cromosoma de una cepa silvestre de R. phaseoli (CFN42).

Al someter a electroforesis en gel los plásmidos de la cepa CFN42, el patrón consiste de 5 plásmidos y es en el tercero de menor a mayor peso molecular, donde se detecta hibridización con la clona nif a (57).

Las clonas seleccionadas fueron marcadas radioactivamente por la técnica de "nick translation" (85). El patrón de plásmidos de las cepas CFN42 y CFN2001, se hibridizó contra las clonas simbióticas marcadas radioactivamente.

En este experimento se esperaba que en las clonas que tienen homología con el plásmido d, sólo se detectara la hibridización con la cepa CFN42, en tanto que en el caso de las clonas que se localizaran en algún otro plásmido que no fuera el d, la hibridización se mantendría en ambas cepas. La figura 4 muestra que todas las clonas, excepto la 9, hibridizan con algún plásmido. En la clona 9 sólo se detecta hibridización con el cromosoma. Las clonas 3, 7, 12 y 14 hibridizan con el plásmido d (p42d); y las clonas 6 y 13 hibridizan con el plásmido c. La hibridización de la clona 12, no se muestra en la figura.

ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LAS POSIBLES CLONAS SIMBIÓTICAS

Se reportó recientemente que los genes estructurales de la nitrogenasa se encuentran reiterados en el plásmido δ de la cepa CFN42 de Rhizobium phaseoli (57). Con el fin de saber si éste era un arreglo general de los genes simbióticos de R. phaseoli o si se trataba de una organización genómica particular de los genes estructurales de la nitrogenasa, se analizó la organización en el genoma de las clonas aisladas en este proyecto.

El DNA total de la cepa CFN42, se digirió totalmente con la endonucleasa de restricción EcoRI; se separó por electroforesis y se transfirió a filtros de nitrocelulosa. Las clonas por separado, fueron marcadas radioactivamente por la técnica de "nick translation" (85) e hibridizadas contra las digestiones de DNA total. El resultado se muestra en la figura 5.

Los datos sugieren que la clona 7 está reiterada, ya que sólo tiene un inserto, pero revela 11 bandas de hibridización. También están reiteradas las clonas 3 y 6. En el resto de las clonas, sólo se observa hibridización del inserto consigo mismo y no aparecen bandas adicionales; aparentemente se trata de clonas representadas una vez en el genoma.

Además el dato de que hibridicen con un sólo plásmido apoya también esta posibilidad. Sin embargo, aún es posible que estas clonas estén reiteradas en el cromosoma y en un plás-

mido; pero que no se observe la aparición de nuevas bandas porque los sitios de restricción en el cromosoma y en el plásmido estén incluidos en la reiteración. Con el fin de apoyar o descartar esta posibilidad, se utilizó la cepa derivada de la CFN42, CFN2001, curada del plásmido sim (p42d). Se esperaba que desaparecieran las bandas de hibridización al intentar hibridizar las clonas que estuvieran representadas solamente en el plásmido d, contra digestiones totales de la cepa curada de dicho plásmido, y que se mantendrían bandas de hibridización sólo en aquellas que estuvieran presentes tanto en el plásmido como en el cromosoma.

Para investigar esto, se digirió con EcoRI DNA total de las cepas CFN42 y CFN2001; las digestiones se sometieron a electroforesis en gel y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Las clonas 3, 6, 7, 9, 12, 13 y 14 fueron marcadas radioactivamente por la técnica de "nick translation" (85) e hibridizadas contra estas digestiones.

La clona 7 además se hibridizó contra una digestión de genoma total de la cepa C58C1 de Agrobacterium tumefaciens a la cual se le transfirió el plásmido d de la cepa CFN42. El resultado de estas hibridizaciones se observa en la figura 6. La hibridización con la clona 12 no se muestra.

Al hibridizar la clona 3 que está localizada en el plásmido d, contra digestiones de genoma total de la cepa CFN42, se notan 4 bandas de hibridización. Como era de esperarse, estas bandas no están presentes en la cepa curada del plásmido d. La clona 3 sólo tiene 2 insertos, por lo que las 2 bandas adicionales parecerían ser reiteraciones de esta clona.

La clona 6 está localizada en el plásmido c, sin embargo al

hibridizarla con digestiones de genoma total de la cepa curada del plásmido d, hay bandas que se mantienen y otras que no, en comparación con la hibridización que se obtiene con la cepa silvestre. Esto sugiere que la cepa curada, además de perder el plásmido d, tiene rearrreglos en su información genética. Esta clona también parece estar reiterada ya que sólo tiene dos insertos y revela 10 bandas de hibridización.

En el caso de la clona 7, que presenta homología con el plásmido d, al hibridizarse contra digestiones de genoma total de la cepa silvestre, se observan 11 bandas a pesar de sólo tener un inserto. La mayoría de estas bandas, no están presentes en la cepa CFN2001, pero algunas se mantienen. Esto sugiere que las primeras, están localizadas únicamente en el plásmido d, pero que las que se mantienen en la cepa curada (CFN2001), están presentes tanto en el cromosoma como en el plásmido.

La clona 9 se localiza solamente en el cromosoma por lo que sus patrones de hibridización con las clonas CFN42 y CFN2001 son idénticos.

La clona 12 es una clona que tiene un inserto menor a 0.6 kb; por alguna razón se dificulta su marcaje radioactivo por la técnica de "nick translation" y la actividad específica que se obtiene es muy baja. Al hibridizar esta clona contra digestiones de genoma total de las cepas CFN42 y CFN2001, se obtienen dos bandas de hibridización que se mantienen en ambas cepas. Esto sugiere que esta clona está reiterada en el plásmido d y en el cromosoma.

La clona 13 hibridiza con el plásmido c de la cepa CFN42 y por lo tanto su patrón de hibridización con las cepas CFN42 y CFN2001 es idéntico. Para estudiar si existen reiteraciones de ella en el genoma, se planea utilizar una cepa curada del plásmido c.

La clona 14 tiene un sólo inserto de 2.2 kb. Hibridiza con el plásmido d de la cepa CFN42 y con digestiones de genoma total de las cepas CFN42 y CFN2001, se observa la misma banda de hibridización en ambas. Esto sugiere que está reiterada en el plásmido d y en el cromosoma y que además los sitios de restricción que los flanquean son idénticos.

Además de la evidencia presentada en este trabajo, existen datos de que regiones adyacentes a los genes estructurales de la nitrogenasa están reiterados en el plásmido y en el cromosoma (H. De la Vega y R. Palacios, datos no publicados).

El estudio de la expresión de los genes de R. phoseoli en el bacteroide y en la bacteria en vida libre, constituye una investigación sobre un proceso de diferenciación en procariotes.

