

50  
2ej'



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**AMPLIFICACION DE UNA REGION DEL  
PLASMIDO SIMBIOTICO DE Rhizobium  
phaseoli CFN42 POR MEDIO DE PLASMIDOS  
INTEGRACIONALES**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A N :  
LAURA MARTHA DURAN STRANSKY

México, D. F.

1991

**FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y METODOS	23
RESULTADOS	36
DISCUSION	52
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	64

## RESUMEN

Recientemente se ha demostrado la existencia de rearrreglos genómicos que afectan la estructura del plásmido simbiótico (pSym) de Rhizobium phaseoli CFN42 a elevada frecuencia. Los rearrreglos observados se generan principalmente por recombinación entre las reiteraciones nifHDK localizadas en orientación directa en este plásmido y consisten principalmente en amplificaciones y deleciones de un sector de 120 kb. En este trabajo hemos empleado un sistema simplificado para detectar amplificación. El sistema emplea un plásmido incapaz de replicarse en Rhizobium y que porta además una secuencia homóloga al genoma de este organismo: la reiteración nifHa. Este plásmido puede integrarse en el genoma de Rhizobium por un solo evento de recombinación tipo Campbell, generando en este caso una estructura nifHa-vector-nifHa. Si se aplica una selección que demanda una mayor expresión de un gen localizado en el vector, tal como un aumento en el nivel de resistencia a cloramfenicol, pueden obtenerse amplificaciones por recombinación desigual entre las dos regiones que flanquean al vector. Al aplicarse este sistema en Rhizobium, se logró detectar amplificaciones en tandem de la región nifHa y el vector. Dependiendo de la concentración de cloramfenicol utilizada, pudo amplificarse hasta 12 veces esta región. Lo más interesante con respecto a esta discusión es que en cepas portando este tipo de amplificación, se observaron una serie de elementos circulares que corresponden a monómeros y multímeros de una estructura nifHa-vector. Estos elementos se presentaron solamente al ejercer selecciones para amplificación, desapareciendo en su ausencia. La abundancia de estos elementos se incrementa en relación directa al grado de amplificación. Estas observaciones sugieren que el mecanismo de amplificación que está operando en este caso es uno de escisión y reinserción de moléculas circulares.

## INTRODUCCION

Uno de los principales factores limitantes para el crecimiento de las plantas es la disponibilidad de nitrógeno disuelto en el suelo. El nitrógeno gaseoso constituye aproximadamente el 80% de la atmósfera. Sin embargo, la capacidad para asimilar este compuesto esencial de numerosas moléculas biológicas se restringe a unos cuantos grupos de organismos procariontes. Algunas plantas leguminosas han resuelto este problema al desarrollar una asociación especial con bacterias fijadoras de nitrógeno del género Rhizobium. Las bacterias del género Rhizobium son bacterias del suelo, gram-negativas, capaces de establecer una relación simbiótica con las raíces de ciertas plantas leguminosas y en la que las bacterias se caracterizan por fijar nitrógeno. Esta característica ha promovido numerosos estudios morfológicos y genéticos tanto en la planta como en la bacteria así como de la interacción entre ellas. Desde el punto de vista morfológico, la relación simbiótica consiste en una serie de estadios característicos. Estos incluyen la deformación de los pelos radiculares de la planta; la subsecuente invasión de estos pelos

por las bacterias que crecen y penetran a través de un hilo de infección originado a partir de tejidos vegetales; iniciación de la proliferación de las células corticales de la raíz; la elaboración de la forma de un nódulo por continuas divisiones celulares; la liberación dentro del nódulo de las bacterias y, finalmente, la diferenciación de las bacterias a bacteroides así como la cooperación entre los simbioses para llevar a cabo la fijación del nitrógeno y su asimilación (Long, 1989).

Recientemente, el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno ha atraído gran interés debido a varias características. Entre ellas podemos mencionar que este proceso es una de las principales entradas al ciclo del nitrógeno. Desde el punto de vista ecológico, es interesante el estudio de esta relación sobre el papel que juega en la ecología global del ciclo del nitrógeno así como en estudios de supervivencia y competencia entre diferentes especies de Rhizobium (Triplett, 1990).

Otra característica que ha recibido mucha atención es la especificidad biológica de la interacción ya que el intercambio de señales para establecer la simbiosis debe ser emitido y descodificado por organismos pertenecientes a dos reinos biológicos diferentes (Long, 1989; Martínez et al, 1990).

En estudios de diferenciación celular, la relación

Rhizobium-leguminosa es interesante porque implica dos procesos de diferenciación: la planta debe llevar a cabo la diferenciación de un grupo de células radiculares para producir un nódulo; la bacteria debe diferenciarse a bacteroide lo que implica un cambio tanto estructural como funcional (Rolfe y Gresshoff, 1988).

