

03062
2
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CLONACION Y CARACTERIZACION DE UNA SECUENCIA DE DNA
RELACIONADA CON LA EXPRESION DE LOS CITOCROMOS DE
TIPO b Y c Y SU RELACION CON LA FIJACION DE NITROGENO
EN Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli.

T E S I S

Para obtener el grado de Maestría
en Investigación Biomédica Básica.

Presenta

GERMAN RUBEN AGUILAR GUTIERREZ

Cuernavaca, Morelos, a 14 de junio de 1991.



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 está 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.

I N T R O D U C C I O N .

Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli es una bacteria Gram-negativa que vive normalmente en el suelo y que es capaz de formar una asociación simbiótica con las raíces de la planta del frijol (Phaseolus vulgaris). Este tipo de asociación da origen a un órgano conocido como nódulo, en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. El nódulo está formado por tejidos de la planta. Durante el establecimiento de la simbiosis, las bacterias atraviesan un proceso de diferenciación a nivel morfológico y metabólico, y es precisamente la forma diferenciada denominada bacteroide, la que fija nitrógeno atmosférico bajo condiciones fisiológicas de microaerofilia. Esta condición es requerida para que el complejo enzimático de la nitrogenasa que es sensible a oxígeno, pueda llevar a cabo la fijación de nitrógeno (1).

La fijación de nitrógeno en el bacteroide se encuentra limitada por la disponibilidad de esqueletos de carbono de la planta. Durante la simbiosis entre Rhizobium y la planta, ésta última provee a los bacteroides de sustratos de carbono para garantizar el poder energético y reductor necesario para la fijación de nitrógeno, a la vez de que la planta requiera de carbono y poder energético para poder asimilar el amonio el cual es el producto de la fijación de nitrógeno (2,3).

METABOLISMO DEL CARBONO EN Rhizobium.

Estudios fisiológicos.

Varios compuestos de carbono fueron probados por su capacidad de mantener la respiración en bacteroides aislados. Los primeros estudios (5) demostraron que la respiración de los bacteroides de Bradyrhizobium japonicum es incrementada en mayor grado por succinato que la ocasionada por glucosa. La velocidad de entrada de la glucosa es lenta con relación a la del succinato o malato dado que es un proceso pasivo (7,8).

Hay evidencia de que el glutamato está también involucrado en la respiración de R. japonicum. Succinato y malato son transportados más rápidamente que el glutamato. Sin embargo, la proporción de glutamato convertido en CO_2 es substancial comparada con la de los ácidos dicarboxílicos (12).

De esta forma se sabe que son los ácidos orgánicos, más que los carbohidratos, la fuente de energía preferencialmente utilizada por los bacteroides. Actualmente, también se sabe que estos son la fuente de energía utilizada para llevar a cabo la fijación de nitrógeno (6,7,8,9,10,11).

Estudios genéticos.

La generación de mutantes en transporte y metabolismo del carbono han confirmado mucho de los estudios relacionados a los requerimientos de carbono durante la simbiosis.

El succinato, el fumarato y el malato son transportados por el mismo sistema, tanto en bacteroides como en células en cultivo de *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *R. japonicum*. Las mutantes deficientes en el transporte de succinato son invariablemente deficientes en la asimilación de otros ácidos dicarboxílicos (13-15,16).

Las mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* con lesiones en la glucoquinasa, en la asimilación de fructosa, en la vía de Entner-Doudoroff y en la piruvato carboxilasa, pueden llevar a cabo una simbiosis efectiva con la planta de trébol (4). Esto sugirió, que ni la glucosa, ni la fructosa o la sacarosa son requeridas para la fijación de nitrógeno en los bacteroides de estas cepas (4,13).

Los análisis subsiguientes, demostraron que los ácidos dicarboxílicos son requeridos para una formación efectiva de los nódulos. Cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* incapaces transportar o de crecer en succinato o fumarato, retienen su capacidad para nodular trébol. Sin embargo, éstos nódulos fueron inefectivos.

S I S T E M A R E S P I R A T O R I O .

Respiración bacteriana.

En términos generales la respiración bacteriana puede definirse como la transferencia termodinámicamente espontánea de equivalentes reductores, a partir de un reductor a un oxidante a través de una serie de componentes redox unidos predominantemente a membrana citoplasmática. Este proceso está acompañado de un cambio en energía libre, el cual depende de la diferencia de potencial del par redox (59,60).

La transferencia de electrones de alta energía por los complejos respiratorios, está acoplada a la translocación vectorial de protones al lado externo de la membrana. Esto permite crear un potencial electroquímico de protones que puede ser utilizado para sintetizar ATP (60).

Componentes de las cadenas respiratorias bacterianas:

La cadena de transporte de electrones bacteriana está constituida por diferentes componentes que asemejan a la cadena respiratoria mitocondrial (61,62). Esta incluye a las deshidrogenasas del malato, del succinato y del NADH, proteínas hierro-azufre, quinonas y citocromos del tipo a, b, c, d y e. La

1) Flavoproteínas.

Las más comunes son las que oxidan L-malato, D- y L-lactato, L-glicerol-3-fosfato y L-dihidro-orotato. Todas contienen FMN (flavin-adenin-mononucleótido) excepto la L-lactato deshidrogenasa que contiene FAD (flavin-adenin-dinucleótido). Estas proteínas tienen al menos una subunidad que está localizada del lado citoplásmico de la membrana, a la cual están acoplados fosfolípidos específicos por medio de interacciones hidrofóbicas (60).

NADH deshidrogenasa.

Este sistema enzimático (también llamado Complejo I), cataliza la transferencia de equivalentes reductores desde el NADH (nicotin-adenin-dinucleótido en su forma reducida) hasta la ubiquinona o la menaquinona, siendo la vía de entrada de electrones más importante para casi cualquier sistema respiratorio. El complejo puede translocar protones en la mayoría de las bacterias quimiheterotrofas (64). La enzima contiene flavina unida no covalentemente (FMN o FAD) y más de cuatro centros Fe-S (60).

Succinato deshidrogenasa.

Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato y transfiere equivalentes reductores preferentemente a la ubiquinona. El alto potencial redox del par fumarato-succinato ($E_m +30$ mV) hace insignificante la contribución de esta enzima en la conservación de energía, lo que impide el bombeo de protones (60).

2) Quinonas

Las quinonas más comunes en los sistemas transportadores de electrones bacterianos son la ubiquinona (UQ) y la menaquinona (MQ), las cuales están formados por núcleos de 1,4-benzoquinonas o naftoquinonas unidos a largas cadenas de poliisoprenos. La forma reducida de las quinonas acepta 2H para formar los quinoles respectivos, los cuales se forman vía los intermediarios semiquinona, y esto a su vez pueden ionizarse para formar el anión QH^- (60).

La ubiquinona es componente redox de las bacterias Gram-negativas mientras que la menaquinona parece ser casi exclusiva de las Gram-positivas; sin embargo, las bacterias facultativas como las Enterobacteriaceae (por ejemplo *E. coli*) contienen ambas quinonas. La UQ es la quinona principal durante la respiración aerobia o con nitrato como aceptor, mientras la MQ, de potencial redox más negativo, está involucrada en la respiración del fumarato (60).

3) Citocromo a_{3m} .

En bacterias esta oxidasa es la más parecida a la oxidasa mitocondrial. Sin embargo, se distingue porque tiene menos subunidades que la mitocondria y por estar asociada a los citocromos b_5 (64). Esta oxidasa está presente en la mayoría de los diferentes grupos bacterianos (66). El citocromo a_{3m} es reemplazado por citocromo g cuando las bacterias se cultivan en bajas tensiones de oxígeno (67,68). La absorción característica de los grupos hemo tipo g da una absorción de 424 y 602 nm para la enzima oxidada, y de 445 y 605 nm para la enzima reducida (64). Como en el caso de la enzima mitocondrial el citocromo a_{3m} , los dos grupos hemo se distinguen por sus propiedades de unir ligandos. Citocromo g_a une, en su forma reducida CO , cianuro y otros ligandos. El citocromo g no une estos ligandos (72). El citocromo a_{3m} contiene 2 o 3 átomos de cobre que son importantes para la reducción del oxígeno (62). La enzima tiene una K_m por el oxígeno de 4 a 8 μM (68) por lo que se distingue como la oxidasa terminal con menor afinidad por el oxígeno.

El citocromo a_{3m} funciona como una bomba de protones (64). Esto ha sido demostrado con la enzima purificada y reconstituida en vesículas membranales de tres diferentes especies bacterianas (73,74,75).

4) Citocromo g.

El citocromo g es la oxidasa terminal más representada en diferentes especies de bacterias (68). Este citocromo está formado por 2 o 4 subunidades dependiendo la especie, y se puede encontrar otro grupo hemo b o hemo c asociado al hemo b del citocromo g (64). Se ha propuesto que el citocromo g puede participar en dos tipos de cadenas respiratorias dependiendo si oxidan a citocromo tipo b o citocromos tipo c (62).

El citocromo g tiene una absorción característica de citocromo de tipo b con picos a 430 y 560 nm. Por lo que además de su identificación espectrofotométrica es necesario identificarlo por su capacidad de reaccionar con CO (64). Los espectros de preparaciones reducidas más CO, muestran señales típicas con un pico a 417 y valles a 430 y 560 nm.

En diferentes especies bacterianas se ha reportado que el citocromo g tiene una Km por O₂ de 1.8 a 6.5 μM (64). Sin embargo, se han reportado Km menores a 1 μM en E. coli (81), Salmonella typhimurium (82) y Beneckea natriagens (68).

El citocromo g de E. coli es capaz de generar un potencial de membrana cuando se reconstituye en proteoliposomas en presencia de ubiquinona-8 y piruvato oxidasa. En otro estudio se demostró que la oxidación de quinol (donador de hidrógeno) involucra la liberación de protones al exterior de las membranas, sin embargo, utilizando N,N,N',N'-Tetrametil para-fenilendiamina (TMPD) como donador de electrones se presenta un cambio en el pH externo muy bajo (83). Estos datos demuestran que el citocromo g no cataliza una translocación vectorial de protones, sino que genera un gradiente de pH a través de reacciones que consumen y liberan H⁺ en diferentes lados de la membrana (65). Sin embargo, en Redonseudomonas capsulata se ha propuesto que el citocromo g sí funciona como una bomba de protones (85).

5) Citocromo d.

El citocromo d se puede encontrar entre bacterias Gram-negativas heterotróficas. El citocromo d generalmente se encuentra asociado al citocromo g como oxidasa alterna (64).

En cuanto a su regulación se ha reportado que el citocromo d se expresa en condiciones de limitación de oxígeno. Sin embargo, ésta es solo una de las condiciones donde se induce la expresión de citocromo d. El citocromo d también se expresa en la fase estacionaria de crecimiento, en el crecimiento en anaerobiosis, en presencia de cianuro y en condiciones de limitación de cobre (88).

Un complejo enzimático que contiene la oxidasa g se purificó de *E. coli* y de *Photobacterium phosphoreum* (89,90). En estas dos bacterias se encontró que el complejo esta formado por dos subunidades de diferente peso molecular. El hemo g es capaz de unir CO (89,90,92,93). La oxidasa purificada no tiene cobre. La oxidación de quinol por citocromo g se inhibe con concentraciones de cianuro y azida mucho mayores que las requeridas para inhibir la oxidación de quinol por citocromo g (89,90).

El citocromo g reacciona con O₂ y CO y presenta una Km por el oxígeno que va de 0.02 a 0.39 μM, lo que distingue a este citocromo como la oxidasa bacteriana con mayor afinidad por el oxígeno. En *Acetobacter pasteurianus* se demostró por experimentos de fotodisociación que el citocromo a₁ y h_{em}m participan en la reducción de citocromo g (80).

El citocromo g de *E. coli* se ha reconstituido en proteoliposomas y se demostró que es capaz de generar un potencial de membrana hasta de 160 a 180 mV, y se ha sugerido que este potencial se produce de una manera análoga al producido por el citocromo g (96).

6) Citocromo a₁.

Los estudios originales de la composición de citocromos de la bacteria *A. pasteurianus* mostró una banda de absorción a 589 nm que desaparecía al agitar los cultivos mantenidos en reposo (100). La absorción a 589 nm era lo suficientemente lejana a la de citocromo a_{1a} (600 nm) lo que permitió distinguir estas dos oxidazas (64). Sin embargo, se ha demostrado que en el caso de ciertos pigmentos que absorben luz a cerca de 590 nm no funcionan como oxidazas terminales (64). Este es el caso de *E. coli*, *Halobacterium halobium* y *Rhizobium* sp. en los cuales se demostró que el citocromo a₁ tiene un hemo de tipo g que pudiera ser una hidroperoxidasa (64). Sin embargo, en otras especies bacterianas se demostró la participación de citocromo a₁ como oxidasa con experimentos de fotodisociación y unión de oxígeno (64).

TRANSPORTE DE ELECTRONES EN Rhizobium.

Diferencias entre el crecimiento en vida libre y el bacteroide.

El sistema de transporte de electrones de las rizobiáceas ha sido estudiado, en especial el de R. japonicum, y en menor grado en Eradyrhizobium sp. (Lupinus), y en R. leguminosarum bv. viciae. Así mismo, existen diferencias significativas en la composición y organización del sistema respiratorio de los bacteroides y el de las células en vida libre. El tipo de citocromos y de deshidrogenasas son básicamente diferentes en el bacteroide (19-27). Sin embargo, las diferencias parecen radicarse principalmente en el tipo de oxidasa que se encuentra en cada forma diferenciada de la bacteria. Rhizobium en vida libre, puede crecer en varias condiciones: aeróbicamente, microaerófilicamente en 2% de oxígeno, y quimiolitotróficamente con H_2 y CO_2 como fuente de energía y de carbono respectivamente. En cada condición mencionada existe expresión diferencial del sistema respiratorio (20,23,24,27).