Uno de los ejemplos mejor estudiados de diferenciación en procariotes es el caso de la esporulación de Bacillus subtilis. Existe evidencia de que para que se lleve a cabo la transición de la fase vegetativa a la esporulativa se requiere de la transcripción y traducción de aproximada-

mente 200 genes que no se expresan en el estado vegetativo. Además se ha encontrado que diferentes factores sigma de estimulación de la RNA polimerasa incrementan la transcripción de diferentes genes en diversos estados de diferenciación. También se han detectado cambios en la abundancia relativa de los diferentes RNA mensajeros y de transferencia. Por otro lado, se han detectado alteraciones en los ribosomas y en factores asociados con estos. Aunados a los procesos regulatorios a nivel de transcripción y traducción, las modificaciones postraduccionales también parecen tener un papel en el proceso de diferenciación (87, 88).

Es posible que algunos de los procesos que se llevan a cabo durante la diferenciación de Bacillus, ocurran también en Rhizobium. Estos podrían constituir sistemas generales de regulación en procesos de diferenciación en procariotes.

DISCUSION

Al aislar e identificar tanto los genes bacterianos como los vegetales que participan en el proceso de nodulación, se podrían estudiar los procesos que se llevan a cabo durante la interacción Rhizobium-leguminosa y el establecimiento de la simbiosis. Si se considera que para que pueda establecerse una simbiosis exitosa seguramente se requiere de la expresión coordinada de la información genética tanto de la bacteria como de la planta (15, 16, 17-21); entonces esta simbiosis podría constituir un sistema modelo de regulación génica en el que interactúan secuencias y productos génicos procariotes y eucariotes.

En un intento por conocer la información genética de R. phaseoli que participa durante la nodulación, fueron analizadas por hibridización con RNA total de nódulo, 6000 clonas del banco de genes de la cepa CFN42. Este número de clonas del banco equivale a tener 4 veces representado el genoma, asumiendo insertos de un tamaño promedio de 4.5 kilopares de bases (kpb) y que el tamaño del genoma de R. phaseoli es de 6000 kpb. Con el banco analizado, se obtuvieron clonas que se expresan específicamente durante la simbiosis; entre ellas habían 3 que tienen homología con la clona nif a y 6 posibles clonas simbióticas. Tomando en cuenta que el análisis se hizo con un banco de genes que representaba 4 veces el genoma de la cepa CFN42, era de esperarse que se encontrara una misma clona más de una vez.

Sin embargo lo único que se obtuvo es que hay clonas que parecen tener en común un inserto pequeño. Por ello se considera que deben aislarse más secuencias aparte de las ya caracterizadas hasta ahora, dados los diferentes eventos que ocurren durante la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Además, es importante considerar que el RNA de nódulo utilizado como detector de hibridización provenía de nódulos maduros, lo que implica que probablemente sólo se tengan secuencias que se expresan durante la fase madura del nódulo.

Otra de las cosas que podría explicar el bajo número de secuencias seleccionadas es el hecho de que al extraer el RNA total de nódulo, se obtiene una mezcla de RNA de bacteria y RNA de planta, por lo que si la secuencia que se requiere aislar no es muy abundante, va a estar diluída dentro de toda la población de mensajeros. Esto disminuye las probabilidades de poder detectar una hibridización adecuada. Asimismo, algunos RNA mensajeros pudieran tener una vida media muy corta. Por otro lado, al usar RNA como detector, se está utilizando una población muy heterogénea que reduce la actividad específica de todas las secuencias en general y sobre todo de las que no son muy abundantes.

El hecho de que de 6000 clonas analizadas, solamente se hayan aislado 3 clonas con homología con la clona nif a, sugiere que en ese momento en el nódulo, el RNAm de la nitrogenasa no es uno de los más abundantes, puesto que si

en lugar de analizar el banco con RNA, se usa como detector el pSA30, se obtienen alrededor de 15 clonas nif. Se piensa estudiar más a fondo la expresión de estos genes por técnicas de hibridización aislando RNA de diferentes etapas. La regulación de los genes estructurales de la nitrógenasa parece ser a nivel de transcripción; el mensajero pudiera tener una vida media corta.

La autora considera que las secuencias simbióticas identificadas constituyen los transcritos principales del nódulo maduro. Sin embargo, debe hacerse un análisis más amplio a este respecto ya que entre las clonas seleccionadas se esperaba obtener una misma clona más de una vez.

La bacteria tiene una participación activa en las etapas tempranas de la simbiosis como son la adherencia a la raíz, penetración, formación del hilo de infección (7a). Es por ello que es de gran importancia obtener clonas de etapas más tempranas de nodulación. Una estrategia para lograr esto, sería el aislamiento de RNA total de nódulo a partir de nódulos jóvenes o aún de raíces recientemente infectadas y utilizarlo como detector con un banco de genes de R. phaseoli. Otro enfoque sería el uso de mutantes de R. phaseoli que tuvieran bloqueos en diferentes etapas del proceso de nodulación, para así lograr obtener poblaciones más homogéneas. Aislar RNA de los nódulos obtenidos con dichas mutantes y utilizarlo como detector con un banco de genes de R. phaseoli.

Se ha reportado que los genes de fijación de nitrógeno y nodulación están agrupados y localizados en plásmidos (14, 25, 35, 36, 38, 42a, 48-54, 63, 65-68a). En R. meliloti se utilizó un banco de cósmidos para complementar funciones de nodulación en mutantes obtenidas por mutagénesis con transposones. Al analizar una serie de cósmidos que llevaban clonadas zonas que se sobreponen del megaplásmido simbiótico, se encontró que existen genes de nodulación a 30 kpb de los genes estructurales de la nitrogenasa (29, 34, 36).

Se ha reportado que cepas de R. meliloti que pierden la capacidad de nodular espontáneamente, sufren deleciones en la región nif DH (49, 50). Estos resultados indican que genes que controlan etapas tempranas de nodulación están localizados cerca de la región nif DH del megaplásmido y que por lo tanto en éste, hay genes que controlan funciones tempranas y tardías de la simbiosis (49, 50).

En R. phaseoli también existen evidencias de que los genes de nodulación y fijación de nitrógeno están localizados en una región cercana del plásmido sim de la cepa CFN42. Estos datos se obtuvieron al construir R-primas del plásmido sim y transferirlos a una cepa curada de dicho plásmido.

Por otro lado, en R. leguminosarum se ha mostrado que los genes de la hidrogenasa y la habilidad de nodular se cotransfieren y están en un mismo plásmido (68a).

Cerca de las secuencias que se expresan en los nódulos maduros podrían localizarse secuencias involucradas en fases más tempranas de nodulación; en esta línea podría utilizarse un banco de genes de la cepa CFN42 que se construyó en el fago derivado de λ , el λ 1059 (E. Calva y M. L. Girard, datos no publicados). El peso molecular promedio de los insertos clonados en este banco es de 18 kilopares de bases, por lo que si se aíslan los fagos que hibridicen con RNA total de nódulo de una etapa intermedia es posible que cerca de estas secuencias existan otros genes involucrados en las etapas tempranas de nodulación. También se podrían identificar más secuencias utilizando como detector contra el banco de fagos, las clonas simbióticas aisladas en este trabajo. Los fagos obtenidos se subclonaría para tener fragmentos de DNA más pequeños y estos se hibridizarían contra RNA total de nódulos de diferentes etapas de desarrollo.