En lo que se refiere a la cooperación en la simbiosis, cabe mencionar algunos de los cambios metabólicos que suceden y que han despertado interés en la comunidad científica: la bacteria detiene sus vías de asimilación de amonio para así poder exportarlo; la planta dona fuentes de carbono para satisfacer los requerimientos de los bacteroides y la síntesis en conjunto entre ambos simbioses de una molécula que permitirá el acceso regulado de oxígeno para evitar la inactivación de la nitrogenasa (Layzell et al., 1990).

Finalmente, la fijación simbiótica de nitrógeno presenta también interés desde el punto de vista biotecnológico ya que representa una forma natural y no contaminante de satisfacer los requerimientos nitrogenados de algunos cultivos para consumo humano. La investigación básica ha emprendido estudios en ramas como la modificación genética de la planta (Phillips y Teuber, 1985) o de la bacteria (Ronson et al., 1990) para mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno.

En esta última década, se han hecho grandes esfuerzos para

comprender la dinámica de varias especies de Rhizobium y de su genoma. En particular, han recibido mucha atención los caracteres que son relevantes para sus propiedades simbióticas ya que contribuyen a un mejor entendimiento de su funcionamiento, del funcionamiento de otras interacciones y proveen, generalmente, de herramientas para la manipulación genética de este y otros sistemas. Además de la importancia que puede tener la relación planta-bacteria desde el punto de vista de la interacción misma, la simbiosis de fijación de nitrógeno tiene gran potencial para la aplicación agrícola (Sprent, 1986).

A través de numerosos estudios genéticos, se ha identificado toda una serie de genes esenciales para la nodulación (genes nod) y para la fijación de nitrógeno (genes fix y nif) en Rhizobium (Martínez et al, 1990). En los Rhizobium de crecimiento rápido (R. trifolii, R. leguminosarum, R. meliloti, R. fredii, R. phaseoli) estos genes se encuentran en megaplásmidos llamados plásmidos simbióticos (Sym) o pSym, mientras que en otras especies fijadoras de nitrógeno (Klebsiella pneumoniae, Bradyrhizobium japonicum) los genes correspondientes se encuentran en el cromosoma (Martínez et al, 1990).

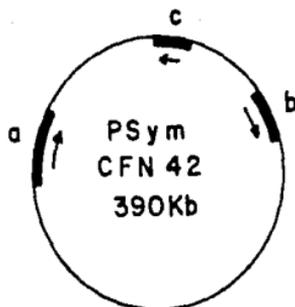
Deseamos recordar aquí que, además de los factores sexuales (episomales) que poseen los genomas bacterianos existen otros

elementos cromosómicos circulares que se duplican libremente y que se denominan plásmidos. Su tamaño es variable y son portadores de uno a tres genes los pequeños y los grandes son portadores de un 10 a un 20% del cromosoma principal. Entre los plásmidos más comunes se encuentran los factores de transferencia de resistencia (FTR) que confieren resistencia múltiple y simultánea a varios antibióticos. Los plásmidos pueden presentarse en copias múltiples (10 a 50) y su duplicación es independiente de la del elemento cromosómico principal.

La fijación de nitrógeno se lleva a cabo a través del complejo enzimático de nitrogenasa. Este consta de dos componentes: la nitrogenasa y la nitrogenasa reductasa. La nitrogenasa, o proteína  $FeMoCo$  se compone de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  y requiere de hierro y molibdeno para su actividad. La nitrogenasa reductasa, proteína  $Fe$ , se compone de dos subunidades idénticas y requiere de hierro y ATP para su funcionamiento. En el mecanismo de la reacción, la nitrogenasa reductasa es reducida y ésta a su vez reduce a la nitrogenasa con gasto de ATP. La nitrogenasa, reducida, es, entonces, capaz de ceder los electrones necesarios para convertir el nitrógeno gaseoso en amonio. Por cada molécula de nitrógeno captada se producen dos de amonio y se consumen siete de ATP.

Hasta la fecha, se han descrito 21 genes implicados en la biosíntesis y regulación del complejo enzimático nitrogenasa en K. pneumoniae (Arnold et al, 1988). Algunos de estos genes se encuentran también en R. phaseoli (Martínez et al, 1990). El gen que codifica para las dos subunidades de la nitrogenasa reductasa es nifH, el que codifica para las dos subunidades A de la nitrogenasa es nifD y nifK codifica para las dos subunidades B de la nitrogenasa.