R. japonicum en vida libre contiene citocromos intermedios de tipo b y c, y como oxidasas terminales a los citocromos ata₂ y q. Los citocromos ata₂ y q forman un complejo con monóxido de carbono en una atmósfera de $CO-O_2$ (95:5, v/v), sin embargo, la respiración no es inhibida completamente bajo estas condiciones, por lo que parece ser que existe al menos otro componente que se expresa en vida libre y que actúa como oxidasa terminal (27).

La expresión de oxidasa múltiples es común en las bacterias, lo que permite a estos organismos sobrevivir en un amplio rango de concentraciones de oxígeno.

Se ha descrito que los citocromos c y ata₂ forman parte de una misma rama del sistema de transporte de electrones, mientras que el citocromo q forma parte de otro ramal el cual no oxida citocromo q. Una cepa mutante de R. japonicum que carece de citocromo q y ata₂ tiene propiedades respiratorias idénticas que la mutante que sólo carece de citocromo ata₂. Esto sugiere que los citocromo c y ata₂ forman parte de una sola unidad funcional (22).

El sistema de transporte de electrones de R. leguminosarum bv. trifolii en vida libre es similar al de R. japonicum, en el sentido de que ambas bacterias poseen el punto de ramificación del sistema respiratorio a nivel de citocromo b, en donde los citocromos de c y ata₂ forman una rama separada de citocromo q (30).

Tanto R. leguminosarum bv. trifolii, R. leguminosarum bv. viciae como R. leguminosarum bv. phaseoli expresan el citocromo q bajo condiciones de aereación restringida (120), y aunque si bien su función como oxidasa no ha sido demostrada en Rhizobium (25).

En cuanto a la capacidad de la cadena respiratoria en *Rhizobium* en vida libre para oxidar diferentes sustratos, en términos generales, se ha observado que el NADH es el sustrato que se oxida preferencialmente, mientras que el succinato se oxida a menor velocidad (32,33). Datos provenientes de la utilización de distintos inhibidores de la respiración y de una mutante deficiente en citocromo ata_2 de *R. japonicum* demostraron que el NADH y el TMPD son oxidados por oxidasas distintas a las que oxidan el succinato (22). La alta velocidad de oxidación del NADH y TMPD de los extractos libres de células comparada con la velocidad de oxidación del succinato, puede deberse a la especificidad que las oxidasas tienen por los sustratos. Se ha sugerido que el citocromo ata_2 tiene una alta velocidad de recambio, y puede soportar un flujo más alto de electrones de lo que puede soportar el citocromo g . Sin embargo, el citocromo g , parece ser más adecuado para funcionar en condiciones de bajo O_2 que el citocromo ata_2 . Las células crecidas bajo condiciones restringidas de aereación tienen disminuido, o no tienen citocromo ata_2 (34,35,36), lo cual es consistente con la idea de que este último no es funcional bajo condiciones limitantes de oxígeno.

Generalmente, la expresión de citocromo ata_2 y citocromo g en *Rhizobium* es reprimida en los nódulos de la raíz, en su lugar otras oxidasas son expresadas para mantener la simbiosis (20,25,37). La disminución en la concentración de citocromo ata_2 ha sido correlacionada con el incremento en la actividad de nitrógenasa en bacteroides de *R. japonicum* (38). Sin embargo, el citocromo ata_2 es retenido en bacteroides de cepas infectivas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (49) y *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. parasponia*, *R. japonicum* (20,39,42). Mutantes de *R. leguminosarum* biovar *chassoli*, expresan citocromo ata_2 en condiciones microaerofílicas son más eficientes en fijar nitrógeno. (32,33).

Por lo que la sola presencia de citocromo ata_2 en nódulos, no es prueba de que este pueda funcionar a bajas tensiones de oxígeno. La actividad de oxidasa de citocromo ata_2 es igual que la de los citocromos p y g , no ha sido demostrada en nódulos (31). Una cepa mutante deficiente en citocromo ata_2 de *R. japonicum* que expresa normalmente esta oxidasa durante la simbiosis, es capaz de producir nódulos efectivos (47). Por estas observaciones, es difícil correlacionar la presencia de citocromo ata_2 con la fijación de nitrógeno.

Los bacteroides de *R. japonicum* expresan citocromos C_{550} , C_{560} , P_{420} , P_{430} , P_{440} , todos estos reaccionan con el monóxido de carbono, por lo que pueden considerarse como oxidasas (48,27). Los bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) también expresan citocromo P_{420} (49) como lo hace, aunque en menor medida la cepa PRE de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (39). Los bacteroides de *R. japonicum* también contienen componentes sin

grupo hemo, los cuales tienen una alta actividad de citocromo c oxidasa. Esta actividad es sensible a la atebriina, al cianuro y a otros agentes metaloquelantes, pero no lo es al monóxido de carbono. Esta actividad puede ser parcialmente restaurada por FAD o FMN, lo cual sugiere que la oxidasa puede ser una flavoproteína (41). La figura No. 1 muestra un esquema de las posibles vías de respiración en el bacterioides de Rhizobium.

El control de síntesis de ATP por oxígeno en los organismos fijadores de nitrógeno se ha explicado en términos de la existencia de un sistema respiratorio ramificado, con un ramal que tiene una oxidasa más afin por el O_2 y otra ineficiente o menos afin por el oxígeno (53). La rama más eficiente de la respiración es inhibida por CO , mientras que la respiración menos eficiente que ocurre por arriba de $1 \mu M$ de O_2 es insensible a este inhibidor (50,55,56).

A altas concentraciones de O_2 (más de $1 \mu M$) la respiración de los bacterioides de R. japonicum está desacoplada para la síntesis de ATP (56). Por lo que se ha propuesto que el transporte de electrones desacoplado funciona como "protección respiratoria", manteniendo baja la concentración intracelular de O_2 , para impedir la inactivación de la nitrogenasa causada por este gas.

NITROGENASA.

Sensibilidad a oxígeno.

La nitrogenasa es la enzima que cataliza la reducción del N_2 a NH_3 . Está formada por dos componentes (102). El componente I o proteína Fe-Mo, tiene un peso molecular de 200,000 daltones; está formada por dos tipos de polipéptidos que forman un tetrámero. Este componente contiene uno o dos átomos de molibdeno y de veinte a treinta átomos de hierro.

El componente II o proteína-Fe, tiene un peso molecular de 50,000 daltones, está formada por dos subunidades idénticas que contienen de uno a cuatro átomos de hierro.

La proteína II es reducida por algún donador de electrones (ferrodoxinas, flavodoxinas, NADPH). En el estado reducido forma un complejo con Mg-ATP, lo que provoca un cambio conformacional que permite la interacción con el componente I y la transferencia de un par de electrones a éste componente; este proceso está ligado a la hidrólisis de ATP. La proteína I reducida cataliza la reducción de N_2 . Así la reducción de nitrógeno molecular se lleva a cabo, dando como productos NH_3 y H_2 (103). Los dos componentes de la nitrogenasa son sensibles al O_2 (1). El componente II es más sensible que el componente I.

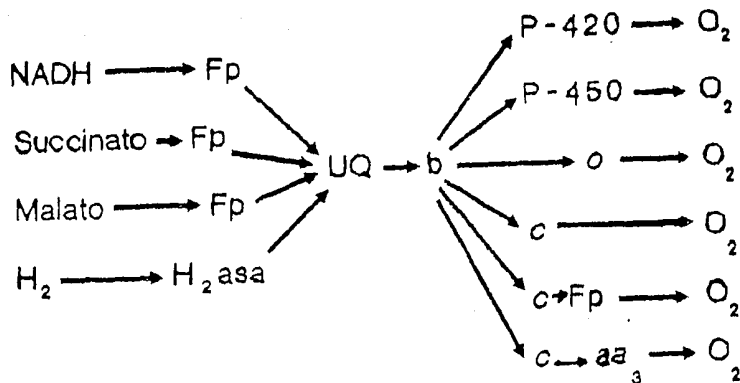


FIGURA 1

ESQUEMA DE LAS POSIBLES VIAS DE RESPIRACION EN EL BACTEROIDE DE Rhizobium. SE TOMA EN CUENTA LAS DIFERENTES OXIDASAS PROPUESTAS.

ABREVIATURAS: Fp, FLAVOPROTEINA; UQ, UBIQUINONA.

Tomado de Barquera, B. (44)

A pesar de la sensibilidad al oxígeno de la nitrogenasa, la capacidad de fijar nitrógeno se ha encontrado en microorganismos que son aeróbicos estrictos (105). Esto implica el desarrollo de diferentes estrategias que permiten la protección de la nitrogenasa de O_2 o de nitrogenasas insensibles al oxígeno (1).

PROTECCION DE LA NITROGENASA DEL O_2 DURANTE LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.

1) LEGHEMOGLOBINA

Propiedades y función.

La leghemoglobina es una hemoproteína, de tipo globina, involucrada en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno, y se encuentra en los nódulos de la raíz de las leguminosas (106). Algunas otras hemoglobinas relacionadas también han sido identificadas en asociaciones simbióticas de Bradyrhizobium sp. con Parasponia, y en lo que se denomina simbiosis "actinorhizobial" de Frankia con varias plantas hospedadas no leguminosas (19).

Esta proteína es de gran importancia para el proceso de la fijación simbiótica de nitrógeno, dado que controla la concentración de oxígeno en el nódulo, evitando de esta forma que la enzima de la nitrogenasa sea inactivada por este gas. Rhizobium es un microorganismo aerobio estricto, por lo tanto requiere de oxígeno para obtener la energía necesaria para su metabolismo; así la leghemoglobina une oxígeno reversiblemente con gran afinidad, difundiendo a los bacteroides, con un flujo que permite el funcionamiento del metabolismo aeróbico y al mismo tiempo mantiene la concentración de oxígeno lo suficientemente baja para que la nitrogenasa no sea dañada. Se sabe que es la más abundante de las proteínas dentro del nódulo: constituye hasta el 25% de la proteína soluble total del nódulo maduro, dándole su característico color rosa. La apoproteína de la leghemoglobina es un producto de la planta, mientras que el grupo prostético hemo es sintetizado por la bacteroide. (107).

2) BARRERA CONTRA LA DIFUSION DE O_2 .

La existencia de una barrera contra la difusión de O_2 en el interior del nódulo se ha estudiado utilizando microelectrodos de O_2 , con los cuales se demostró que la concentración interna de oxígeno en el nódulo se regula en respuesta a la concentración externa de este gas (108), sin que ocurran cambios en la respiración (109). Se ha propuesto que la barrera se localiza en la corteza nodular que rodea a las células infectadas (110). También se ha sugerido que esta barrera consiste de una capa de células con espacios intracelulares (111).

3) PROTECCION RESPIRATORIA.

El mecanismo de protección protección respiratoria en organismos fijadores de nitrógeno se reportó inicialmente en A. vinelandii, en donde se ha reconocido el papel central del sistema respiratorio sobre el proceso de la fijación, (112,113). El sistema respiratorio aporta la energía para la síntesis de ATP necesario, además de la protección de la nitrogenasa contra el efecto dañino del oxígeno. Esto se propuso cuando se reportó que A. vinelandii consume más carbono del que se requiere para satisfacer sus necesidades energéticas y de crecimiento, cuando se cultiva en altas tensiones de O_2 y en ausencia de nitrógeno (115). Cuando A. vinelandii se cultiva en estas condiciones su capacidad respiratoria aumenta de manera considerable y este aumento en la respiración no está acoplado a la síntesis de ATP (116,117). El citocromo *c*, tienen un papel preponderante. Esta enzima funciona de manera desacoplada permitiendo el consumo de oxígeno rápido, de hecho, la actividad del citocromo *c* en A. vinelandii, le permite a esta bacteria tener la más alta tasa respiratoria reportada (114).

En diferentes especies de Rhizobium existe evidencia que sugieren la existencia de protección respiratoria. Los bacteroides de B. japonicum tienen dos sistemas de oxidasa de diferente afinidad por el O_2 , pero sólo el de alta afinidad parece estar acoplado eficientemente a la síntesis de ATP (118). Por otra parte, Rhizobium spp., el cual es capaz de fijar nitrógeno en vida libre, aumenta su respiración en tensiones altas de oxígeno (114). Con base en estos resultados se propuso que el sistemas de baja afinidad pueden funcionar como un sistema de protección similar al reportado para A. vinelandii.

A N T E C E D E N T E S .

Genética de la Respiración y la Fijación de Nitrógeno en E. japonicum.

El análisis comparativo de los citocromos presentes en E. japonicum, en vida libre y en bacteroides, indicó que este organismo utiliza diferentes oxidasas terminales en cada una de estas condiciones, además de poseer una cadena respiratoria ramificada. Los citocromos de tipo ata_m y q son las oxidasas terminales utilizadas en aerobiosis. En los bacteroides de algunas cepas el citocromo q y el citocromo ata_m desaparecen, en su lugar aparecen las hemoproteínas c552, c554, P450, P423, y P420. Estas proteínas pudieran ser parte de una o varias oxidasas terminales con alta afinidad por oxígeno. Los electrones son generados a partir de la poza de ubiquinol y se transfieren a las oxidasas terminales a través de citocromos intermedios (19, 27, 30). Sin embargo, a pesar de estos análisis, no existe evidencia funcional de la participación de los diferentes citocromos durante la respiración en altas o bajas tensiones de oxígeno. Además se desconoce la secuencia de los pasos en la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria.