El dato de que la mayoría de las clonas analizadas en este trabajo, estén localizadas en el mismo plásmido que los genes nif, va de acuerdo con lo reportado (14, 25, 35, 36, 38, 42a, 48-54, 63, 65-68a). Sin embargo, se tienen 2 clonas: la 6 y la 13 que se encuentran en el plásmido c; no existen antecedentes de que otros plásmidos se expresen durante la simbiosis. Esto sugiere que el resto de los plásmidos podría tener un papel importante durante la simbiosis. Datos preliminares sugieren que cepas curadas del plásmido c, nodulan menos eficientemente que la cepa silvestre (L. Fernández, datos no publicados). Además también

existe evidencia de que algunos genes relacionados con la fijación de nitrógeno están localizados en el plásmido e, de la cepa CFN42 (G. Espín, observación no publicada). Se ha reportado la presencia de algunos genes de nodulación en el cromosoma y éste es el caso de la clona 9 (14, 35).

Las reiteraciones en plásmido y cromosoma de las secuencias simbióticas posiblemente representen una ventaja "evolutiva" que evite la pérdida de este tipo de secuencias. Estas, al no expresarse en la bacteria en vida libre, pudieran no tener presión selectiva que las mantuviera. La reiteración previene la pérdida de estas secuencias aún en el caso en que la cepa fuera sometida a curación del plásmido.

Otra posibilidad que pudiera explicar las reiteraciones es que se requiriera de una dosis génica para que los productos de estas secuencias se sintetizaran y funcionaran adecuadamente.

Un aspecto que también sería interesante investigar, es si las secuencias simbióticas se encuentran agrupadas en el cromosoma o si se encuentran separadas; y si las clonas 3, 7, 12 y 14 presentan el mismo arreglo en el plásmido d. Esta pregunta podría responderse hibridizando cada una de las clonas con el banco de fagos de la cepa CFN42 y analizando los fagos seleccionados. El hecho de que dos clonas se encontraran en un mismo fago, se localizaran en fagos que se sobreponeen o se localizaran en fagos diferentes, podría dar una idea de su organización dentro del genoma.

También es muy importante determinar qué tipo de funciones son las que codifican estas posibles secuencias simbióticas y para ello la estrategia sería utilizar la mutagénesis sitio específica con Tn5. Clonar la mutación en un vehículo que pueda replicarse en Rhizobium, la introducción del vehículo a una cepa silvestre de R. phaseoli; forzar la recombinación para que el gene mutado sustituya al gene silvestre y analizar el fenotipo obtenido. Este procedimiento fue diseñado para mutagenizar el plásmido Ti de Agrobacterium tumefaciens (89). Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en R. meliloti (30).

Otra alternativa para identificar los productos que codifiquen las posibles secuencias simbióticas que se aislén, sería el tener un sistema de transcripción y traducción acoplado (90) o la expresión de estas clonas en un sistema de minicélulas.

Este último enfoque ha sido utilizado para estudiar algunos productos de genes del metabolismo nitrogenado y para los genes nif (71a y 71b).

LITERATURA CITADA

1. Burns, R. C. and Hardy R. W. F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants In: Heidelberg and Berlin eds. Springer Verlag, New York. pp.: 64-122.
2. Phillips, D. (1980). Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 29-49.
3. Pate, J. S., Atkins, C. A., and Rainbird, R. M. (1981). Theoretical and experimental costing of nitrogen fixation and related processes in nodules of legumes. In: Gibson A. H. and Newton, W. E. (eds). Current perspectives in nitrogen fixation. Aust. Acad. Sci. pp: 105-116.
4. Postgate, J. (1978). In: Arnold, E. (ed). Nitrogen fixation. Studies in Biology no. 92. Camelot Press Ltd, England pp. 1-67.
5. Skinner, K. J. (1976). Nitrogen fixation. Chemical and Engineering News. October: 22-35.
6. Roberts, G. P., and Brill, W. J. (1981). Genetics and regulation of nitrogen fixation. Ann. Rev. Microbiol. 35: 207-235.
- 7a. Dart, P. J. (1974). Development of root-nodule symbioses. The infection process. In: Quispel, A. (ed). The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 381-429.
- 7b. Bond, G. (1974). Root-nodule symbioses with actinomycete-like organism. In: Quispel, A. (ed). The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 342-380.
8. Robertson, J. G. and Farnden, K. F. (1980). Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. In: Mifflin, B. J. (ed). Biochemistry of plants. Academic Press, New York. 5: 65-113.
9. Robertson, J. G. et al. (1975). Induction of glutamine synthetase during nodule development in Lupin. Aust. J. Plant. Physiol. 2: 265-272.

10. Verma, D.P.S. (1980). Expression of host genes during symbiotic nitrogen fixation. In: Leaver, C. (ed). Genome organization and expression in plants. Plenum Press, New York, London. pp. 439-452.
11. Marcker, K. A. (1982). The organization of the leghemoglobin genes upon the soybean chromosome. In: Molec. genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symposium. Fed. Rep. Germany: 25.
12. Verma, D. P. S. et al. (1981). Regulation of the expression of leghemoglobin genes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Biochim and Biophys.* 653: 98-107.
13. Verma, D. P. S. et al. (1979). Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules. Characterization of the nascent and released peptides and the relative rate of synthesis of the major leghemoglobins. *Biochemistry* 18: 476-483.
14. Ditta, G., Leong, S., Corbin, D., Barran, L., Stanfield, S., and Helinski, D. (1982). The identification and characterization of symbiotically important genes from Rhizobium meliloti. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symposium, Fed. Rep. Germany: 17.
15. Van den Bos, R. C., Schetgens, Th. M. P., Bisseling, T. and van Kammen, A. (1982). Analysis of nodule specific plant and bacteroid proteins in pea plants inoculated by transposon mutagenized Rhizobium leguminosarum. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symposium, Fed. Rep. Germany: 21.
16. Verma, D. P. S. (1982). Role of the plant genes in soybean Rhizobium interactions. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symposium, Fed. Rep. Germany: 26.
17. Fuller, F., Künstner, P. W., Nguyen, T., and Verma, D. P. S. (1983). Soybean nodulin genes: Analysis of cDNA clones reveals several major tissue-specific sequences in nitrogen-fixing root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2594-2598.