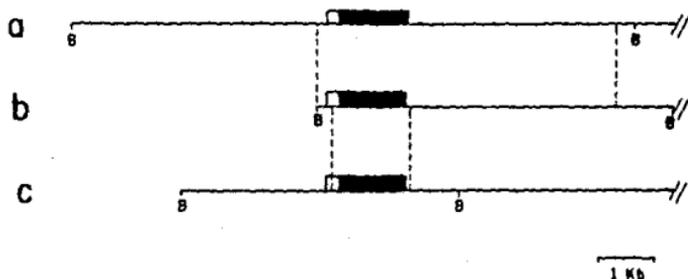
El genoma de R. phaseoli CFN42, el simbiote del frijol (Phaseolus vulgaris L.) se encuentra dividido en varios replicones que incluyen el cromosoma y seis plásmidos. Los genes nod y nif que se han identificado en esta especie se localizan en un megaplásmido, o pSym, de 390 Kb (Fig. 1) (Prakash et al, 1981; Hombrecher et al, 1981; Rosenberg et al, 1981; Girard et al, 1991). Otra característica interesante del genoma de Rhizobium es la presencia de grandes cantidades de DNA reiterado. En R. phaseoli, se ha estimado en 700 el número de elementos reiterados perteneciendo a 200 familias diferentes (Flores et al, 1987). En particular, en R. phaseoli, los genes estructurales de la nitrogenasa están reiterados. El gen nifH está reiterado tres veces y los genes nifD y nifK dos veces (Quinto et al, 1985). Estas reiteraciones se encuentran todas en el pSym en tres regiones



01.- Esquema del plásmido simbiótico de R. phaseoli CFN42. La localización y extensión relativas de las regiones nifHa, nifHb y nifHc están indicadas por los bloques. Las flechas indican la orientación de cada región.

definidas: en las regiones "a" y "b" los tres genes forman un operón nifHDK y en la región "c" sólo se encuentra la tercera reiteración de nifH (Segovia, 1988). El análisis de las moléculas heterodúplex de las regiones "a" y "b" revela que comparten un segmento homólogo de por lo menos 4.7 Kb y que ambas regiones comparten 1.3 Kb de homología con la región "c" (Fig. 2) (Quinto et al, 1985). Se sabe, además, que la presencia de ambos operones nifHDK es necesaria para optimizar el proceso de fijación de nitrógeno ya que cepas derivadas de R. phaseoli que llevaban mutaciones en el gen nifH de uno de los operones tenían una menor capacidad de fijación que la silvestre. El efecto se vió aún más acentuado cuando ambos operones portaban la mutación (Romero et al, 1988).

La presencia de secuencias de DNA reiteradas no es una característica exclusiva de R. phaseoli; otros miembros de la familia Rhizobiaceae poseen secuencias reiteradas e incluso se presentan en Agrobacterium tumefaciens (Flores et al 1987; Martínez et al, 1990). En otros organismos y recientemente en R. phaseoli se ha demostrado que la presencia de secuencias reiteradas puede dar lugar a rearrreglos genómicos como adiciones, deleciones inversiones y amplificaciones (Anderson & Roth, 1981; Petes & Hill, 1988; Romero et al, 1991).



02.- Mapa físico de las regiones *nifHa*, *nifHb* y *nifHc* de *R. phaseoli* CFN42. La línea vertical punteada delimita las zonas de homología entre las regiones. El bloque negro representa la secuencia codificadora de *nifH*. B: BamHI.

Se han observado frecuentes rearrreglos genómicos en distintas especies de Rhizobium, incluyendo B. japonicum, R. trifolii y R. phaseoli. Estos rearrreglos pueden afectar las propiedades simbióticas de estos organismos tanto en nodulación como en fijación de nitrógeno (Berry & Atherly, 1984; Djordjevic et al, 1982; Flores et al, 1988; Hahn & Hennecke, 1987; Kaluza et al 1985; Romero et al, 1991; Soberón-Chávez et al, 1986). Sin embargo, los mecanismos moleculares que dan lugar a estos rearrreglos han sido poco estudiados.

Para tratar de esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en la generación de rearrreglos genómicos en R. phaseoli, Romero et al (1991) diseñaron un sistema que permite la selección positiva de eventos de amplificación y delección con sólo variar las condiciones de selección. Encontraron amplificaciones del sector de 120 Kb que está comprendido entre las regiones nifHa y nifHb y proponen que son el resultado de eventos de entrecruzamiento desigual o de escisión y reinserción de un círculo de 120 Kb en los que las reiteraciones nif en orientación directa juegan el papel principal en la recombinación que genera los rearrreglos.