La obtención y caracterización de mutantes, con lesiones bien definidas, en cada uno de los pasos del transporte de electrones, ha sido de gran utilidad para determinar la participación de los diferentes citocromos en la respiración en distintas condiciones de crecimiento.

Las mutantes de E. japonicum hasta ahora descritas, han contribuido a descifrar en que forma se ramifican las vías durante la respiración. Una mutante con una inserción de In₂ con un defecto en la expresión de citocromo ata_m, mostró ser simbioticamente efectiva, es decir, la cepa es capaz de formar nodulos que fijan nitrógeno (Fix⁺). Sin embargo, no se demostró que la mutación fuera en el gen estructural (23).

Otras mutantes descritas como deficientes en citocromos c y ata_m y con un nivel reducido de citocromo b, crecen normalmente en condiciones aeróbicas, pero son simbioticamente inefectivas (Fix⁻). El problema en estas mutantes es que se aislaron por mutagénesis química, por lo que su análisis genético es limitado (28).

El análisis de una mutante de *R. japonicum* aislada por mutagenesis con Tn5 que crece aeróbicamente pero es incapaz de fijar nitrógeno en simbiosis (Fix⁻), permitió a Hennecke y cols (29), identificar 2 genes adyacentes *fbcF* y *fbcH*, que codifican para la proteína Rieske hierro-azufre, y los citocromos *b* y *c*₁ que son constituyentes característicos del complejo respiratorio III. Estos autores demostraron que *fbcH* es un solo gene cuya porción 5' codifica para el citocromo *b* y la mitad 3' para el citocromo *c*₁. El precursor FbcH es procesado post-traduccionalmente en dos proteínas. Además las mutantes de *R. japonicum* con inserciones en estos dos genes (*fbcH* y *fbcF*) crecen aeróbicamente, pero son incapaces de fijar nitrógeno. Estos datos llevaron a los autores a proponer que *R. japonicum* utiliza una cadena respiratoria que contiene el complejo citocromo *b/c*₁, durante el proceso de convertirse en un endosimbionte microaeróbico, mientras que en aerobiosis la respiración ocurre por una vía independiente al del complejo citocromo *b/c*₁. Evidencias genéticas posteriores aportadas por estos mismos autores (119), demostraron la existencia de una vía de transporte de electrones semejante a la mitocondrial. Se caracterizaron dos mutantes con un fenotipo citocromo *c* oxidasa negativo. La mutante COX122 fue defectiva en un nuevo gene, denominado *coxM*, el cual es responsable de la síntesis de un citocromo tipo *c*. Este citocromo aparentemente cataliza la transferencia de electrones desde el complejo citocromo *b/c*₁ al citocromo *a/a*₃. La inserción de Tn5 en la mutante COX132 fue localizada en *coxA*; esta última es el gene estructural de la subunidad I del citocromo *a/a*₃. Ambas mutantes fueron capaces de fijar nitrógeno durante la simbiosis, en contraste con las mutantes en complejo citocromo *b/c*₁ descritas previamente, que son simbioticamente inefectivas (Fix⁻). Esto sugiere, que existe durante la simbiosis una cadena respiratoria específica en este organismo la cual parte del complejo citocromo *b/c*₁ (119).

Composición de los Citocromos de la Cadena de Transporte de Electrones en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

En un trabajo reciente se publicó la composición de citocromos de la cadena de transporte de electrones de la cepa silvestre CE3 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (32). Los cultivos de células de esta bacteria crecida en medio rico contienen citocromos de tipo *b* y *c* y dos oxidasas terminales: los citocromos *c* y *a/a*₃. El citocromo *a/a*₃ se expresa parcialmente cuando las células se cultivan en medio mínimo y durante la simbiosis.

La composición del sistema respiratorio de R. leguminosarum bv. phaseoli es muy parecida a las cadenas respiratorias reportadas en otras especies de Rhizobium (27, 30). Recientemente reportaron además de la presencia de citocromo g en células de vida libre de R. leguminosarum bv. phaseoli un componente no-citocromo capaz de reaccionar con el oxígeno, el cual puede sugerirse como flavoproteína. Esta enzima parece ser exclusiva del crecimiento aeróbico (120, 121). La figura 2 muestra los esquemas propuestos para el transporte de electrones de R. leguminosarum bv. phaseoli en vida libre.

Aislamiento y Caracterización de Mutantes de R. leguminosarum bv. phaseoli con Alteraciones en la expresión de citocromos y la Fijación de Nitrógeno.

En dos trabajos previos (32, 33), se reportó el aislamiento y la caracterización de cinco mutantes con alteraciones en la cadena respiratoria. Estos mutantes se identificaron por su capacidad para oxidar el colorante N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD). Este colorante es oxidado por la cadena respiratoria a nivel de citocromos c y ata₂, ya que una mutante que carece de ambos citocromos, o solo del citocromo ata₂ no puede oxidar TMPD (23).

Las mutantes fueron aisladas después de tratamientos mutagénicos con nitrosoguanidina o con el transposon Tn5, seleccionando solamente aquellas células alteradas en su capacidad de oxidar el colorante TMPD: (TMPD⁻) o (TMPD⁺⁺).

La cepa CFN4201 es una mutante TMPD⁻ inducida por una sola inserción de Tn5, expresa niveles bajos de citocromos b y c, tiene aumentada la expresión de los citocromos oxidasas terminales, además de tener niveles reducidos de las actividades de de NADH, succinato y TMPD oxidasa. Los nódulos formados por esta cepa no fijan nitrógeno.

La cepa CFN4205 es una mutante TMPD⁺⁺, que se aisló por mutagénesis con nitrosoguanidina. Tiene niveles reducidos de citocromo g, actividad aumentada de succinato oxidasa, actividades normales de de NADH y TMPD oxidasa. Esta cepa expresa 4 veces más citocromo ata₂ en medio mínimo o rico y 2 veces más citocromo ata₁ durante la simbiosis. Los nódulos formados por esta mutante fijan 33% más nitrógeno que los inducidos por la cepa silvestre. Esta capacidad aumentada para fijar nitrógeno podría deberse a un aumento en el ATP o equivalentes reductores que son utilizados por la nitrogenasa, o a una mejor protección respiratoria de la nitrogenasa dada por la cadena de transporte de electrones, o a ambas cosas. El hecho de que la actividad de nitrogenasa aumenta sólo en nódulos jóvenes, pudiera indicar la participación de la cadena respiratoria protegiendo del oxígeno a la nitrogenasa, como lo ha sugerido Appleby, et al (19).

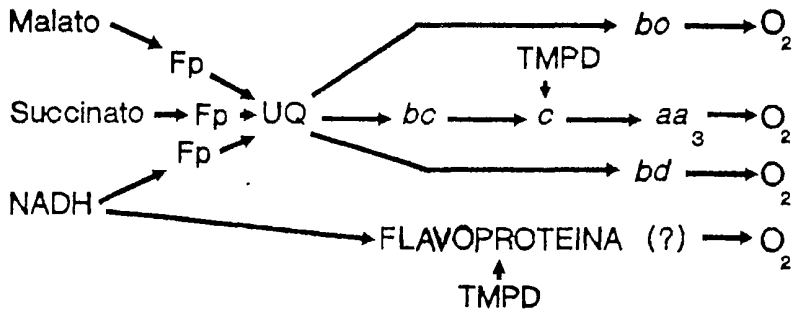


FIGURA 2

ESQUEMA PROPUESTO PARA EL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN VIDA LIBRE DE Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli
 Tomado de Barquera, B. (44).

La cepa CFN001 es una mutante aislada después de mutagenizar con Tn5 y es TMPD⁺. Esta mutante expresa 7 veces menos citocromo c en cultivos en medio rico, expresa citocromo ata₂ en cultivos microaerofílicos, al contrario de la cepa silvestre, tiene alteradas sus propiedades de crecimiento en vida libre y su proliferación dentro de las células del nódulo. El fenotipo de esta cepa sugiere que el citocromo c juega un papel importante en la infección de las células de la raíz de la planta.

La cepa mutante CFN037 también fué aislada por mutagénesis con Tn5 y presenta un fenotipo TMPD⁺, crece igual que la cepa silvestre, expresa citocromo ata₂ en cultivos microaerofílicos, y se diferencia en bacteroide y fija nitrógeno más rápido que la cepa silvestre.

Aun cuando se han identificado 4 mutantes que a diferencia de la cepa silvestre expresan citocromo ata₂ en condiciones microaerofílicas, una de ellas expresa niveles de citocromo c reducidos, además de estar severamente afectada en su capacidad para proliferar en las células de la planta, mientras que las que tienen niveles reducidos de citocromo c y actividad de NADH oxidasa, se diferencian en bacteroides y fijan nitrógeno más temprano que la cepa silvestre (32).

El fenotipo de estas mutantes indudablemente indica que en R. leguminosarum bv. phaseoli existe una correlación entre la respiración bacteriana y la fijación simbiótica de nitrógeno. Sabemos que las secuencias de DNA que contienen las inserciones de los Tn5 y el Mud Lac son distintas en las cuatro mutantes antes mencionadas, por lo que la caracterización de estas secuencias nos va a permitir comprender más a fondo la regulación de la expresión de los distintos citocromos que participan en la cadena de transporte de electrones y su papel en la simbiosis.

O B J E T I V O .

El objetivo general del proyecto es el estudio a nivel genético y fisiológico de la cadena del transporte de electrones que opera en R. leguminosarum bv. phaseoli en vida libre y durante la simbiosis, así como determinar su participación en la protección del daño que sufre la nitrogenasa al contacto con el oxígeno y su papel en la generación de ATP para sostener la fijación de nitrógeno. Este objetivo se pretende llevar a cabo a través de identificar, aislar y caracterizar los genes estructurales y regulatorios de las enzimas que estructuran la cadena del transporte de electrones. La estrategia para lograr estos objetivos ha sido principalmente el aislamiento y caracterización de mutantes que tienen afectada la respiración.

El objetivo específico que pretende llevar cabo este trabajo dentro de este proyecto, es la caracterización a nivel molecular de la mutación descrita para la cepa afectada en la expresión de los citocromo b y c CFN4201, mediante la clonación y caracterización del gene mutado. Los resultados que se obtengan, indudablemente nos darán información que nos permitirá iniciar la caracterización de los diferentes componentes genéticos responsables de la expresión de los citocromos intermedios b y c en R. leguminosarum bv. phaseoli .

MATERIAL Y METODOS

CEPAS Y PLASMIDOS :

En la TABLA 1, se encuentran descritas las cepas y plásmidos que se utilizaron en este trabajo.

CONDICIONES DE CULTIVO :

Para el crecimiento de todas las cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli se utilizó medio rico PY (peptona de caseína al 0.5%, extracto de levadura al 0.3% y CaCl₂ 7mM) (127). Para el crecimiento de E. coli se usó medio LB (peptona de caseína al 1.0%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1.0%). Para los medios sólidos se empleó agar al 1.5%. Las concentraciones de los antibióticos en PY fueron las siguientes: estreptomycin, Sm 200 µg/ml; espectinomycin, Sp 100 µg/ml; ácido Nalidixico, Nal 20 µg/ml; kanamicina, Kan 30 µg/ml; gentamicina, Gm 10 µg/ml; neomicina, Neo 60 µg/ml; cloramfenicol, Cm 10-50 µg/ml y tetraciclina, Tc 0.75-3.0 µg/ml. Las concentraciones de los antibióticos en LB fué de: Tc 10 µg/ml, Cm 50 µg/ml, Sp 100 µg/ml, Nal 20 µg/ml, Kan 30 µg/ml, Ap 50 µg/ml. La temperatura de crecimiento para R. leguminosarum bv. phaseoli fue de 30°C y de 37°C para E. coli. Los cultivos en medio líquido fueron agitados a 250 rpm durante 16 a 24 hrs y los cultivos en medio sólido fueron incubados hasta observar colonias aisladas (aproximadamente 3 días para R. leguminosarum bv. phaseoli y de 18 a 24 hrs para E. coli).

Las conjugaciones se hicieron sobre PY sólido mezclando en una relación de receptoras/donadoras de 5-10/1. La mezcla se recuperó en MgSO₄ 10mM después de un mínimo de 16 hrs de incubación para posteriormente platear las diluciones adecuadas en los medios selectivos.

CLONACION DE FRAGMENTOS DE DNA EN UN VEHICULO MOLECULAR:

Para ello se digirió DNA total de la cepa CE2 de R. leguminosarum bv. phaseoli y del vehículo utilizado pBR329, con EcoRI. El ligamiento de los fragmentos al vehículo se realizó utilizando una relación de 1:5 de vehículo a pasajero, en una mezcla de reacción de 25 µl conteniendo 2.5 µl de ATP 10 mM, 2.5 µl de buffer de ligasa (Tris-HCl pH7.4 0.5 M, MgCl₂ 0.1 M, dithiothreitol 0.1 M), 20 unidades de ligasa de T4. La reacción se incubó toda la noche a 14°C.