18. Cullimore, J. V., Lara, M., and Miflin, B. J. (1982). Plant genome response to rhizobial symbiosis: synthesis of a novel form of glutamine synthetase in Phaseolus root nodules. In: Molecular genetics of the bacteria plant interaction. 1st. International Symposium, Fed. Rep. Germany: 70.
19. Cuillimore, J. V., Lara, M., Lea, P. J. and Miflin, B. J. (1983). Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of Phaseolus root nodules. Planta 157: 245-254.
20. Lara, M., Cullimore, J. V., Lea, P. J., Miflin, B. J., Johnston, A. W. B. and Lamb, J. W. (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in Phaseolus vulgaris. Planta 157: 254-259.
21. Jochimsen, B., and Rasmussen, O. (1982). Appearance of nodule specific proteins in effective compared to ineffective nodules of soybean. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symposium, Fed. Rep. Germany: 83.
22. Beringer, J. E., Brewin, N. J. and Johnston, A. W. B. (1980). The genetic analysis of Rhizobium in relation to symbiotic nitrogen fixation. Heredity 45: 161-186.
23. Kondorosi, A., and Johnston, A. W. B. (1981). The genetics of Rhizobium. Int. Rev. Cytol. 13 (Suppl): 191-224.
24. Sullivan, D., Brission, N., Goodchild, B., Verma, D. P. S. and Thomas, D. Y. (1981). Molecular cloning and organization of two leghemoglobin genomic sequences of soybean. Nature 289: 516-518.
- 25a. Ausubel, F. M. (1982). Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation. Cell 29: 1-2.
- 25b. Caldwell, B. E. and Vest, H.G. (1977). Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation in legumes: the macrosymbiont. In: Hardy, R.W.F. and Silver, W. S. (eds). A treatise on dinitrogen fixation II. Wiley Interscience publishing Co., London. pp. 557-575.
26. Ruvkun, G. B., Long, S. R., Meade, H. M. and Ausubel, F. M. (1980). Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 45: 492-499.

27. Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E., and Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bact. 149: 114-122.
28. Hirsch, A. M., Long, S. R., Bang, M., Haskins, N., and Ausubel, F. M. (1982). Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of Rhizobium meliloti. J. Bact. 151: 411-419.
29. Long, S. R., Buikema, W. J. and Ausubel, F. M. (1982). Cloning of Rhizobium meliloti nodulation genes by direct complementation of Nod⁻mutants. Nature 298: 485-488.
30. Ruvkun, G. B., and Ausubel, F. M. (1981). A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature 289: 85-88.
31. Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, W. J., and Ausubel, F. M. (1982). Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of Rhizobium mutants. Gene 18: 289-296.
32. Ruvkun, G. B., Sundaresan, V., and Ausubel, F. M. (1982). Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation genes. Cell 29: 551-559.
33. Ruvkun, G. B., Long, S. R., Meade, H. M., Van den Bos, R. C., and Ausubel, F. M. (1982). ISRm1: A Rhizobium meliloti insertion sequence which preferentially transposes into nitrogen fixation (nif) genes. J. Mol. Appl. Genetics 1: 405-418.
34. Kondorosi, A., Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Broughton, W. J., Pankhurst, C. E., Randhawa, G. S., Wong Chee-Hong and Schell, J. (1982). Analysis of symbiotic nitrogen fixation genes carried by the Rhizobium meliloti mega plasmid. In: Molecular genetics of the bacteria plant interaction. 1st. International Symp. Fed. Rep. Germany:13.

35. Forrai, T., Vincze, E., Banfalvi, Z., Kiss, G. B., Randhawa, G. S., and Kondorosi, A. (1983). Localization of symbiotic mutations in Rhizobium meliloti. J. Bact. 153: 635-643.
36. Long, S. R. (1982). Cloning and mapping Rhizobium meliloti nodulation genes. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symp. Fed. Rep. Germany: 16.
37. Beringer, J. E., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., and Johnston, A. W. B. (1978). Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to Rhizobium. Nature 276: 633-634.
38. Buchanan-Wollaston, V., Beringer, J. E., Brewin, N. J., Hirsch, P. R. and Johnston, A. W. B. (1980). Isolation of symbiotically defective mutants in Rhizobium leguminosarum by insertion of transposon Tn5 into a transmissible plasmid. Mol. Gen. Genet. 178: 185-190.
39. Scott, K. F., Hughes, J. S., Gresshoff, P. M., Beringer, J. E., Rolfe, B. G., and Shine, J. (1982). Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved in symbiotic nitrogen fixation genes. J. Mol. Appl. Gen. 1: 315-326.
40. Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M., and Shine, J. (1980). Rapid screening for symbiotic mutants of Rhizobium and white clover. Plant Sci. Letters. 19: 277-284.
41. Maier, R. J., and Brill, W. J. (1976). Ineffective and non-nodulating mutant strains of Rhizobium japonicum. J. Bact. 127: 763-769.
- 42a. Lamb, J. W., Hombrecher, G., and Johnston, A. W. B. (1982). Plasmid-determined nodulation and nitrogen fixation abilities in Rhizobium phaseoli. Mol. Gen. Genet. 186: 449-452.
- 42b. Prakash, R. K., Hooykaas, P. J. J., Ledebøer, A. M., Shilperoort, R. A., Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S. and Dénarié, J. (1980). Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium. In: Newton, W. E. and Orme-Johnson (eds). Nitrogen fixation vol. 2. University Park Press, Baltimore pp. 139-163.

43. Kondorosi, A., Banfalvi, Z., Broughton, W. J., Kondorosi, E., Pankhurst, C. E. and Randhawa, G. S. (1982). Analysis of symbiotic nitrogen fixation genes carried by Rhizobium meliloti plasmid. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symp. Fed. Rep. Germany: 13.
44. Ausubel, F., Buikema, W., Earl, C., Gibbons, S., Long, S., Ruvkun, G., and Zuckerman, R. (1982). Genetic analysis of symbiotic nitrogen fixation genes. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. 1st. International Symp. Fed. Rep. Germany: 14.
45. Ruvkun, G. B. and Ausubel, F. M. (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 191-195.
46. Majer, R. J., Postgate, J. R., and Evans, H. J. (1978). Rhizobium japonicum mutants unable to use hydrogen. Nature 276: 494-495.
47. Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Prakash, R. K., Shilperoort, R. A. and Cannon, F. C. (1979). Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature 282: 533-535.
48. Prakash, R. K., Schilperoort, R. A. and Nuti, M. P. (1981). Large plasmids of fast growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (nif) genes. J. Bacteriol. 145: 1129-1136.
49. Banfalvi, Z., Zakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusna, I. and Kondorosi, A. (1981). Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of R. meliloti. Mol. Gen. Genet. 184: 318-325.
50. Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J. and Casse-Delbart, F. (1981). Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 184: 326-333.
51. Buikema, W. J. (1983). J. Mol. Appl. Genet. en prensa.