La recombinación entre secuencias homólogas ha sido más estudiada en otras bacterias como Escherichia coli, Bacillus

subtilis, Streptomyces (Young & Hranueli, 1988) entre otras. En numerosos estudios de ingeniería genética en estos organismos, y como veremos a continuación, en R. phaseoli, se ha empleado la técnica de integración de plásmidos al cromosoma por medio de la recombinación homóloga. Por lo general los plásmidos empleados son pequeños y presentan las siguientes características (Fig. 3):

-Carecen de un origen de replicación que funcione en el organismo blanco (en cuyo genoma se van a integrar) y por lo tanto no se pueden replicar autónomamente en él;

-Llevan secuencias de DNA homólogas a secuencias del genoma blanco en las que se van a integrar por recombinación homóloga;

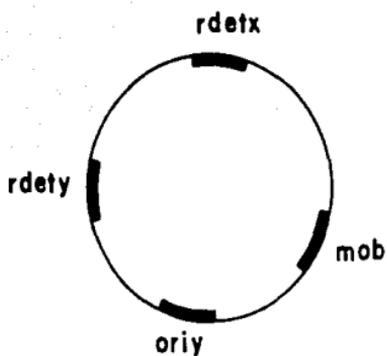
-Son portadores de un marcador genético que puede ser seleccionado o visualizado en el organismo blanco; por lo general se emplean genes de resistencia a antibióticos;

-Se replican en un hospedero diferente al blanco;

-Portan un gen marcador que puede ser utilizado en este último hospedero para su propagación;

-Tienen una secuencia de movilización para conjugación (mob) que es la que lleva a cabo la transferencia del plásmido en la conjugación cuando las funciones de transferencia (tra) le son provistas en trans (Martínez et al, 1990; Dowds et al, 1988).

Si un plásmido con estas características es conjugado con R.



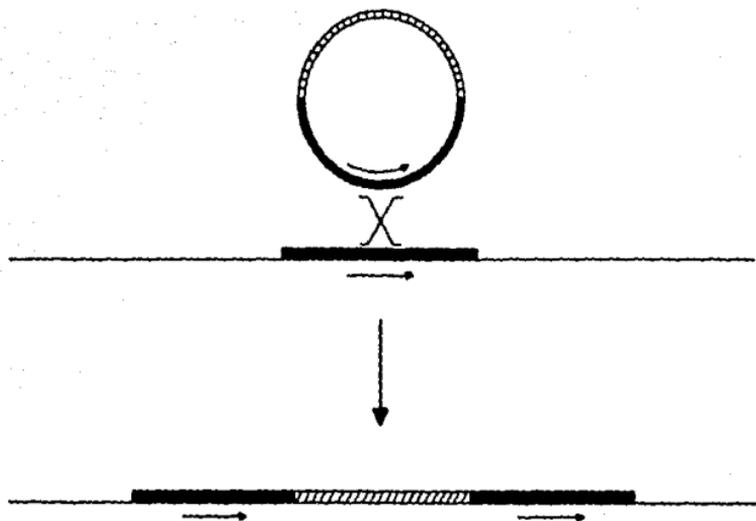
03.- Esquema de un plásmido integracional. rdetx: determinante de resistencia a antibiótico en el organismo x; rdety: determinante de resistencia a antibiótico en el organismo y; ori: origen de replicación funcional sólo en el organismo y; mob: secuencia para movilización en conjugación. (Tomado de Dowds et al, 1988).

phaseoli se pueden seleccionar transconjugantes resistentes al antibiótico que son el resultado de la integración del plásmido por recombinación homóloga en el genoma del nuevo hospedero (Fig. 4).

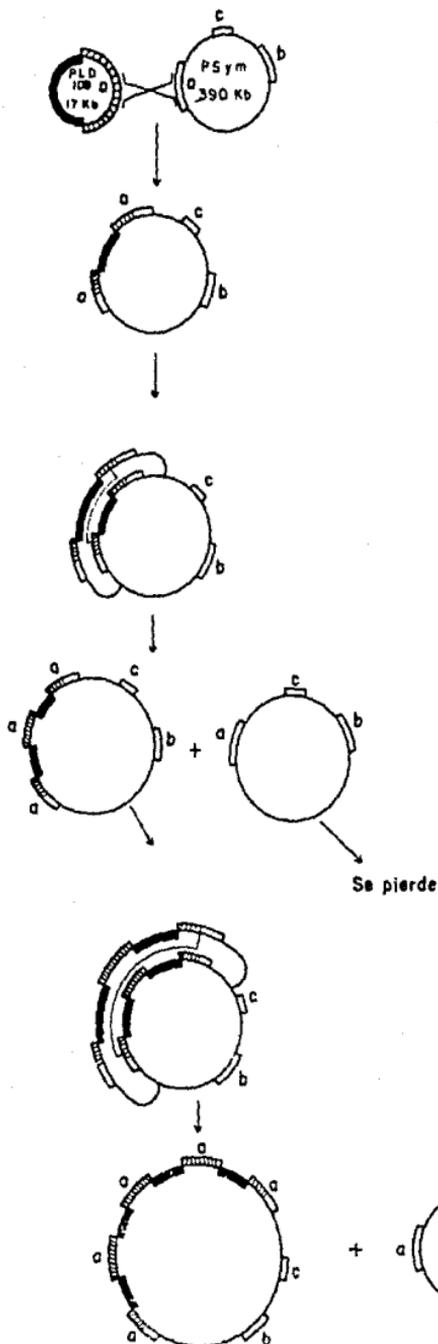
Esta técnica es sumamente útil ya que por medio de ella se pueden realizar estudios de mapeo genético, clonación, construcción de cepas, mutagénesis, se puede manipular el genoma para crear duplicaciones, deleciones, amplificación génica, así como generar operones y fusiones (Dowds et al, 1988).