TRANSFORMACION CON PLASMIDOS RECOMBINANTES:

Para las transformaciones con plásmidos recombinantes obtenidos de la clonación fragmentos EcoRI (125), fue utilizada la cepa HB101 de *E. coli* como receptora. Esta cepa fue crecida en 50 ml de LB hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 DO a 650 nm. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 8.000 rpm a 4°C, lavadas con NaCl 10 mM y resuspendidas en 50 ml de buffer de transformación (75 mM CaCl₂, Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM pH 7.4), se incubaron por 20 min en hielo y fueron resuspendidas en 2 ml de buffer de transformación. Las bacterias así tratadas se congelaron a -70°C hasta el momento de su utilización. Para la transformación se agregó 0.5 µg del DNA en 100 µl de buffer de transformación a 200 µl de células competentes y se dejaron por 1 hora en hielo. Después de este tiempo, se les dió un choque de calor a 42°C por 1 min, se pasaron a un tubo con 3 ml de LB y se dejaron expresando por 3 hrs para posteriormente platear 0.1 ml en medio selectivo (123).

PURIFICACION Y ANALISIS DE PLASMIDOS RECOMBINANTES:

Los plásmidos recombinantes fueron purificados por el método de "lisis alcalina" (123). Para su análisis fueron digeridos con la enzima requerida y los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer Tris-Acetatos a 75V por cuatro horas.

EXTRACCION DE DNA TOTAL Y CONDICIONES DE DIGESTION:

Para la obtención del DNA total de las cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, se tomaron 1.5 ml de un cultivo saturado crecido en PY, se colectaron las células por centrifugación, fueron lavadas con 1 ml de TE (Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 8.0) y resuspendidas en 0.4 ml de TE. Las células fueron lisadas al agregar 50 µl de SDS al 10 % y 100 µl de pronasa 5 mg/ml al cabo de 1 hora de incubación a 37°C, el lisado se pasó tres veces por una jeringa para reducir la viscosidad y fue extraído 3 veces con fenol-cloroformo-isoamílico (24-24-1) equilibrado en TE, 2 veces con cloroformo-isoamílico (24-1) y el DNA se precipitó agregando NaCl 5 M hasta alcanzar una concentración final de 0.25 M y dos volúmenes de etanol absoluto; la mezcla anterior se incubó a -20°C y posteriormente se centrifugó en microfuga por 5 min, la pastilla fue lavada 2 veces con etanol al 70 %, secada al vacío y se resuspendió en agua estéril. Para la digestión del DNA se usó la enzima requerida a una concentración aproximada de 4U/µg de DNA y la reacción se dejó toda la noche a 37°C en los buffers estandar para cada enzima (Amersham) (123).

HIBRIDACION DE SECUENCIAS DE DNA CON DETECTORES ESPECIFICOS:

Para llevar a cabo los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, los fragmentos de DNA de los plásmidos, así como de las digestiones de DNA total, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % en Buffer Tris acetatos y transferido a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a lo reportado por Southern (124). Los plásmidos utilizados como detectores de hibridación fueron marcados radiactivamente con (³²P)CTP siguiendo el método de "nick translation" (Rigby et al 1977) ó por "Multiprime DNA labelling" (conforme instrucciones del fabricante), agregándolos a la mezcla de hibridación de 10×10^{-6} cpm por gel. La hibridación se llevó a cabo de 12 a 24 hrs a condiciones estrictas a 65°C y los filtros fueron lavados de la siguiente manera: 2X SSC y 0.1 % de SDS a 55°C, y en otros casos a 4X SSC y 0.1 % de SDS dependiendo de la severidad requerida en los lavados según lo reportado por Quinto et al (133). Las autorradiografías fueron expuestas a -70°C con placas intensificadoras al tiempo necesario para detectar la hibridación.

HIBRIDACION CON OLIGONUCLEOTIDOS:

Se utilizaron 10 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos para su marcaje radioactivo. Se utilizaron 75 a 150 μ Ci de gamma ATP-³²P, 10 unidades de polinucleótido cinasa (New England Biolabs, Beverly MA, USA) en cada reacción de 20 μ l (123). La marca no incorporada se separó por medio de una columna de 800 μ l de Bio-Gel P30, contenido en un Eppendorf, utilizando una centrifuga clinica (123). Se cuantificó la radioactividad en un contador centelleo: La actividad específica estuvo en el rango de 10^6 a 10^7 CPM/ μ g.

El filtro de Hybond fue prehibridado durante 2 horas a 65°C con una solución de 6X NET, Denhardt 5X y 0.05% de SDS, 10% de sulfato de dextrán y 0.1 mg/ml de DNA de tino de ternera. La solución de hibridación fue la misma que se utiliza en la prehibridación, excepto por el DNA de tino de ternera. La hibridación se llevo a cabo con 0.5-1 $\times 10^6$ CPM del oligonucleótido marcado por carril. La temperatura de hibridación fue generalmente de 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se llevó a cabo en una solución de SSC 6X hasta 2X a temperatura de 65°C. Posteriormente los filtros fueron expuestos para obtener una autorradiografía (123).

ENZIMAS E ISOTOPOS :

Las endonucleasas de restricción, ligasa de T4 y fosfatasa alcalina de intestino de cernero, fueron obtenidas de Siolabs (U.S.A.) y los isótopos se obtuvieron de Amersham, Co. utilizados conforme indicaciones del fabricante (123).

TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS POR CONJUGACION :

La librería genómica se construyó a partir de DNA total de la bacteria R. leguminosarum bv. phaseoli cepa CFN42, parcialmente digerido con la nucleasa Eco RI. Se clonó en el plásmido pSUP205 el cual lleva los segmentos cos y mob (122), preservándose en E. coli K 802. El banco genómico (plásmidos pCn) se conjugó individualmente (en parche) con el plásmido ayudador pNC206, (éste plásmido porta el segmento mob, por el que, presumiblemente recombina con el plásmido pCn, formando un cointegrado) y posteriormente se seleccionaron transconjugantes portadoras del cointegrado (pCn::pNC206), por el criterio de crecimiento en antibióticos marcadores a la concentración final señalada en µg/ml.: Tc.10, Km.30, Sm.100 y Nal.10. Se utilizó el plásmido pNC206 ya que éste es capaz de replicarse en Rhizobium, a diferencia del plásmido pSUP205, que no lo hace. Las transconjugantes portadoras del cointegrado pSUP205::pNC206 seleccionadas se cruzaron con R. leguminosarum bv. phaseoli cepa CFN4201 y posteriormente se seleccionaron transconjugantes de R. leguminosarum bv. phaseoli portadoras del cointegrado (CFN4201/pCn::pNC206), por el criterio de crecimiento en antibióticos, y posteriormente se les determinó su complementación para el fenotipo TMPD* mediante la técnica descrita (32).

DETERMINACION DE LA NODULACION Y DE LA FIJACION DE NITROGENO:

Las transconjugantes de R. leguminosarum bv. phaseoli cepa CFN4201/pCn::pNC206 que recuperaron el fenotipo TMPD* fueron inoculadas en raíces de R. vulgaris para probar que fueron capaces de inducir la formación de nódulos y fijar nitrógeno. Para todas las determinaciones de fijación de nitrógeno se inocularon semillas germinadas de frijol cv "Negro Jamaica" con las distintas cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli. Las semillas se lavaron con agua y se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas 10 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 X y lavando varias veces con agua estéril. Antes de ser inoculadas, las semillas fueron pregerminadas a 30°C en la oscuridad por tres días. La semillas así germinadas fueron transferidas a macetas con vermiculita húmeda previamente esterilizada e inmediatamente inoculadas. La inoculación se hizo de la siguiente manera: las bacterias se crecieron en medio PY por una noche y posteriormente se

centrifugaron y lavaron con H_2SO_4 10 mM. A continuación se resuspendieron en la misma solución, e inocularon en un volumen discreto (1 ml de cultivo por planta). Las plantas crecidas en macetas permanecieron en el invernadero a no más de 30°C. Las plantas del invernadero se regaron dos veces por semana con 100ml de agua estéril y una vez por semana con el mismo volumen de solución salina.

Aproximadamente 25 días después de ser inoculadas las macetas, se cosecharon las plantas. La actividad de la nitrogenasa fue determinada por la reducción de acetileno a etileno en los nódulos adheridos a las raíces de las plantas ó separadas de ellas. Las raíces o los nódulos se cortaron y fueron introducidos en frascos de 15ml con tapón de hule; se les retiró un volumen de 1 ml de aire e inmediatamente se les inyectó un volumen igual de acetileno; esto se incubó 1 hr. a temperatura ambiente y se tomaron 0.25 ml de la mezcla de gases del frasco. La producción de etileno se determinó por cromatografía de gases. Se calculó el peso seco de los nódulos y se relacionó con la producción de etileno producido.

RECUPERACION DE BACTERIAS DE LOS NODULOS :

Los nódulos fueron esterilizados superficialmente con hipoclorito de sodio al 20 % por espacio de 10 min., a continuación se lavaron con agua estéril y se trituraron, adicionándose 100 μl de caldo de cultivo estéril e inmediatamente se sembró éste líquido en medio PY (agar) sin antibióticos. Una vez crecidas las colonias purificaron y se seleccionaron por su crecimiento en antibióticos marcadores.

VISUALIZACION DEL PERFIL PLASMIDICO :

La visualización de los plásmidos presentes en las distintas cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Eckhardt (126).

DETERMINACION DE PROTEINA :

Se utilizó el método de Lowry, et al. (1951) modificado por Markwell, et al. (1981), en presencia de SDS para eliminar el efecto de los fosfolípidos. Para la curva patrón se utilizó albúmina bovina.

ENSAYOS ENZIMATICOS :

La actividad de la oxidasa del NADH se determinó polarográficamente utilizando un electrodo de oxígeno acoplado a un graficador. Los ensayos enzimáticos se realizaron de acuerdo a lo descrito por Lang, et al. (131). En una cámara temperada a 30°C por un baño circulante y con agitación continua por barra magnética. La cámara contenía en todos los casos la siguiente mezcla de ensayo: 0.75 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.4; 0.5 al mg de proteína y agua destilada hasta un volumen de 3 ml. La mezcla de ensayo se preincubó durante 2 min. para establecer la basal antes del inicio de la reacción por la adición del sustrato. La adición del NADH fué en solución acuosa a concentración final de 0.5 mM.

Las actividades de oxidasa se expresan como nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto por mg de proteína. los valores se corrigieron en aquellos casos en el que se presentó auto-oxidación de la mezcla de los sustratos (ascorbato + TMPD).

INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES :

El efecto del inhibidor del transporte de electrones antimicina sobre la oxidasa del NADH fué examinado según Felix, et al. (132).

TABLA # 1 Cepas bacterianas y plásmidos

Plásmidos y cósmidos	características relevantes	Fuente
pSUP205	<u>mob</u> <u>cos</u> Tc ^r Cm ^r ColE1	(122)
ENC206	IncP1 Cbr Km ^r .	
pSUP5011	pBR325 Tn5- <u>mob</u>	(122)
pBR329	Cm ^r Tc ^r Apr ^r	(134)
pCn	Fragmentos de DNA de la cepa CFN42 clonados en pSUP205.	Este trabajo
pC59 v pC81	Plásmidos que complementan el fenotipo TMPD ⁺ de la cepa CFN4201.	Este trabajo
pGMR1	Fragmento de 8.7 Kb clonado en pBR329.	Este trabajo
pGMR2	Fragmento de 3 Kb clonado en pSUP205.	Este trabajo
pGMR3	Fragmento de 4 Kb clonado en pSUP202.	Este trabajo
Cepas		
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u>		
CFN42	Cepa silvestre.	(133)
CE2	Rif ^r derivada de la cepa CFN42 Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol.	(127)
CFN2001	CFN42 p42a ⁻ , p42d ⁻ Rif ^r .	(128)
CFN4201	CE2::Tn5	(32)
CFN4201/pC59	CFN4201 complementada para el fenotipo TMPD ⁺ con el cósmido pC59.	Este trabajo
CFN4201/pC81	CFN4201 complementada para el fenotipo TMPD ⁺ con el cósmido pC81.	Este trabajo

CFN42/pGMR2 CFN4201 complementada
para el fenotipo TNPD⁺
con el plásmido pGMR2 . Este trabajo

CFN42/pGMR3 CFN4201 complementada
para el fenotipo TNPD⁺
con el plásmido pGMR3 . Este trabajo

Aerobacterium tumefaciens

GMI9023 Rif^r curada de los plásmidos
pAt y pTi derivada de la
cepa C58 (129)

GMI9023 Derivada de GMI9023 con el
(pCIAT899a) pSim de CIAT 899 Rif^r. (130)

Escherichia coli

HB101 F⁻ hadS, hadM, pro, thi, gal,
lacY, recA, SmC. (125)

RESULTADOS

CLONACION DE LA SECUENCIA DE DNA QUE CONTIENE AL TRANSPOSÓN Tn5 DE LA CEPA CFN4201.

Como se describió previamente, la cepa mutante CFN4201, de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* presenta niveles bajos de los citocromos *b* y *c* y altos de citocromos *a_{1a}* y *g*, y actividades respiratorias bajas, además de ser incapaz de fijar nitrógeno atmosférico (32). Esta cepa también mostró poseer una actividad de NADH oxidasa poco sensible a la antimicina (que actúa sobre el complejo *b/c₁*) en relación con la cepa silvestre, figura 3.

Con el propósito de analizar el gen responsable de este fenotipo, se decidió clonar el fragmento de DNA que contiene la mutación inducida por la inserción del transposón Tn5. Para efectuar la clonación se digirió el DNA de la cepa CFN4201 con EcoRI, y se ligó al pBR329 previamente digerido con EcoRI.

La mezcla de ligasa fue utilizada para transformar células competentes de la cepa HB101 de *E. coli*. La selección de los recombinantes fue hecha sobre medio sólido LB con ampicilina y kanamicina. Se obtuvieron 9 transformantes kanamicina resistentes y cloramfenicol sensibles.