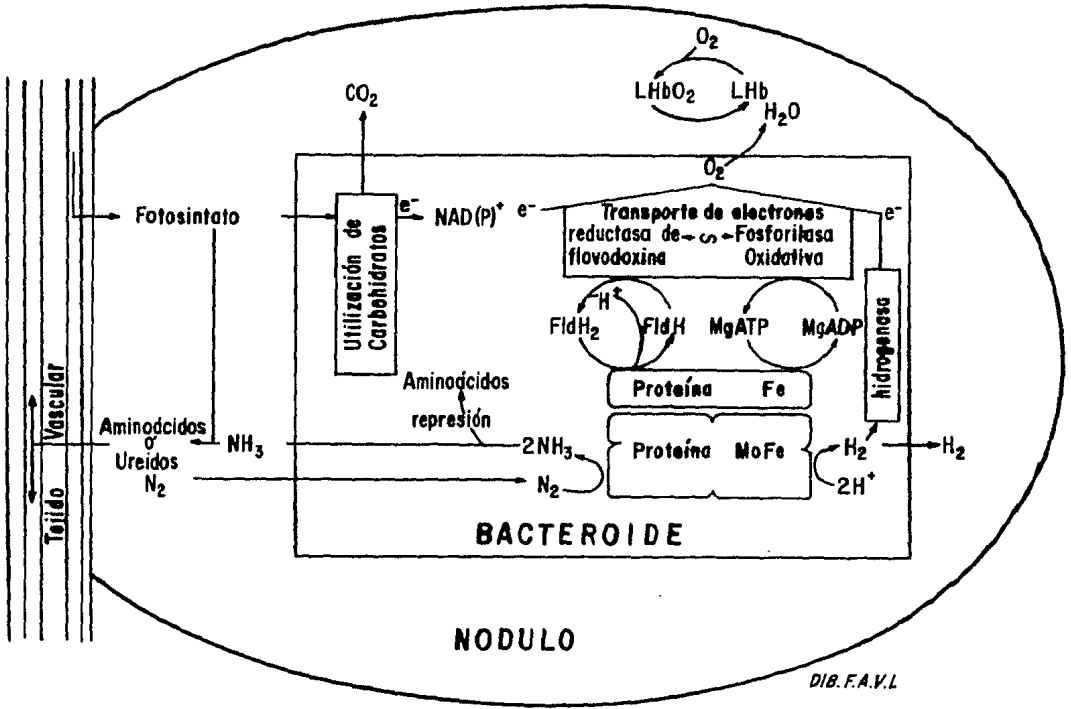
52. Hoykaas, P. J. J., van Brussel, A. A. N., den Dulk-Ras, H., van Slogteren, G. M. S., and Schilperoort, R. A. (1981). Sym plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and Agrobacterium tumefaciens. *Nature* 291: 351-353.
53. Hombrecher, G., Brewin, N. J., and Johnston, A. W. B. (1981). Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in R. leguminosarum and R. phaseoli. *Mol. Gen. Genet.* 182: 133-136.
54. Prakash, R. K., Van Brussel, A. A. N., Quint, A., Mennes, A. M., and Schilperoort, R. A. (1982). The map position of sym plasmid regions expressed in the bacterial and endosymbiotic form of Rhizobium leguminosarum. *Plasmid* 7: 281-286.
55. Haughland, R., and Verma, D. P. S. (1981). Interspecific plasmid and genomic DNA sequence homologies and localization of nif genes in effective and ineffective strains of R. japonicum. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 205-217.
56. Corbin, D., Ditta, G. and Helinski, D. R. (1982). Clustering of nitrogen fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol.* 149: 221-228.
57. Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., and Palacios, R. (1982). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. *Nature* 299: 724-726.
58. Krol, A. J. M., Hontelez, J. G. J., Roozendaal, B., and Van Kammen, A. (1982). On the operon structure of the nitrogenase genes of Rhizobium leguminosarum and Azotobacter vinelandii. *Nucl. Acids. Res.* 10: 4147-4157.
59. Nuti, M. P. Ledboer, A. M., Lepidi, A. A. and Schilperoort, R. A. (1977). Large plasmids in different Rhizobium species. *J. Gen. Microbiol.* 100: 242-248.
60. Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M., and Dénarié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113: 229-242.

61. Hirsch, P. R., Van Montagu, M., Johnston, A.W.B., Brewin, N. J. and Schell, J. (1980). Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 120: 403-412.
62. Johnston, A.W.B., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Setchell, S. M., Hirsch, P. R., and Beringer, J. E. (1978). High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. Nature 276: 634-636.
63. Zurkowski, W., and Lorkiewicz (1979). Plasmid mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii. Arch. Microbiol 123: 195-201.
64. Beynon, J. L., Beringer, J. E., and Johnston, A. W. B. (1980). Plasmids and host range in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium phaseoli. J. Gen. Microbiol. 120: 421-429.
65. Brewin, N. J., Beringer, J. E. Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B. and Hirsch, P. R. (1980). Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 116: 261-270.
- 66a. Krol, A. J. M., Hontelez, J. G. J., Van den Bos, R. C., Van Kammen, A. (1980). Expression of large plasmids in the endosymbiotic forms of Rhizobium leguminosarum. Nucl. Acids Res. 8: 4337-4347.
- 66b. Scott, D. B., Hennecke, H., and Lim, S.T. (1979). The biosynthesis of nitrogenase MoFe protein polypeptides in free-living cultures of Rhizobium japonicum. Biochim. Biophys. Acta 565: 365-378.
67. Krol, A. J. M., Hontelez, J. G. J., and Van Kammen, A. (1982). Only one of the large plasmids in Rhizobium leguminosarum strain PRE is strongly expressed in the endosymbiotic state. J. Gen. Microbiol. 128: 1839-1847.
- 68a. Brewin, N. J., De Jong, T. M., Phillips, D. A. and Johnston, A. W. B. (1980). Co-transfer of determinants for hydrogenase activity and nodulation ability in Rhizobium leguminosarum. Nature 288: 77-79.

- 68b. Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow, D. W. and Ausubel, F. M. (1983). Klebsiella pneumoniae nif A product activates the Rhizobium meliloti nitrogenase promoter. *Nature* 301: 728-732.
69. Brewin, N. J., Beringer, J. E. and Johnston, A.W.B. (1980). Plasmid mediated transfer of host range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum. *J. Gen. Microbiol.* 120: 413-420.
70. Corbin, D., Barran, L., and Ditta, G. (1983). Organization and expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3005-3009.
- 71a. Pühler, A., Klipp, W., and Weber, G. (1982). Expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes in Escherichia coli. In: *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. 1st. International Symp. Fed. Rep. Germ: 15.
- 71b. Pühler, A. and Klipp, W. (1980). Fine structure genetic analysis of the gene region for nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae. In: Trebst, A. and Bothe, H. eds. *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. Springer-Verlag, Berlin pp: 276-286.
72. Martínez, M. E. (1983). Limitantes para la aplicación de la investigación sobre fijación biológica de nitrógeno a la agricultura. Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C.C.H., UNAM.
73. Ortega, M. L. (1979). Bioquímica. In: Mark Engleman, E. (ed). *Contribuciones al conocimiento del frijol (Phaseolus)* en México. In: E. (ed). *Colegio de Postgraduados, Chapingo, México*. pp. 101-112.
74. Turrent, F. A. (1983). Los sistemas agrícolas de México. (Manuscrito). Inédito.
75. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., Mac Donald, R., and Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 24: 5294-5299.
76. Summers, W. (1970). A simple method for extraction of RNA from E. coli utilizing diethyl pyrocarbonate. *Analyt. Biochem.* 33: 459-463.