Cuando la integración ocurre por un solo evento de recombinación recíproca el plásmido queda flanqueado por secuencias repetidas directas (Fig. 4). Al emplear concentraciones de antibiótico superiores a las que puede tolerar una sola copia del gen de resistencia, se pueden seleccionar células que hayan sufrido amplificación. La unidad de amplificación incluye una de las repeticiones y la región localizada entre las dos reiteraciones. El grado de amplificación se relaciona directamente con la concentración del antibiótico en el medio y por lo tanto el número de copias del gen clonado se puede controlar (Dowds et al, 1988).

Existen dos mecanismos por los que la amplificación puede suceder. El primero sucede por entrecruzamiento desigual entre secuencias reiteradas (Fig. 5) en una molécula en replicación y la resolución del cointegrado por otro evento de recombinación



04.- Representación esquemática de la integración de un plásmido circular al genoma por medio de una recombinación recíproca. Las flechas delgadas indican la orientación del gen.

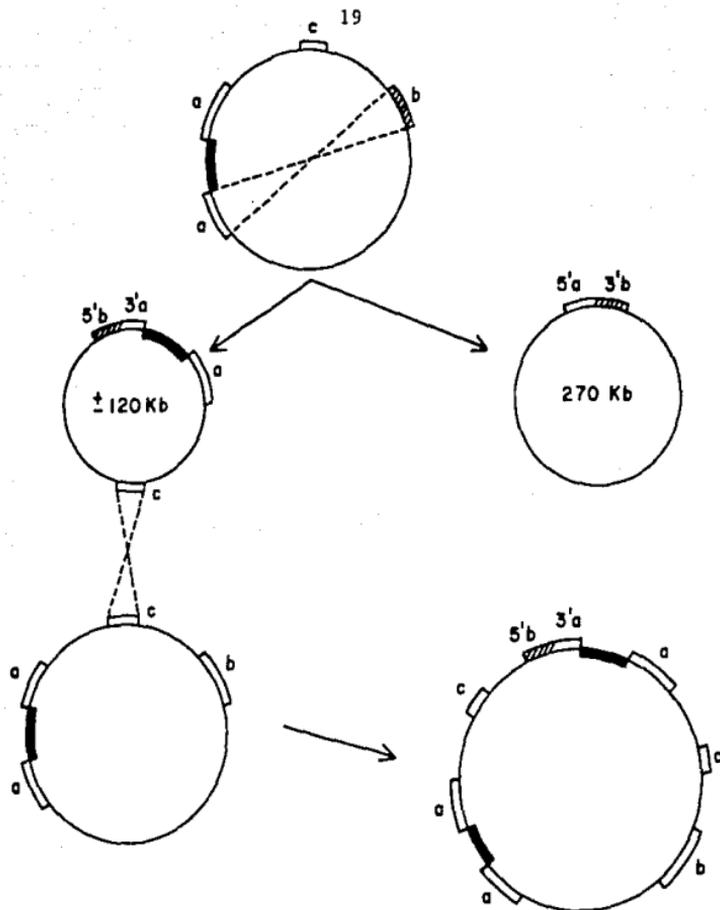


05.- Modelo de amplificación por entrecruzamiento desigual. El entrecruzamiento desigual entre dos regiones *nif* en una molécula parcialmente replicada genera, después de completar la replicación y la resolución, dos moléculas plasmídicas: una lleva una duplicación del sector comprendido entre los puntos de recombinación y la otra es un plásmido simbiótico silvestre. En la segregación, las células que lleven al pSYM silvestre se pierden ya que la selección es hacia aquellas células que resistan al antibiótico. Los bloques hachurados representan regiones *nif* híbridas. Los bloques blancos representan regiones *nif* silvestres. Los bloques negros representan las secuencias del pSUP202 donde se localiza el determinante de resistencia al cloramfenicol.

(Anderson & Roth, 1981; Dowds et al, 1988; Peterson & Rownd, 1985; Romero et al, 1991; Young & Hranueli, 1988) . El entrecruzamiento desigual genera la duplicación de todas las secuencias comprendidas entre los puntos de recombinación. La resolución del cointegrado genera, siempre, además de la molécula amplificada, una molécula que no lleva ningún determinante de resistencia al antibiótico. Como la selección es sólo para aquellas moléculas resistentes al antibiótico, la molécula que no lleva el determinante se pierde en la segregación. La extensión de la amplificación depende de la distancia entre los puntos de recombinación. El sector amplificado queda arreglado en tandem.