Se purificaron los plásmidos de las 9 transformantes, y subsecuentemente fueron digeridos con EcoRI, para liberar el fragmento pasajero más el vector. Los 9 plásmidos tenían 3 y hasta 4 fragmentos EcoRI (datos no mostrados). Por lo que se procedió a realizar una subclonación utilizando el plásmido con el menor número de fragmentos.

El plásmido resultante se denominó PGMRI. Este plásmido contiene clonado un fragmento EcoRI de 8.7 Kb; 3 Kb de este fragmento corresponden al DNA de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, las restantes 5.7 kb corresponden al Tn5. Por lo que el fragmento EcoRI silvestre es de 3 Kb.

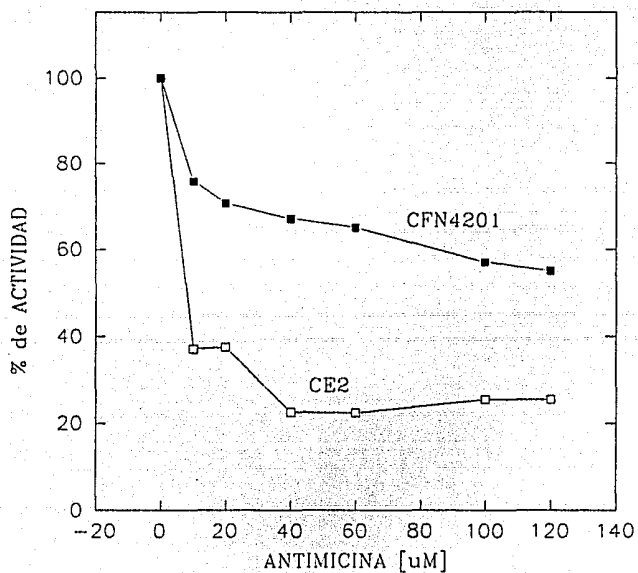


FIGURA 3

MUESTRA EL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA ANTIMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA DE LAS CEPAS CE2 Y CFN4201.

HIBRIDACIONES EN DNAs TOTALES DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE UTILIZANDO COMO DETECTORES A LOS PLASMIDOS pGMRI Y pSUP5011.

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos después de realizar hibridaciones de los DNAs totales digeridos con EcoRI de las cepas CE2 Y CFN4201 utilizando como detectores a los plásmidos pGMRI y pSUP5011 (plásmido que contiene al transposon Tn5).

Utilizando como detector al plásmido pGMRI, se observa la presencia de dos bandas de hibridación a 4 y 8.7 kb en el DNA genómico de la cepa mutante CFN4201. La señal de hibridación a 8.7 kb fué el esperado en esta cepa, dado que de antemano se conocia su tamaño; el fragmento clonado el pGMRI es de un tamaño igual. Sin embargo, también se presentó una banda de hibridación mas, a 4 kb.

En la línea B que corresponde al DNA de la cepa silvestre CE2 también se presentaron dos bandas de hibridación. La banda de hibridación de 3 kb fué la esperada para esta cepa. Como se mencionó, el tamaño del fragmento de DNA silvestre corresponde a 3 kb. Esta secuencia es homóloga al fragmento de 8.7 clonado en el plásmido pGMRI pero sin la inserción Tn5 de 5.7 kb. Por otro lado, como en el caso de la cepa CFN4201 (línea A), también se presentó una banda de hibridación de 4 kb.

Estos experimentos sugieren que parte de la secuencia nucleotídica del fragmento EcoRI de 3 kb está repetida en otro fragmento EcoRI de 4 kb.

Por otro lado cuando se utilizó el plásmido pSUP5011 (Tn5) como detector contra el DNA de la cepa mutante, se observó una sola señal de hibridación 8.7 kb (línea C). Esta señal no se presenta cuando se hibrida este mismo detector contra el DNA de la cepa silvestra.

Estos datos corroboran lo mencionado con anterioridad, en el sentido de que la cepa mutante CFN4201 se originó por una sola inserción de Tn5 (32).

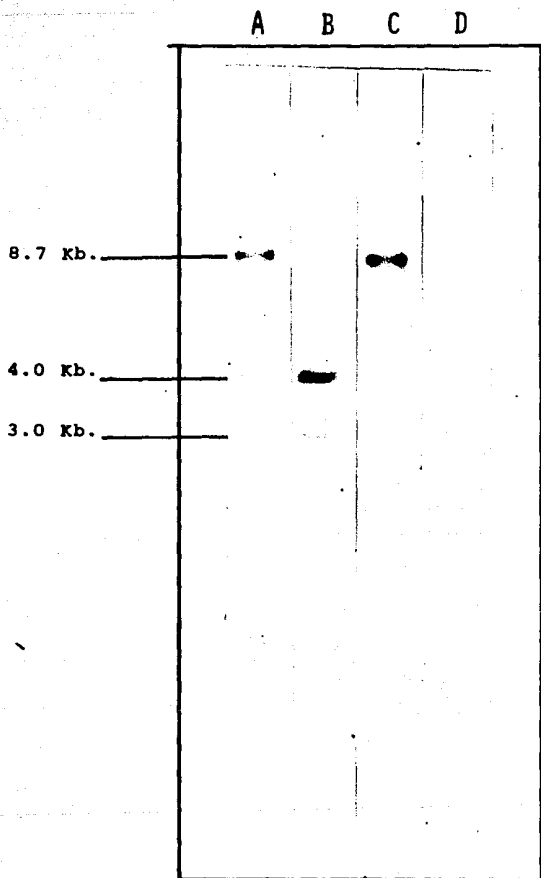


FIGURA 4

HIBRIDACION TIPO SOUTHERN DEL DNA TOTAL DE LAS CEPAS CE2 Y CFN4201 CORTADO CON *EcoRI*. LAS LINEAS A Y C CORRESPONDEN A LA CEPA CFN4201. LAS LINEAS B Y D CORRESPONDEN A LA CEPA CE2. LAS LINEAS A Y B CORRESPONDEN AL DNA GENOMICO HIBRIDIZADO CONTRA pGM1 MARCADO RADIOACTIVAMENTE CON ^{32}P . LAS LINEAS C Y D FUERON HIBRIDADAS CONTRA pSUP5011 MARCADO.

LOCALIZACION FISICA DE LA SECUENCIA EcoRI 8.7 Kb EN EL GENOMA DE LA CEPA CFN4201.

Como se mencionó previamente, el genoma de la cepa CE2 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, incluye a seis plásmidos de alto peso molecular además del cromosoma. Uno de estos: el plásmido d, contiene una gran cantidad de información de modulación y fijación de nitrógeno (130). Para localizar la mutación en la cepa CFN4201 se utilizaron las mismas sondas de hibridación utilizadas en el experimento anterior, que fueron hibridadas contra perfiles de plásmidos de las cepas CE2 y CFN4201 obtenidos por el método de Eckhardt (126). La comparación del sitio de la señal de hibridación en la autorradiografía, con la distancia de migración en el gel por cada uno de los plásmidos, nos permite inferir de manera general en dónde se localizan las secuencias. Asimismo que la ausencia de hibridación en el perfil de plásmidos indica que la localización de las secuencias es cromosomal. Generalmente la señal de hibridación cromosomal aparece en la parte superior de la autorradiografía.

La figura 5 muestra que cuando se utiliza al pGMRI como sonda de hibridación, tanto en el DNA de la cepa CE2 como en el de la CFN4201, se pudo observar hibridación en el cromosoma y en el plásmido e. Cuando se utilizó como sonda de hibridación al plásmido pSUP5011, se observó hibridación en el cromosoma de la cepa CFN4201, y no se presentó en el DNA cromosomal de la cepa CE2.

Estos experimentos demuestran que la inserción del transposon $Tn5$ se encuentra localizado en el cromosoma de la cepa CFN4201, y también se encontró una secuencia homóloga en el plásmido e.

LOCALIZACION FINA DE LA SECUENCIA PLASMIDICA.

Con el objeto de confirmar que la con mayor precisión la región de homología a la secuencia del fragmento mutado, localizada en el plásmido e, se realizaron una serie de experimentos de hibridación tipo Southern en digestiones de DNA total con EcoRI, de las cepas CE2, CFN4201 además de la cepa CFN2001, derivada de la cepa CE2 que carece de los plásmidos a y d, y dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens*: la cepa GMI9023-pCFN4201:: $Tn5$ que contiene el plásmido d de la cepa CE2 y la cepa padre GMI9023, utilizando como detector de hibridación al pGMRI.

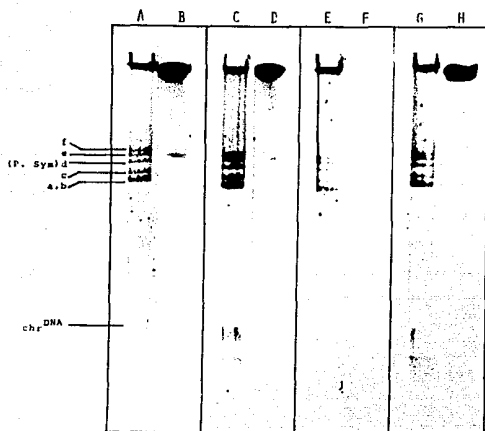


FIGURA 5

HIBRIDACIONES DE TIPO SOUTHERN EN PERFIL DE PLASMIDOS DE LAS CEPAS CE2 Y CNF4201. LAS LINEAS A Y E CORRESPONDEN AL PERFIL DE PLASMIDOS DE LA CEPA CE2 LAS LINEAS C Y G CORRESPONDEN AL PERFIL DE PLASMIDOS DE LA CEPA CNF4201. LAS LINEAS B Y D A LOS PLASMIDOS HIBRIDADOS CONTRA pGMR1 MARCADO CON ^{32}P . LAS LINEAS F Y H FUERON HIBRIDADAS COTRA pSUP5011 MARCADO RADIOACTIVAMENTE.

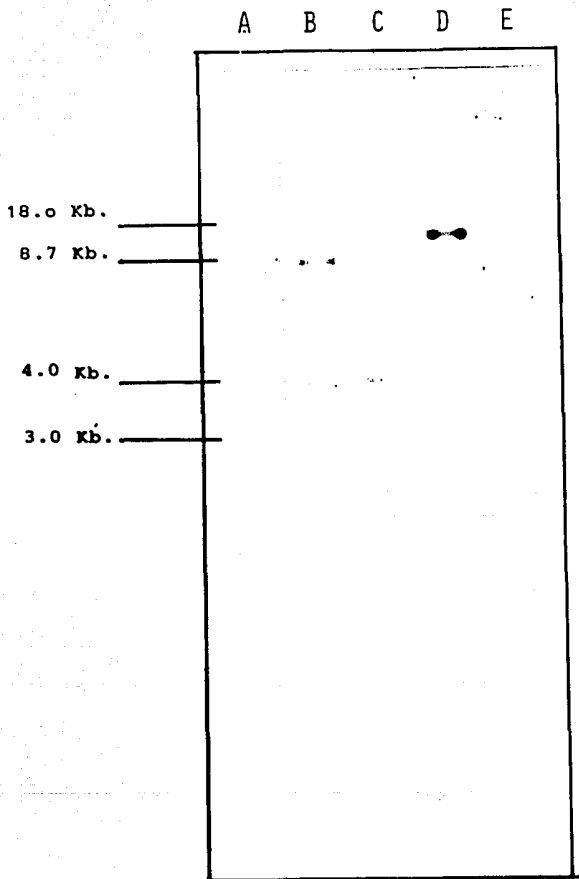


FIGURA 6

HIBRIDACIONES DE TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DE LAS CEPA CE2, CFN4201, CFN2001, GMI9023-pCFN42d::Tn5, GMI9023 DIGERIDOS CON EcoRI E HIBRIDADOS CONTRA pGMR1 MARCADO RADIOACTIVAMENTE. LA LINEA A. CEPA CE2; LINEA B. CFN4201; LINEA C. CEPA CFN2001; LINEA D. CEPA GMI9023-pCFN42d::Tn5; LINEA E. CEPA GMI9023.

Las líneas A y B de la figura 6 muestran un patrón de hibridación similar al encontrado en los experimentos mostrados en la figura 4 cuando se utiliza al pGMR1 como detector.

La línea C muestra bandas de hibridación de 3 y 4 Kb en el DNA de la cepa CFN2001. Estas dos bandas fueron las esperadas. Como se mencionó, una secuencia homóloga al fragmento de 8.7 Kb se encuentra reiterada en el plásmido e, por lo que el patrón no debe cambiar cuando se hibrida contra pGMR1, dado que la cepa CFN2001 se encuentra curada de los plásmidos a y d.

La línea D muestra solo una banda de hibridación de 18 Kb en el DNA total de la cepa GMI9023-pCFN42D::Tn5. Esta banda corresponde a la inserción Tn5 utilizada para movilizar al plásmido e de la cepa CE2 al A. tumefaciens.

En la línea E no aparece ninguna banda de hibridación en el DNA de la cepa GMI9023 de A. tumefaciens. Sin embargo, con largas exposiciones de la hibridación en la autorradiografía se logra observar una señal de 4Kb.

Una observación interesante derivada de estos experimentos, es la de que en los casos en la que se utilizó como detector el pGMR1 contra DNAs totales de las cepas CE2, CFN4201 y CFN2001, la señal de hibridación para la banda de 4 Kb siempre fué más intensa. Este fenómeno también se presenta en los experimentos mostrados en la figura 4: Línea B.