77. Mc. Master, G. K., and Carmichael, G. G. Analysis of single and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 4835-4838.
78. Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 5201-5205.
79. Bailey, J. M., and Davidson, N. (1976). Methyl mercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. Anal. Biochem. 70: 353-362.
80. Craig, E. A., Mc. Carthy, B. J., and Wadsworth, S. C. (1979). Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock induced proteins of D. melanogaster. Cell 16: 575-588.
81. Grunstein, M. and Hogness, D. S. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961-3965.
82. Bolívar, F., and Backman, K. (1979). Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods. Enzymol. 68: 245-267.
83. Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3: 208-218.
84. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Molec. Biol. 98: 503-517.
85. Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Hodes, C. and Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Molec. Biol. 113: 237-251.
86. Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1: 584-588.
87. Bott, K. F. (1976). Regulation of bacterial sporulation. In: Mac Donald, K. D. (ed). Genetics of Industrial Microorganisms. Academic press, New York. pp: 419-436.

88. Young, M. (1978). Bacterial endospore development - an ordered sequence of gene transcription. TIBS, March: 55-59.
89. Leemans, J., Shaw, C., Deblaere, R., De Greve, H, H., Hernaltsteens, J. P., Maes, M., Van Montagu, M., and Schell J. (1981). Site-specific mutagenesis of Agrobacterium Ti plasmids and transfer of genes to plant cells. J. Mol. App. Genet. 1: 149-164.
90. Yang, H. L., Ivashkiv, L., Chen, H-Z., Zubay, G., and Cashel, M. (1980). Cell-free coupled transcription - translation system for investigation of linear DNA segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 7029-7033.



DIB. F.A.V.L

Esquema I.-Eventos metabólicos que se llevan a cabo en el nódulo maduro.

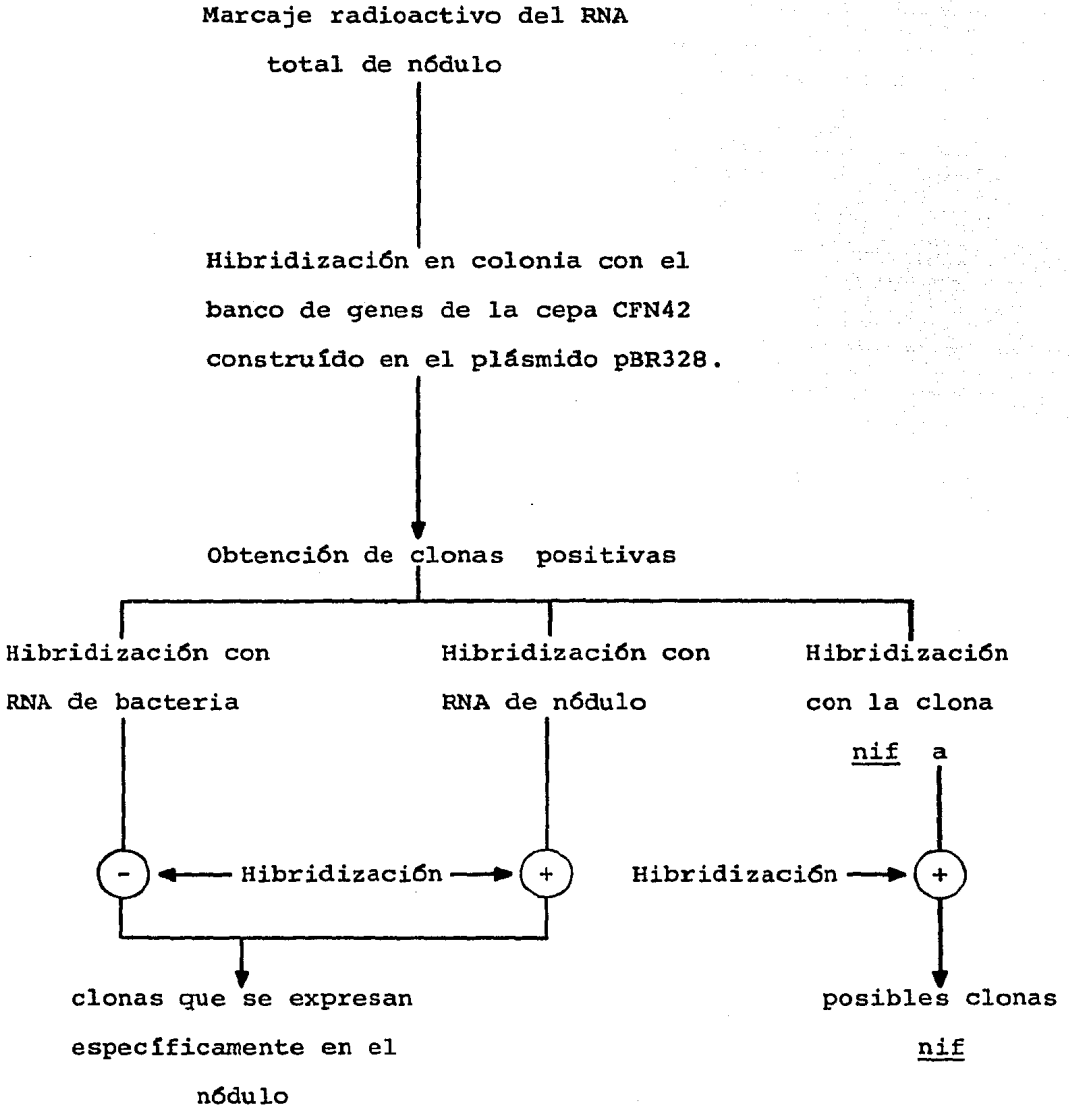


FIGURA 1.- Estrategia Experimental

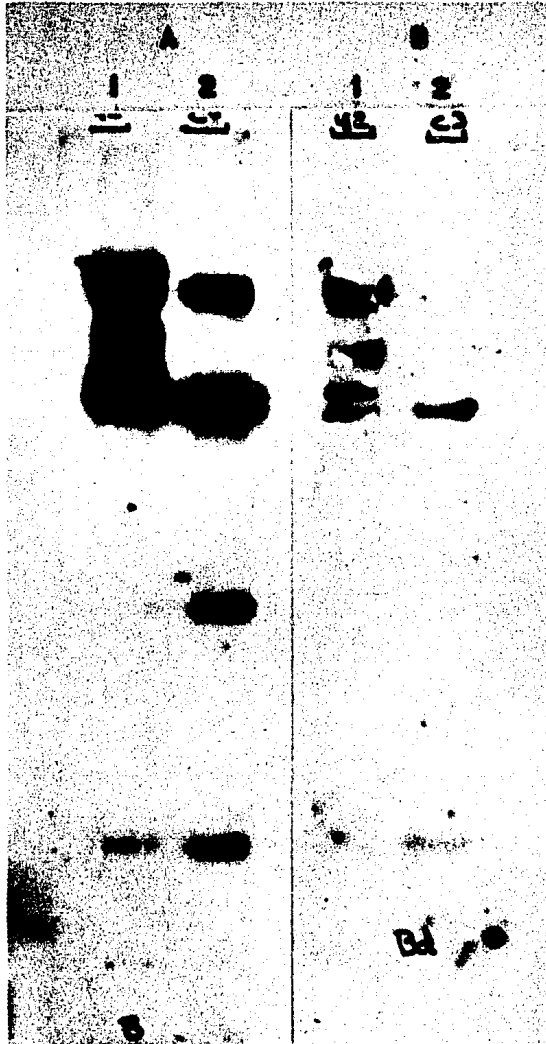


FIGURA 2.- Análisis comparativo de la información genética que se expresa en la bacteria y en el bacteroide. Hibridización tipo Southern de digestiones de genoma total de las cepas CFN42 (1) y CFN2001 (2) contra A) RNA de bacteria crecida en vida libre hasta fase estacionaria y B) RNA de bacteroide. El RNA se hidrolizó parcialmente con álcali y se marcó radioactivamente con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP en el extremo 5' (80).