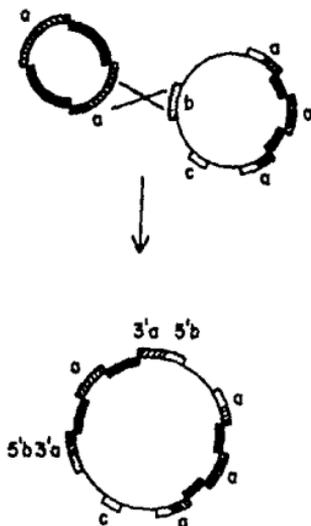
El segundo modelo es el de escisión y reinserción de elementos circulares (Romero et al, 1991; Spies & Laufs, 1983; Yagi & Clewell, 1977; Young & Hranueli, 1988). En este modelo, se escinde una molécula circular por recombinación entre regiones reiteradas (Fig. 6). El elemento circular está formado por las secuencias contenidas entre los puntos de recombinación. El elemento circular puede ser el plásmido integracional (Fig. 6) o ser un círculo de 120 Kb (Fig. 7). La amplificación se debe a la reinserción de este elemento circular, igualmente por recombinación homóloga, en una segunda molécula existente en la célula. La reinserción del elemento circular puede suceder en cualquiera de





07.- Modelo de amplificación por escisión y reinsertión de elementos circulares. Una recombinación intramolecular entre una de las regiones nifHa reiteradas y la región nifHb genera un círculo de aproximadamente 120 Kb y otro de 270 Kb. La recombinación homóloga entre el círculo de 120 Kb y otra molécula pSym/pLD108 da lugar a la amplificación de las 120 Kb del círculo. En la segregación, las células que lleven el círculo de 270 Kb se pierden ya que la selección es hacia aquellas células que resistan al antibiótico. Los bloques hachurados representan regiones nif híbridas. Los bloques blancos representan regiones nif silvestres. Los bloques negros representan las secuencias del pSUP202 donde se localiza el determinante de resistencia al cloramfenicol.

las regiones homólogas a él que encuentre en la segunda molécula (Figs. 6, 7 y 8). En la segregación se selecciona hacia las células que hayan recibido la molécula con el mayor número de copias del determinante de resistencia al antibiótico.



08.- Modelo de amplificación por escisión y re inserción de elementos circulares. Una recombinación intramolecular entre las regiones nifHa reiteradas genera una molécula pSym normal y un pequeño círculo de 17 Kb de tamaño. La recombinación homóloga intermolecular entre el círculo de 17 Kb y la región nifHb de una copia del pSym/pLD108 da lugar a la amplificación de las 17 Kb pero con la formación de dos bandas híbridas: una lleva el extremo 5' nifHa y el extremo 3' nifHb y la otra lleva el extremo 5' nifHb y el extremo 3' nifHa. En la segregación, las células que lleven al pSym silvestre se pierden ya que la selección es hacia aquellas células que resistan al antibiótico. Los bloques hachurados representan regiones nif híbridas. Los bloques blancos representan regiones nif silvestres. Los bloques negros representan las secuencias del pSUP202 donde se localiza el determinante de resistencia al cloramfenicol.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comprender algunos de los mecanismos que pudieran contribuir a la inestabilidad genética de R. phaseoli utilizando un enfoque experimental que permite seleccionar hacia la generación de amplificaciones en el pSym; y proponer un mecanismo molecular como el más viable en los eventos observados.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se emplearon son las siguientes:

Rhizobium phaseoli CFN42

Escherichia coli HB101

Escherichia coli S17-1

### 2.- Medios y condiciones de cultivo

Para la realización de los experimentos, las células se cultivaron en los siguientes medios de cultivo y condiciones:

a) E. coli. El medio utilizado para el cultivo de E. coli fué el caldo Luria (Miller, 1972) (1% peptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl). En caso de ser cultivo sólido se agregó agar en un 1.5%. Estas cepas se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C.

b) R. phaseoli. Para el cultivo de R. phaseoli se empleó el medio PY (Noel et al, 1984) (0.5% peptona, 0.3% extracto de levadura). El medio se suplementó con  $\text{CaCl}_2$  7mM después de ser esterilizado. En caso de ser cultivo sólido se agregó agar en un 1.5%. R.