IDENTIFICACION DE LA SECUENCIA SILVESTRE POR COMPLEMENTACION

Como se mencionó en material y metodos, mediante la complementación para el fenotipo TMPD+ de la cepa CFN4201, con un banco genómico construido con fragmentos de DNA EcoRI de la cepa silvestre CE3 clonados en cósmidos pSUP205, se identificaron tres cósmidos: pC59, pC81 y pC88. Los cósmidos pC81 y pC88 comparten el mismo patrón de restricción EcoRI: ambos poseen 13 fragmentos. Por tal motivo se decidió trabajar solamente con el pC81.

El cósmido pC59 posee un número total de 12 fragmentos; ocho de los cuales migran igual que los presentes en el cósmido pC81.

La figura 7 muestra las hibridaciones de tipo Southern de los cósmidos pC59 y pC81 contra pGMR1. Las líneas A y B corresponden a los perfiles de restricción EcoRI de los plásmidos pC59 y pC81.

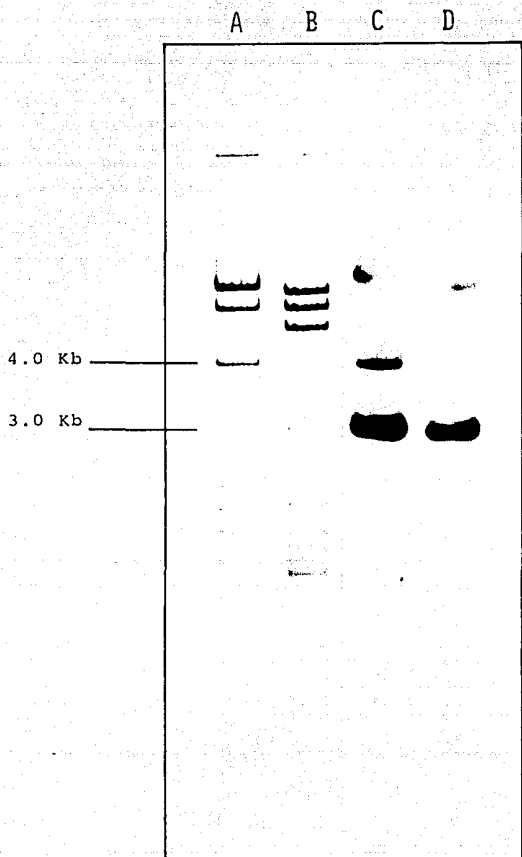


FIGURA 7

HIBRIDACIONES DE TIPO SOUTHERN DE LOS COSMIDOS QUE COMPLEMENTARON A LA CEPA CFN4201. LAS LINEA A CORRESPONDE AL COSMIDO C59 DIGERIDO CON *EcoRI*. LA LINEA B CORRESPONDE AL COSMIDO 81 DIGERIDO CON *EcoRI*. LINEAS C Y D A LOS COSMIDOS HIBRIDADOS CONTRA pGMRI MARCADO RADIOACTIVAMENTE.

La línea C corresponde a las bandas de hibridación presentes en el DNA del cósmido pC59. Estas dos bandas tienen un tamaño de 3 y 4 Kb. En la línea D se observa una banda de hibridación presente en el DNA del cósmido pC81. Esta banda tiene un tamaño de 3 Kb.

Las bandas de hibridación de 3 Kb presentes en los cósmidos pC59 y pC81 fueron las esperadas, dado que el tamaño de DNA homólogo en el plásmido pGMR1 es de 3 Kb. Sin embargo, en el cósmido pC59 se presentó una banda adicional de hibridación en 4 Kb.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS CEPAS COMPLEMENTADAS CFN4201/pC59, CFN4201/pC81.

DETERMINACION DE ACTIVIDADES DE NADH, ASCORBATO-TMPD Y SUCCINATO OXIDASA.

La tabla 2 muestra en forma comparativa las actividades de oxidasas de células completas de distintas cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Se observa que las actividades respiratorias de la cepa CFN4201 son mucho más bajas que las correspondientes en la cepa silvestre CE2. La cepa tiene 2, 4, 9 veces menos actividad de succinato, NADH y ascorbato-TMPD oxidasa respectivamente que la cepa silvestre. Cuando la cepa mutante fue complementada para el fenotipo TMPD⁺ con los plásmidos pC59 y pC81 se puede observar un incremento en sus actividades respiratorias. Las actividades de succinato, NADH y ascorbato-TMPD oxidasa experimentan un incremento a niveles similares al encontrado en la cepa silvestre. Esto está de acuerdo con el fenotipo TMPD⁺ de las cepas complementadas.

CUANTIFICACION DE CITOCROMOS PRESENTES LAS CEPAS COMPLEMENTADAS CFN4201/pC59, CFN4201/pC81.

Con el fin de determinar las concentraciones de los distintos componentes de la cadena de transporte de electrones, se llevaron a cabo espectros diferenciales de las distintas cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

La figura 8 muestra el análisis espectral de los citocromos asociados a la membrana de células integra de las diferentes cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

La figura 8 A muestra el espectro de absorción de la cepa CE2, con picos de absorción característicos a 603, 554 nm y hombro a 557 nm correspondiente a los citocromos a₁, c y b respectivamente.

La figura 8 D muestra el espectro de absorción de la cepa CFN4201, con picos de absorción característicos a 603, 554 nm y hombro a 557 nm correspondiente a los citocromos *a* y *b* respectivamente.

Las figuras 8 C y D corresponden al análisis espectral realizado a las cepas CFN4201/pc59 y CFN4201/pc81. Se puede observar un incremento en la concentración de los citocromos intermedio *b* y *c*. Lo que está de acuerdo con el fenotipo TMPD* de estas cepas transconjugantes.

La tabla 3 muestra los resultados de estos experimentos. Las cepas complementadas CFN4201/pc59, CFN4201/pc81 presenta niveles de citocromos de tipo *b* y *c* mayores que la cepa mutante, pero no iguales a la silvestre.

DETERMINACION DE LA MODULACION Y DE LA FIJACION DE NITROGENO.

Las cepas transconjugantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* que recuperaron el fenotipo TMPD* fueron inoculadas en raíces de frijol para probar su capacidad de inducir nódulos y fijar nitrógeno.

La tabla 4 muestra los resultados de estos experimentos. Las cepas CFN4201/pc59 y CFN4201/pc81 recuperan su capacidad de formar nódulos efectivos (Fix+). Estas cepas presentan el 55 % de la capacidad para reducir acetileno con relación a la cepa silvestre.

DELIMITACION DE LA REGION QUE CONFIERE EL FENOTIPO TMPD* A LA CEPA CFN4201.

A partir del cósmido pc59 se subclonó el fragmento de *coRI* de 3 Kb, dando origen al plásmido pGMR2.

El plásmido pGMR3 se obtuvo después de subclonar el fragmento *EcoRI* de 4Kb del pc59 en el plásmido pSUP202.

Los plásmidos resultantes, fueron transferidos por conjugación (con el plásmido ayudador pNC206) a la cepa CFN4201. Las transconjugantes resultantes fueron las cepas CFN4201/pGMR2 Y CFN4201/pGMR3. Solo la cepa CFN4201/pGMR2 recuperó el fenotipo TMPD*.

Se realizaron ensayos de modulación y fijación de nitrógeno con el fin de determinar si la subclona pGMR2 es capaz al igual que el cósmido pc59 de complementar a la cepa CFN4201 para modular y fijar nitrógeno. Se inocularon 25 plantas con la cepa CFN4201/pGMR2. Los nódulos, fueron ensayados para actividad de reducción de acetileno. La cepa CFN4201/pGMR2 indujo la

formación de nódulos efectivos (Fix*).

SUBCLONACION DE LOS FRAGMENTOS EcoRI DE 3 Y 8.7 Kb EN EL PLASMIDO PUC19.

Con el fin de localizar la inserción Tn5 en el fragmento EcoRI de 8.7 Kb, se subclonaron los fragmentos de 3 y 8.7 Kb en el vehículo de clonación PUC19. Los plásmidos resultantes pUC3 y pUC8.7 se utilizaron para determinar mediante un análisis de restricción la localización del Tn5. La figura 9 muestra la inserción Tn5 en el fragmento de 8.7 Kb.

HIBRIDACION DE LOS FRAGMENTOS DE 3 Y 4 Kb CON OLIGONUCLEOTIDO DEL COMPLEJO b/c.

Con el fin de identificar la secuencia responsable del fenotipo TNPD⁺, se sintetizó un oligonucleótido cuya secuencia es homóloga a la que codifica para el complejo citocromo b/c de E. japonicum (29). Este oligonucleótido se hibridó contra el cósmido pC59. Este tipo de ensayo brindó evidencia de que el fragmento de 4 Kb posee cierta homología con la secuencia utilizada como detectora, figura 10.

TABLA 2 Actividades respiratorias de células completas de distintas cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

CEPA	ACTIVIDADES DE OXIDASA*		
	SUCCINATO	NADH	ASCORBATO-TMPD
CE2	46.3	71.6	112.1
CFN4201	23.5	17.6	12.1
CFN4201/pC59	77.7	90.5	85.5
CFN4201/pC81	68.1	108.1	82.9

* Las actividades estan reportadas como nanómetros de oxígeno consumidos por minuto por mg de proteína.

TABLA 3 Niveles de citocromos en células integras de distintas cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

CEPAS	CITOCROMOS*		
	b	c	ata ₁
CE2	0.112	0.107	0.0685
CFN4201	0.044	0.0229	0.0311
CFN4201/pC59	0.0646	0.0661	0.0204
CFN4201/pC81	0.0853	0.0731	0.0229

*La concentración de los distintos citocromos en células integras fueron determinados a partir de espectros diferenciales a temperatura ambiente. Todos los espectros fueron obtenidos reduciendo la suspensión de células con ditionita. La concentración se da como nanomoles de citocromo por mg de proteína.

TABLA 4 Fenotipo simbiótico de las diferentes cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli.

CEPAS	PORCENTAJE DE REDUCCION DE ACETILENO*
CE2	1.54 +/- 0.613
CFN4201	N.D.
CFN4201/pC59	0.84 +/- 0.214
CFN4201/pC81	0.89 +/- 0.222

*Porcentaje de reducción de acetileno/100 mg de peso seco de nódulos.

+/- Desviación estándar de tres determinaciones.

N.D. No detectado.

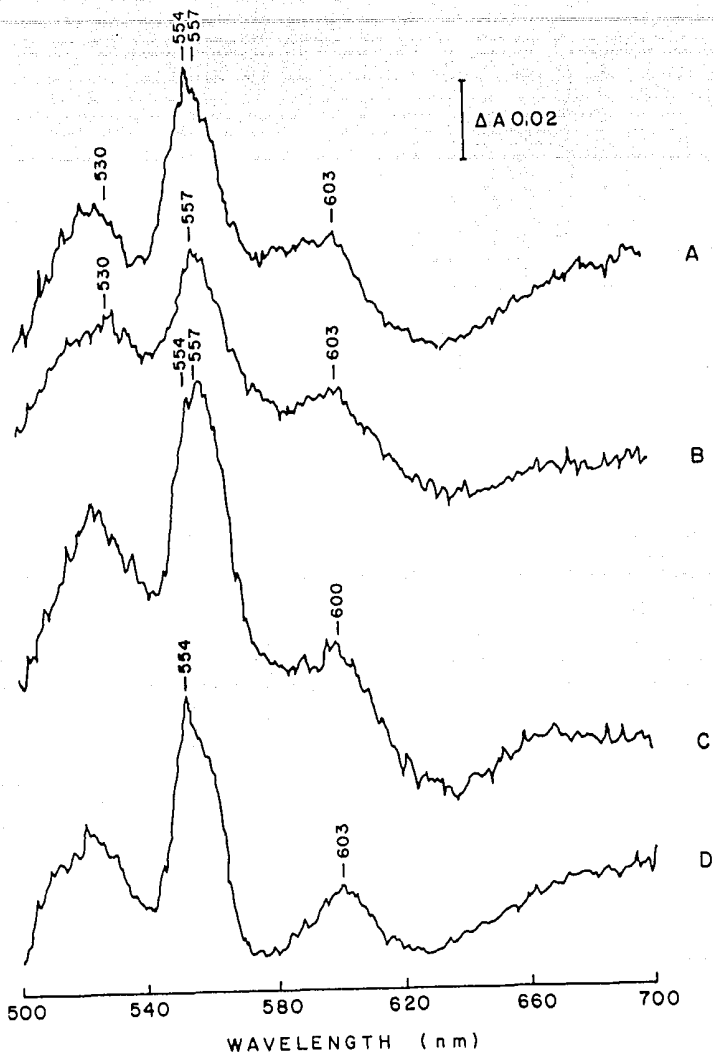


FIGURA 8

ANALISIS ESPECTRAL DE CITOCROMOS ASOCIADOS A MEMBRANAS DE CELULAS COMPLETAS DE DIFERENTES TIPOS DE CEPAS DE R. leguminosarum bv. phaseoli. TODOS LOS ESPECTROS FUERON OBTENIDOS REDUCIENDO LA SUSPENSION DE CELULAS CON DITIONITA.