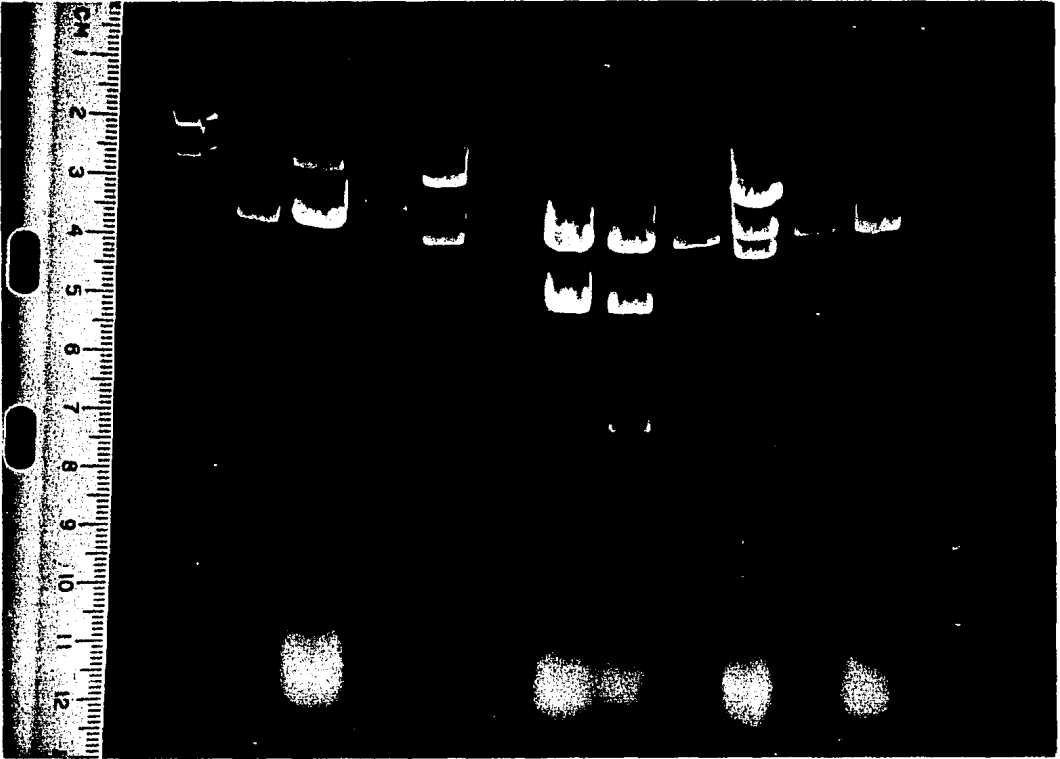


FIGURA 3.- Patrones de restricción de algunas de las clonas seleccionadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de digestiones con EcoRI de los plásmidos recombinantes de las clonas seleccionadas. Carril 1, Hind III; 2, pBR328; 3, clona 3; 4, clona 6; 5, clona 7; 6, clona 8; 7, clona 9; 8, clona 10; 9, clona 12; 10, clona 13; 11, clona 14; 12, pBR328. Hind III se incluyó como marcador de peso molecular.

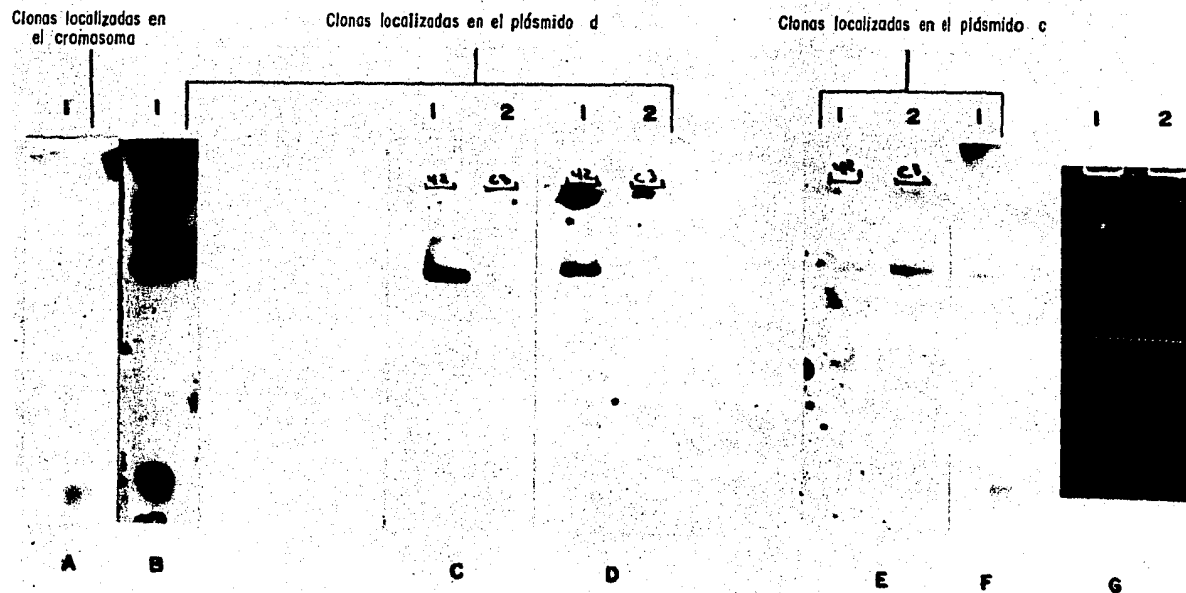


FIGURA 4.- Localización de las posibles clonas simbióticas en plásmidos de R. phaseoli. Hibridización tipo Southern de patrones de plásmidos de las cepas 1)CFN42 y 2)CFN2001 contra diferentes clonas específicas de simbiosis, marcadas radioactivamente. (72). Los detectores se ajustaron a 2×10^6 cpm/carril. Carril A, clona 9; B, clona 3; C, clona 7; D, clona 14; E, clona 6; F, clona 13; G, tinción con bromuro de etidio del patrón de plásmidos de las cepas CFN42(1) y CFN2001(2).