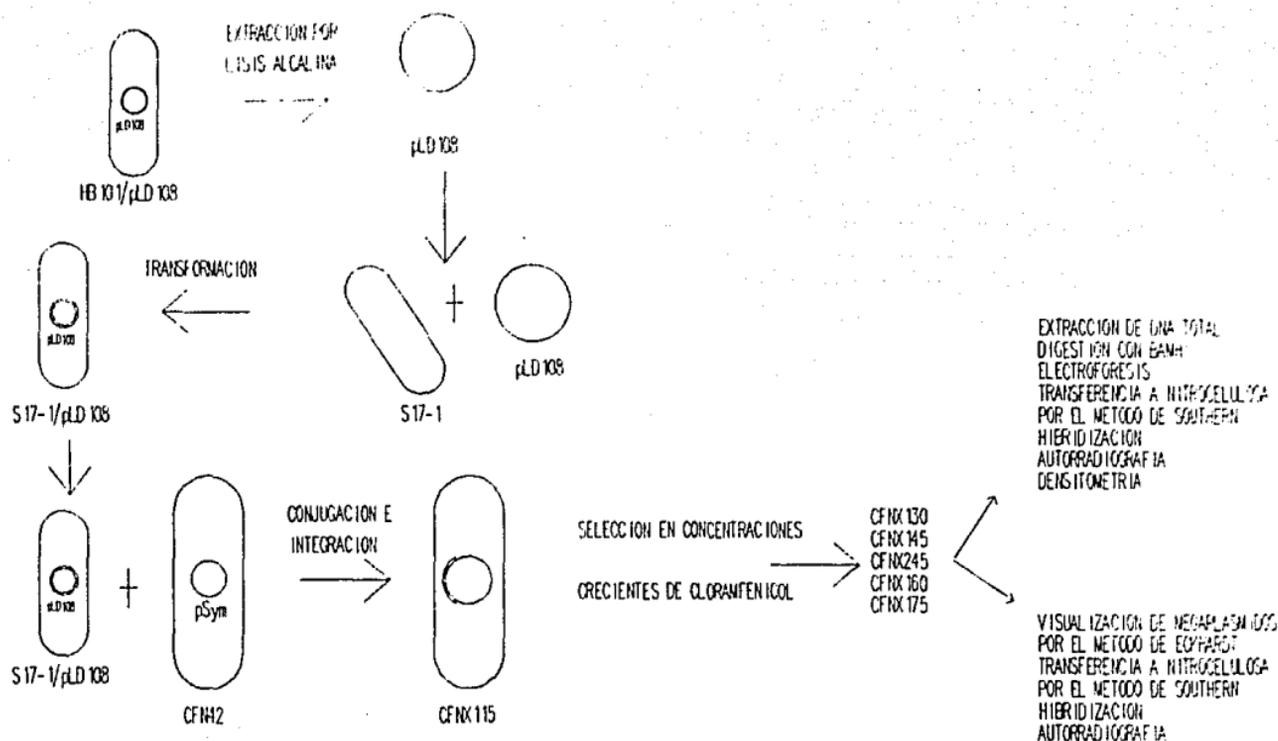


Diagrama que resume los pasos seguidos en la metodología

phaseoli se incubó de 2 a 7 días a 30°C.

Los medios, previamente esterilizados, fueron suplementados, en caso necesario, con los antibióticos a las concentraciones que aquí se mencionan:

Ampicilina (Ap).....	100 µg/ml
Cloramfenicol (Cm) 15, 30, 45, 60, 75	µg/ml
Acido Nalidíxico (Nal) .....	20 µg/ml
Espectinomycin (Sp) .....	100 µg/ml
Tetraciclina (Tc) .....	10 µg/ml para <u>E. coli</u>
.....	4 µg/ml para <u>R. phaseoli</u>

### 3.- Aislamiento de plásmidos.

Los plásmidos presentes en las cepas de E. coli se aislaron por el método de lisis alcalina (Maniatis et al, 1982). Se creció un cultivo en líquido de la cepa hasta su fase estacionaria. Se centrifugaron 1.5ml del cultivo en tubo Eppendorf. La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50mM, etilen-diamin-tetraacetato disódico (EDTA) 10mM, Tris-HCl 25mM pH8, lisozima 5 mg/ml). Se incubó cinco minutos a temperatura ambiente y se le añadieron 200 µl de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó cinco minutos a 4°C. Se agregaron, entonces, 150 µl de solución III (Acetato de potasio

3M). Se incubó la mezcla cinco minutos a 4°C, se desechó la pastilla y el sobrenadante se extrajo tres veces con una mezcla FCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, 24:24:1) y tres veces con CI (cloroformo- alcohol isoamílico 24:1). Se midió el volumen de la fase acuosa y se le agregó 1/25 del volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitando por lo menos una hora a -70°C. El tubo se centrifugó y la pastilla conteniendo los ácidos nucleicos se lavó tres veces con etanol al 70%. Se secó en una microfuga equipada con vacío Savant, y se resuspendió el DNA en una solución de TE/RNasa (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, RNasa 20 µg/ml).