A. CEPA CE2

B. CEPA CFN4201

C. CEPA CFN4201/pC59

D. CEPA CFN4201/pC81

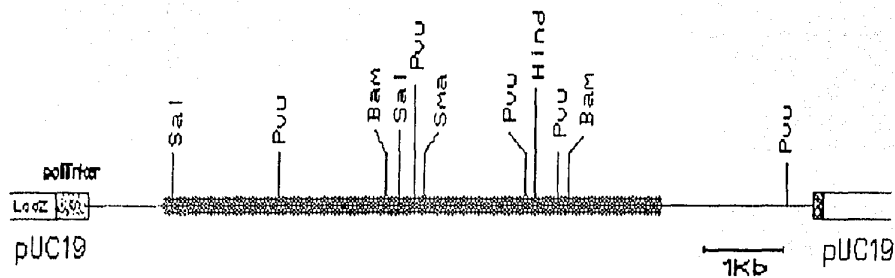


FIGURA 9

LOCALIZACION FISICA DEL Tn₅ EN EL FRAGMENTO EcoRI DE 3 Kb CLONADO EN pUC19.

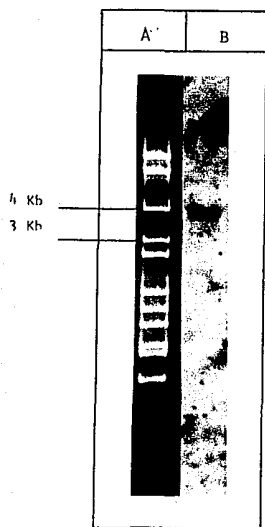


FIGURA 10

HIBRIDACION DEL COSMIDO pC54 CONTRA EL OLIGONUCLEOTIDO CUYA SECUENCIA ES HOMOLOGA AL COMPLEJO CITOCROMO b/c₁ DE Bradyrhizobium japonicum. A.- pC59 DIGERIDO CON EcoRI. B.- pC59 HIBRIDADO CONTRA EL OLIGONUCLEOTIDO.

DISCUSION

Las hibridaciones de tipo Southern de los DNAs totales digeridos con EcoRI de las cepas CE2 y CFN4201 contra los plásmidos pSUP5011 y pGMR1, demostraron una sola inserción del transposón $Tn5$ en un fragmento EcoRI de 8.7 Kb en la cepa CFN4201, además fué encontrada una secuencia homóloga al segmento mutado en un fragmento EcoRI de 4 Kb.

La presencia de secuencias reiteradas en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* no está restringida a unos cuantos genes. Actualmente se han encontrado una gran variedad de secuencias reiteradas en el genoma de estos organismos. Estas reiteraciones pueden comprender desde repeticiones de genes hasta operones completos como el caso del operón *nifHDE* (133). Estas secuencias reiteradas han sido localizadas en el cromosoma como en varios plásmidos, lo que ha puesto de manifiesto que la reiteración de secuencias de DNA es una característica general de las bacterias de la familia de las Rhizobiaceas (128).

Las hibridaciones tipo Southern en un perfil de plásmidos utilizando como detector al plásmido pSUP5011, demostraron que la inserción $Tn5$ en la cepa CFN4201 se encuentra localizada en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, cuando se utilizo el pGMR1 como detector se observó una fuerte señal de hibridación entre el gene mutado (fragmento de 8.7 Kb) y el cromosoma bacteriano, además de dar una señal en una secuencia localizada en el plásmido e. Esto sugirió que el fragmento mutado de 8.7 Kb se encuentra en el cromosoma mientras que el fragmento de 4 Kb se encuentra ubicado en el plásmido e. Sin embargo, la hibridación del plásmido pGMR1 contra los cósmidos pC59 y pC81 que complementaron a la cepa mutante CFN4201, demostraron la presencia de una señal de hibridación en un fragmento EcoRI de 3 Kb en el plásmido pC81, y dos señales de hibridación en los fragmentos EcoRI de 3 y 4 Kb en el plásmido pC59.

La presencia de dos fragmentos EcoRI en el cósmido pC59 se explica de la siguiente manera: debido a que el banco genómico se construyó con fragmentos de DNA digeridos parcialmente, se supone entonces, que cada uno de los fragmentos clonado en cada cósmido es una secuencia continua de DNA. Por lo tanto: Dado que el fragmento de 3 Kb es cromosomal, también lo es el de 4 Kb.

Los experimentos llevados a cabo en R. leguminosarum bv. phaseoli citados anteriormente, demuestran por lo menos la presencia de tres secuencias homólogas en el genoma de la cepa CE2: una de estas secuencias se encuentra en un fragmento EcoRI de 3 Kb y las otras dos restantes en dos fragmentos de 4 Kb. Como se mencionó, uno de los fragmentos de 4 Kb se encuentra en el plásmido e, mientras que el otro se encuentra en el cromosoma bacteriano a no más de 30 Kb del fragmento de 3 Kb. Este razonamiento se apoya en el hecho de que el fragmento de DNA continuo clonado en el pC59 es de 30 Kb.

La existencia de dos fragmentos EcoRI de 4 Kb explica la señal de hibridación más intensa a ese nivel cuando se hibrida el DNA total de la cepa CE2 contra el pGMR1, en comparación con la señal de 3 Kb. FIGURA 2, Línea B; FIGURA 4, Línea A.

Un patrón similar de señales de hibridación se presentó en la cepa CFN2001 cuando se utilizó como detector el plásmido pGMR1 (FIGURA 4, línea C). La señal de 4 Kb fué más intensa que la de 3 Kb. Como se mencionó, una secuencia homóloga al fragmento de 4 Kb se encuentra reiterada en el plásmido e, por lo que el patrón no debe cambiar cuando se hibrida contra pGMR1, dado que la cepa CFN2001 se encuentra curada únicamente de los plásmidos a y d.

Un dato derivado de estos experimentos, es que cuando se utilizó como detector el plásmido pGMR1 contra DNA total digerido con EcoRI de la cepa GMI9023 de A. tumefaciens, presentó una banda de hibridación a 4 Kb, aunque con mucho menor intensidad, que la observada en la cepa CE2. Este dato sugiere la presencia en A. tumefaciens de una secuencia de 4 Kb homóloga a la encontrada en R. leguminosarum bv. phaseoli. La diferencia en intensidad entre estas dos señales puede explicarse como una disminución en la longitud de la región de homología, o bien en la divergencia en la secuencia nucleotídica, o ambas a la vez, independientemente de conservar los mismos sitios de corte para la endonucleasa EcoRI.

Las cepas CFN2013 y CFN2026 descritas con anterioridad (104) fueron obtenidas después de mutagenizar con Tn₅ la cepa CE2. Estas cepas contienen la mutación en el plásmido e y son incapaces de fijar nitrógeno. Actualmente la localización de estas mutaciones es incierta, pues se desconoce si están relacionadas específicamente con la simbiosis, o si las mutaciones están en genes que ejercen un efecto pleiotrópico sobre la fijación de nitrógeno.

En este sentido, la presencia de una región homóloga al fragmento de 3 Kb en el plásmido es resulta interesante. La facilidad de tener clonado el fragmento de 4 Kb permitirá la construcción de mutantes con fusiones lac Z en esa región. Esto permitiría conocer si las mutaciones en la secuencia del plásmido producen el mismo efecto pleiotrópico que el que produce la inserción de In5 en el fragmento cromosomal de 3 Kb de la cepa CFN4201.

Por otro lado, el hecho de que el cósmido pC59 a diferencia del cósmido pC81 contenga dos fragmentos de 4 Kb que comparten cierta homología, podría en cierto modo esperarse una diferencia en cuanto a fenotipo simbiótico (fijar nitrógeno) de las cepas complementadas con estos dos plásmidos. Sin embargo, los resultados de los experimentos llevados a cabo con el fin de comparar el grado de complementación entre las dos cepas transconjugantes CFN4201/pC59 Y CFN4201/pC81 (tablas 5, 6 y 7), demostraron que no existe ninguna diferencia significativa entre ellas que pueda sugerir efecto de dosis génica. Aunque si bien, estas dos cepas no alcanzan a recuperar a un 100 % los niveles de citocromos ni la actividad de nitrogenasa.

Experimentos de hibridación tipo Southern de DNA de la cepa CE2 digerido con EcoRI contra los fragmentos de 3 y 4 Kb (plásmidos pGMR2 y pGMR3) demostraron que hay cierta homología entre estos dos fragmentos. El hecho de no encontrar ninguna diferencia fenotípica entre las dos cepas transconjugantes CFN4201/pC59 Y CFN4201/pC81, sugirió la posibilidad de que la secuencia en el fragmento de 4 Kb que comparte homología con el fragmento de 3 Kb no tiene nada que ver con el gene mutado, o bien que no se expresa.

Con el fin de contestar estas preguntas se llevaron a cabo experimentos en donde los plásmidos pGMR2 y pGMR3 (con los fragmentos de 3 y 4 Kb respectivamente) se transfirieron por conjugación a la cepa CFN4201. Las cepas transconjugantes resultantes fueron: CFN4201/pGMR2 Y CFN4201/pGMR3. De éstas dos cepas solo la primera: la cepa CFN4201/pGMR2 recuperó el fenotipo TMPD⁺, además de inducir la formación de nódulos efectivos (Fix⁺).

Esto sugirió que el fragmento de 3 Kb es el portador del gene responsable de restituir el fenotipo TMPD⁺, y que probablemente el fragmento de 4 Kb no lo contenga; independientemente de compartir homología, o bien que dicho gene se encuentre incompleto.

Estos resultados sugieren, que por lo menos la secuencia reiterada ubicada en el fragmento de 3 Kb es funcional, pero se desconoce si las dos restantes de 4 Kb son funcionales, además de que se desconoce a que gene o genes corresponde, por lo que es necesario su identificación. Una manera de contestar estas preguntas es la de determinar la secuencia nucleotídica de los fragmentos de 3 y 4 Kb. El análisis de secuencias permitirá identificar las posibles secuencias codificadoras, y de esta manera poder determinar diferencias en homología entre estos dos fragmentos, además de definir la presencia de un gene truncado en el fragmento de 4 Kb, si es que lo hay. Por otro lado, el grado de expresión de cada una de ellas no ha sido determinado y no se sabe si estas pueden ocurrir simultáneamente.

Por medio de la construcción de fusiones lac Z en las tres reiteraciones se puede determinar la funcionalidad de estos genes y también es posible determinar si existe expresión simultánea, puesto que la transcripción de cada una de las reiteraciones se puede determinar indirectamente por la actividad de β -galactosidasa y la otra midiendo la actividad de las distintas oxidasas.

El hecho de que una de las características fenotípicas de la cepa CFN4201 sea la de poseer una expresión disminuida de los citocromos intermedios b y c, además de exhibir una actividad de NADH resistente a la inhibición por la antimicina, sugirió que muy probablemente esta mutante se encuentra afectada en la expresión del complejo citocromo b₂L₃, de la cadena de transporte de electrones. La actividad de la NADH oxidasa de la cepa CFN4201 es inhibida en un 45 % a una concentración de 120 μ M de antimicina, mientras que esta misma actividad se muestra más sensible en la cepa CE2; esta es rápidamente inhibida en un 75 % a una concentración de 10 μ M. Los resultados obtenidos de experimentos con inhibidores de sitio III como la antimicina, permiten plantear la hipótesis de la presencia de una ramificación del sistema respiratorio en la cepa CFN4201. Considerando que la antimicina bloquea el paso de electrones de citocromo b al citocromo c, (132) y que este inhibidor tiene poco efecto en la actividad de la NADH oxidasa de la cepa CFN4201 puede suponerse que la vía alterna para la oxidación del NADH empieza después de la ubiquinona sin pasar por el complejo b/c, del sistema respiratorio de esta bacteria.

Con el fin de explicar si la expresión disminuida de los citocromos b y g se debía a que la mutación en la cepa CFN4201 afectaba en los genes estructurales del complejo citocromo b/c₁, se sintetizó un oligonucleótido cuya secuencia es homóloga al gene estructural de citocromo b del complejo citocromo b/c₁ de B. japonicum. Este oligonucleótido se hibridó contra los cósmidos pCS9 y pC81. Estos ensayos brindaron evidencia de que el fragmento de 4 Kb en el cósmido pCS9 posee cierta homología con la secuencia utilizada como detectora. Esto indicó que posiblemente en este fragmento se encuentran los genes que codifican para el complejo citocromo b/c₁.

Por otro lado, solo los plásmidos que contienen el fragmento EcoRI de 3 Kb fueron capaces de complementar para el fenotipo TMPD* (c59, c81, pGMR2), mientras el que contiene el fragmento EcoRI 4 Kb; el pGMR3, no lo fué. Estos datos nos permiten concluir que la inserción Tn5 se encuentra fuera de los genes estructurales del complejo citocromo b/c₁ (fragmento de 4 Kb), y que probablemente ésta inserción se encuentre en un gene regulatorio que controla la expresión de los genes que codifican para los citocromo b y g (fragmento de 3 Kb).

PERSPECTIVAS

Con el propósito de identificar y estudiar la expresión del o los genes presentes en los fragmentos de 3 y 4 Kb clonados en el presente trabajo se proponen las siguientes estrategias:

1.- Determinación de la secuencia nucleotídica de los fragmentos EcoRI de 3 y 4 Kb en la cepa CE2 R. leguminosarum bv. phaseoli.

2.- Análisis de secuencia usando programas de computación. Esto permitirá la determinación de posibles secuencias codificadoras de los citocromos b y c en el caso del fragmento EcoRI de 4, y secuencias reguladoras, como se espera en el caso del fragmento de 3 Kb que contiene la secuencia mutada en la cepa CFN4201. El análisis de la secuencia podrá también determinar la presencia de promotores. La traducción de las secuencias nucleotídicas para deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas y estudios comparativos con secuencias de genes y proteínas de citocromos ya reportados.