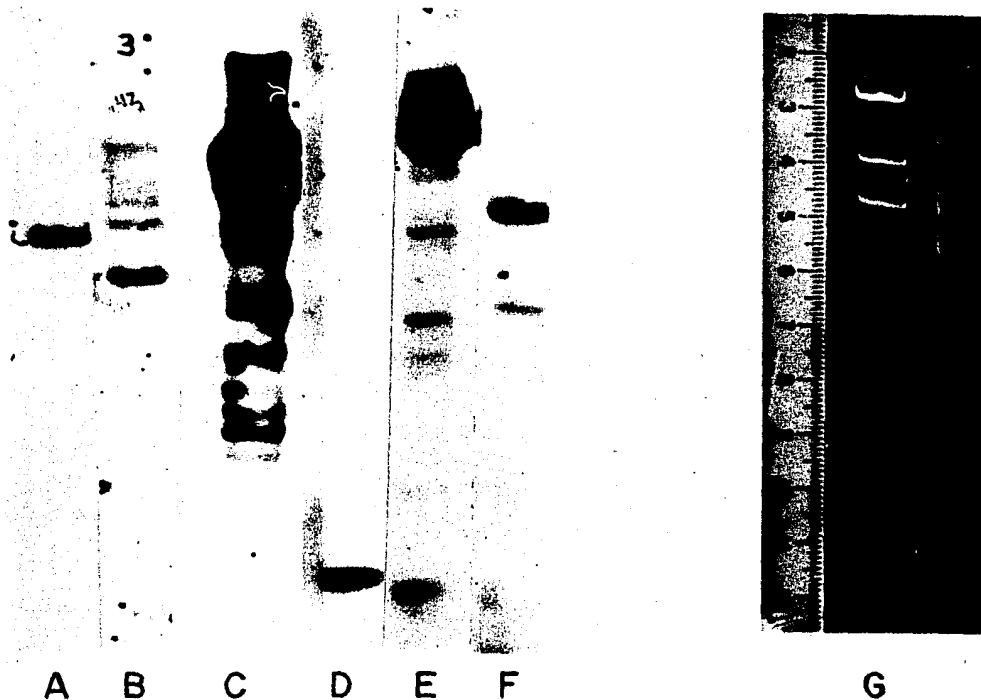


FIGURA 5.- Organización genómica de las clonas simbióticas. Hibridización tipo Southern de digestiones con *Eco*R1 de genoma total de *R. phaseoli* cepa CFN42 contra diferentes clonas específicas de simbiosis, marcadas radioactivamente. Se utilizó 0.5×10^6 cpm/carril. Carril A, clona 9; B, clona 3; C, clona 7; D, clona 14; E, clona 6; F, clona 13; G, tinción con bromuro de etidio de la digestión de genoma total de la cepa *R. phaseoli* CFN42.

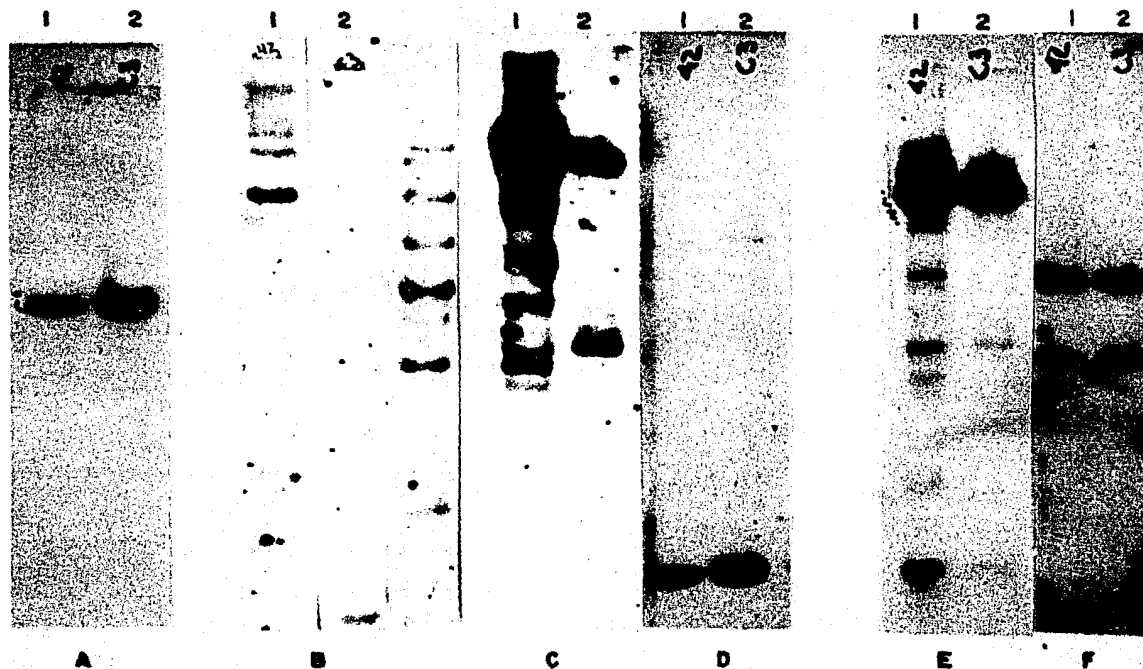


FIGURA 6.- Reiteraciones de las clonas simbióticas. Hibridización tipo Southern de digestiones de genoma total con *Eco*R1 de las cepas 1) CFN42, 2) CFN2001 y 1') *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1, a la cual se le transfirió el plásmido sim de la cepa CFN42 (p42d); contra las clonas identificadas como específicas de simbiosis, marcadas radioactivamente. Se utilizaron 0.5×10^6 cpm/carril. Carril A, clona 9; B, clona 3; C, clona 7; D, clona 14; E, clona 6; F, clona 13.

ESPECIE DE Rhizobium

LEGUMINOSA A LA QUE INFECTA

<u>R. meliloti</u>	alfalfa (<u>Medicago</u> sp)
<u>R. trifolii</u>	trébol (<u>Trifolium</u> sp)
<u>R. leguminosarum</u>	chícharo (<u>Pisum</u> sp, <u>Vicia</u> sp)
<u>R. phaseoli</u>	frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>)
<u>R. lupini</u>	altramuz (<u>Lupinus</u> sp)
<u>R. japonicum</u>	soya (<u>Glycine max</u> sp)

TABLA I Clasificación de Rhizobium de acuerdo al tipo de leguminosa que infecta.

NUM. CLONA	DETECTOR RADIOACTIVO		
	RNA TOTAL DE NODULO	RNA TOTAL DE BACTERIA	INSERTO clona <u>nif a</u>
1	+	+	+
2	+	ND	-
3	+	+	+
4	+	+	-
5	+	+	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	+
9	+	-	-
10	+	+	-
11	+	+	-
12	+	-	-
13	+	-	-
14	+	-	-
15	+	+	-

+ Hibridización positiva
 - Hibridización negativa
 ND No determinado

TABLA II Selección de clonas que se expresan específicamente en el nódulo