3.- Construcción y caracterización de cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli con fusiones génicas en la que el cassette de lacZ quede bajo el control de las señales de transcripción de las secuencias regulatorias en el fragmento de 3 Kb, o los genes estructurales del complejo citocromo b/c, en el fragmento de 4 Kb, a través de técnicas de mutagénesis in vitro sitio específica y genética reversa, con el fin de analizar la expresión individual de cada una de las reiteraciones.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Robson, R. L., Postgate, J. R. (1980) *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 183-207.
- (2) O'Gara, F., Shanmugan, K.T. (1976) *Biochem. Biophys. Acta.* 437: 313-321.
- (3) Beringer, J.E., Brewin, N., Johnston, A.W.B., Schulman, H.M., and Horwood, D.A. (1979) *Proc. R. Soc. Lond. B.* 204: 219-?
- (4) Ronson, C.W., Primrose, S.B. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 112: 77-88.
- (5) Tuzimura, K. and Meguro, H. (1960) *J. Biochem.* 47: 391-397.
- (6) Glenn, A.R., Poole, P.J., and Hudman, J.F. (1980) *J. Gen. Microbiol.* 113: 267-271.
- (7) Hudman, J.F. and Glenn, A.R. (1980) *Arch. Microbiol.* 123: 72-77.
- (8) Riebach, P.H. and Streeter, J.G. (1984) *J. Bacteriol.* 159: 47-52.
- (9) Bergersen, F.J. and Turner, G.L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 141: 507-515.
- (10) Peterson, J.B. and LaRue, T.A. (1981) *Plant Physiol.* 68: 489-493.
- (11) Trinchant, J.C., Birot, A.M., Denis, M. and Rigaud, J. (1983) *Arch. Microbiol.* 134: 182-186.
- (12) Salminen, S.O. and Streeter, J.G. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 495-499.
- (13) Ronson, C.W., Lyttleton, P. and Robertson, J.G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4284-4288.
- (14) Bolton, E., Higginson, B., Harrington, A. and O'Gara, F. (1986) *Arch. Microbiol.* 144: 142-146.
- (15) Engelke, T., Jagadish, M.N. and Puhler, A. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133: 3019-3029.

- (18) Watson, R.J., Yiu-Kwok, C., Wheatcroft, R., Yang, A.F. and Han, S. (1980) *J. Bacteriol.* 170:927-934.
- (19) Appleby, C.A. (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:443-478.
- (20) O'Brian, M.R., and Maier R.J. (1983) *J. Bacteriol.* 155 481-487.
- (21) O'Brian, M.R., and Maier R.J. (1985) *J. Bacteriol.* 161:507-514.
- (22) O'Brian, M.R., Kirshbon, P.M., and Maier, R.J. (1987) *J. Bacteriol.* 169:1089-1094.
- (23) O'Brian, M. R., and Maier, R. J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3219-3223.
- (24) O'Brian, M.R., and Maier, R.J. (1989) *Biochem. Biophys. Acta.* 974:229-246.
- (25) Kretowich, W.L., Romanov, V.I., and Korolyou, A.U. (1973) *Plant Soil.* 39:614-634.
- (26) Uchakrabarti, S., Mishra, A.K., and Chakrabarti, P.K. (1987) *Current. Microbiol.* 15:165-170.
- (27) Appleby, C.A. (1969) *Biochem. Biophys. Acta.* 172:88-105.
- (28) El Molkadem, M.T., and Keister, D.L. (1982) *Isr. J. Bot.* 31:102-111.
- (29) Thöny-Mayer, L., Stax, D., Hennecke, H. (1989) *Cell.* 57:683-697.
- (30) De Hollander, J.A. and Stouthamer, A.H. (1980) *Eur. J. Biochem.* 111:473-478.
- (32) Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K., Escamilla, E. (1989) *J. Bacteriol.* 171:465-472.
- (33) Soberón, M., Membrillo-Hernández, J., Aguilar, G.R., Sanchez, F. (1990) *J. Bacteriol.* 172:1676-1680.
- (34) Avissar, Y.J., and Nadler, K.D. (1978) *J. Bacteriol.* 135:782-789.
- (35) Daniel, R.M. and Appleby, C.A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 275:347-354.

- (36) Stam, H., van Verseveld, H.W., De Vries, W. and Stouthamer, A. (1984) Arch. Microbiol. 239:53-60.
- (37) Appleby, C.A. (1969) Biochem. Biophys. Acta. 172:71-87.
- (38) Chig, Y.M., Hedtke, S. and Newcomb, W. (1977) Plant Physiol. 60:771-774.
- (39) Appleby, C.A., Bergersen, F.J., Ching, T.M., Gibson, A.H., Gresshoff, P.M. and Trininck, M.J. (1981) in Current Perspectives in Nitrogen Fixation (Gibson, H.A. and Newton, W.E., eds) p. 369. Australian Academy of Sciences, Canberra.
- (40) Keister, D.L., Marsh, S.S., and El Mokadem, M.T. (1983) Plant Physiol 71:194-196.
- (41) Appleby, C.A. (1978) in Functions of Alternative Oxidases (Degn, H., Lloyd, D. and Hill, G., eds), pp 11-20.
- (42) Ronson, C.W. and Astwood, P.M. (1985) in Nitrogen Fixation Research Progress (Evans, H.J., Bottomley, P.J. and Newton, W.E., eds.), pp. 201-207. Martinus Nijhoff, Boston.
- (41) Keister, D.L., Marsh, S.S. (1985) in Nitrogen Fixation Research Progress (Evans, H.J., Bottomley, P.J. and Newton, W.E., eds.), p. 348 Martinus Nijhoff, Boston.
- (44) Barquera, B. (1990) Tesis de Maestria en Investigación Biomédica Básica (Bioquímica), IFC, UNAM.
- (47) Nautiyan, C.S., Van Berkum, P. and Kleiter, D.L. (1987) 11th North America Rhizobium Conference, Laval, Abstr. PP4.
- (48) Tuzimura, K. and Watanabe, I (1964) Plant Cell Physiol. 5: 157-170.
- (49) Matus, V.K., Melik-Sarkisyan, G.S. and Kretovitch, V.L. (1973) Microbiology (U.S.S.R.) 42:95-100.
- (50) Bergersen, F.J. and Turner, G.L. (1980) J. Gen. Microbiol. 118:235-252.
- (53) Bergersen, F.J. Turner, G.L. and Appleby, C.A. (1973) Biochem. Biophys. Acta 292:271-282.
- (55) Appleby, C.A., Turner, G.L. and Macnicol, P.K. (1975) Biochem Biophys. Acta 387:461-474.
- (56) Bergersen, F.J., and Turner, G.L. (1975) J. Gen. Microbiol. 91:345-354.

- (59) Harold, F.M. (1986) in *The vital Force: a Study of Bionergetics*. pp. W.H. Freeman, New York.
- (60) Jones, C.W. (1988) in *Bacterial Energy Transduction*. 1-82 pp. Academic Press, London.
- (61) Halliday, J. (1985) Proc. of 6th International Symposium of Nitrogen Fixation. pp. 675-682.
- (62) Anraku, Y. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:1-32.
- (64) Poole, R.K., in C. Anthony esd., ? *Bacterial citochrome oxidase in energy trnsduction in bacteria*. C.C. Anthony ed Academy Press London.
- (65) Matsushita, K., Patel, L., and Kaback, H.G. (1984) *Biochemistry* 23:4703-4714.
- (66) Peschek, G.A. (1981) *Biochem. Biophys. Acta* 635:470-475.
- (67) Sone, N., Kagawa, Y., and Oriti, Y., (1980) *J. Biochem.* 93:1329-1336.
- (68) Poole, R.K. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.* 726:205-243.
- (72) Poole, R.K. (1981) *FEBS lett.* 133:255-259.
- (73) Solioz, M., Carafoli, E., and Ludwig, B. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:1579-1582.
- (74) Sone, W., and Yanagita, Y. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 682:216-220.
- (75) Yoshida, T., and Fee, J.A. (1985) *J. Biochem.* 23:279-288.
- (80) Williams, H.D., and Poole, R.K. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133:2461-2472.
- (81) Rice, C.W., and Hempding, W.P. (1978) *J. Bacteriol.* 134:115-124.
- (82) Laszlo, D.J., Fandrich, B.L., Siuaram, A., Chance, B., and Taylor, B.L. (1984) *J. Bacteriol.* 159:663-667.
- (83) Carter, K., and Gennis, R.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:10986-10990.
- (85) Hunding, H., and Drews, G. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 765:171-177.

(88) Ingledew, W.J., and Poole, R.K. (1984) Microbiol. Rev. 48:222-271.

(89) Finalyson, S.D., Ingledew, W.J. (1985) Biochem. Soc. Trans.

(90) Konishi, K., Ouchi, M., and Harikoshi, I. (1986) J. Biochem. 99:1227-1236.

(92) Konishi, K., Ouchi, M., Kita, K., and Horikoshi, I. (1986)

(93) Krans, R.G. and Gennis, R.B. (1984) J. Biol. Chem. 259:7998-8003.

(96) Kita, K., Konishi, K., and Anraku, Y. (1984) J. Biol. Chem. 259:3375-3381.

(100) Castor, L.M., and Chance, B. (1959) J. Biol. Chem. 234:1587-1592.

(102) Winter, H.C., Burris, R.H. (1976) Ann. Rev. Biochem. 215:409-425.

(103) Haaker, H., Veeger, C., (1984) TIBS 45:188-192.

(105) Murray, M.A., Horne, A.J., Beneman, J.R. (1984) Appl. Environ. Microbiol. 47:449-454.

(106) Dilworth, M.J. and Appleby, C.A. (1979) Leghemoglobin and Rhizobium hemoproteins. In : A treatise on the nitrogen fixation. Sections I and II (edited by Hardy, R.W., Bottomley, F. and Burns, R.C.). Wiley-Interscience, Pub., NY, USA. pp 671-764.

(107) Curtting, J.A. and Schulman, H.M. (1969) The site of heme synthesis in soybean root nodules. Biochem. Biophys. Acta. 227:58-62.

(108) Sleely, J.E., Michin, F.R., Wittv, F.J. (1983) Ann. Bot. 53:565-572.

(109) King, B.K., Hunt, S., Weagle, G.E., Walsh, K.B., Pottler, R.H., Cavin, D.T., Layzell, D.B., (1988) Plant Physiol. 87:296-299.

(110) Tjepkema, J.D., Yocum, C.S. (1974) Planta 112:351-360.

(111) Sinclair, T.R., Goutriaan, J. (1981) Plant Physiol. 67:143-145.

- (104) Morett, E., Moreno, S. and Espin (1985) Mol. Gen. Genet. 200:229-234.
- (112) Williams, A.M., Wilson, P.W. (1954) J. Bacteriol. 67:303-360.
- (113) Dalton, H. Postgate, J.R. (1969) J. Gen. Microbiol. 56:307-319.
- (114) Jones, C.W., and Redfearn, E.R. (1966) Biochem. Biophys Acta. 113:467-461.
- (115) Jones, C.W., and Redfearn, E.R. (1967) Biochem. Biophys Acta. 143:340-348.
- (116) Jones, C.W., Brice J.M, Wright W and Ackrell BAC (1973) FEBS lett 29:77-81.
- (117) Appleby, C.A., and Turner, G.L., MMacnicol, P.K. (1975) Biochem. Biophys. Acta. 387:461-474.
- (118) Urdadi, M.K., Day, D.A., Gresshoff, P.M. (1986) Plant Cell Reports. 3:207-209.
- (119) Bott, M., Bolliger, M. and Hennecke, H. (1990) Molecular Microbiology. 4:2147-2157.
- (120) Barquera, B., Garcia-Horsman, A. and Escamilla, J.E. (1991) Archi. Microbiol. 155:114-119.
- (121) Barquera, B., Garcia-Horsman, A. and Escamilla, J.E. (1991) Archi. Microbiol., aceptado para su publicacion
- (122) Simon,R.;Priefer,U.;and Pühler,A. (1983) Biotechnol. 1:784-791.
- (123) Maniatis,T.;Fritsch,E.F.;and Sambrook,J. 1982."Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor,New York: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- (124) Southern,E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98:503-517.
- (125) Boyer,H.S.;and Rouland-Dussoix,D. (1969) J. Mol. Biol. 41:459-472.
- (126) Eckhardt,T. (1978) Plasmid. 1:584-589.
- (127) Noel, K.D. ; Sanchez, A.;Fernandez,L.;Lesmans,J.;and Cevallos,M.A. (1984) J. Bact. 158:148-155.

(128) Palacios, R.; Quinto, C.; de la Vega, H.; Flores, M.; Fernandez, L.; Hernandez, M.; Ballado, T.; and Soberon, G. (1983) Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions. Puhler (edt). Berlin: Springer Verlag.

(129) Rosenberg, C.; and Huguet, T. (1984) Mol. Gen. Genet. 195:533-536.

(130) Brom, S.; Martínez, E.; Davila, G.; & Palacios, R. (1986) App. Environ. Microbiol. 54:1280-1283.

(131) Lang, D.R., Felix, J. and Lundgren, D.G. (1972) J. Bacteriol. 110:968-977.

(132) Felix, J.A. and Lundgren, D.G. (1973) J. bacteriol. 115:552-559.

(133) Quinto, C.; de la Vega, H.; Flores, M.; Fernandez, L.; Ballado, T.; Soberon, G.; & Palacios, R. (1982) Nature. (London). 299:724-726.

(134) Covarrubias, L., Bolivar, F. (1982) Gene. 17:79-89.