#### 4.- Aislamiento de DNA total de cepas de Rhizobium

La cepa se cultivó en 5 ml de medio líquido hasta su fase estacionaria. Se cosecharon los 5 ml de cultivo en tubos Eppendorf y se lavaron con una solución de TE 50/20 (Tris HCl 50mM pH8, EDTA 20mM). La pastilla se resuspendió en 400 µl de TE 50/20, 50 µl Pronasa (Proteasa 5 mg/ml predigerida una hora a 37°C), y 50 µl de SDS 10% (dodecil sulfato de sodio disuelto en TE 50/20 pH8). Se mezcló y se incubó durante una hora a 37°C. Esta mezcla se extrajo tres veces con FCI y tres veces con CI. La fase acuosa se midió y se le agregó para precipitar el DNA 1/10 del volumen de

acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. El DNA se precipitó por lo menos durante una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó, la pastilla se lavó tres veces con etanol al 70% y se secó en una microfuga equipada con vacío Savant. El DNA se resuspendió en una solución de RNasa 20  $\mu\text{g/ml}$  en TE 10/1 pH8.

#### 5.- Transformación de E. coli (Maniatis et al, 1982)

Se crecieron las células a transformar en medio líquido LB hasta su fase estacionaria. Este cultivo se diluyó 1 a 200 y se incubó hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 de a 600nm (fase exponencial). Enseguida se cosecharon las células por centrifugación a 10000 rpm (rotor Sorvall HB-4) por cinco minutos a  $5^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió suavemente en una solución de NaCl 10mM a  $5^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en el amortiguador de transformación ( $\text{CaCl}_2$  75mM, Tris-HCl 5mM pH7.4,  $\text{MgCl}_2$  5mM) recién preparado a  $5^{\circ}\text{C}$ . Las células se incubaron 20 minutos en hielo, se centrifugaron a 10000 rpm por cinco minutos a  $5^{\circ}\text{C}$ , se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en un mililitro de amortiguador de transformación fresco por cada 100 ml de cultivo inicial. A 200  $\mu\text{l}$  de suspensión de células se les agregaron de 50 a 100 ng del DNA con el que se va a transformar la

cepa. Esto se incubó por 60 minutos en un baño de hielo, calentándose, posteriormente, a 42°C durante un minuto. La mezcla se diluyó en tres mililitros de medio LB y se incubó sin agitación durante tres horas a 37 °C. Los tres mililitros de cultivo se esparcieron en cajas de petri con medio selectivo (100 ul de cultivo por caja) y se incubaron 18 a 24 horas a 37°C. Como control se hizo lo mismo con 200 ul de células, pero no se les agregó el DNA. Los marcadores de las células transformantes se verificaron por la técnica de picado en réplica.

#### 6.- Cruzas

Se cultivaron 5 ml de las cepas donadora y receptora hasta su fase estacionaria. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con una solución de  $MgSO_4$  10mM. La suspensión se centrifugó y se resuspendieron las células en 3 ml de la misma solución. Se esparcieron por separado en cajas de petri con medio PY 100 ul de la cepa receptora, 50 ul de la donadora y una mezcla de donadora-receptora a una tasa de 0.5:1. Se incubaron a 30°C durante 24 horas. De cada caja, se cosecharon las células en 5 ml de  $MgSO_4$  10mM-Tween 0.01%, se hicieron las diluciones necesarias y se colocaron en medio selectivo . Los controles se esparcieron por

gota en sus marcadores naturales a fin de evaluar sus cuentas viables. Los marcadores de las células transconjugantes se verificaron por la técnica de picado en réplica.

#### 7.- Endonucleasas de restricción y condiciones de digestión

El DNA fué digerido con diferentes enzimas de restricción según las indicaciones sugeridas por el fabricante (Amersham Corp.), excepto que se utilizaron a una concentración de 4 u/ $\mu$ gDNA para DNA total y 6 u/ $\mu$ gDNA para plásmidos .

#### 8.- Visualización de megaplásmidos por la técnica de Eckhardt. (Eckhardt, 1978)

Se hizo un cultivo líquido de las células hasta su fase exponencial temprana. Se colectó 1 ml del cultivo por centrifugación en tubos Eppendorf. La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de una solución de Sarcosyl (lauryl- sarcosinato) 0.1% en TE 50/20 pH8 y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla en TE 50/20. Se centrifugó y la pastilla se resuspendió suavemente en 40  $\mu$ l de solución A ( lisozima 7500 u/ml, RNasa 0.3 u/ml, azul de bromofenol 0.05%, xylene cianol 0.05%, ficoll 400,000 20% en solución TBE 1X ). La suspensión se depositó suavemente en los pozos de un gel de agarosa 0.7% en TBE 1X. A

cada pozo se agregaron 40 µl de solución B (Ficoll 400,000 10%, SDS 0.2% en TBE 1X) y 100 µl de solución C (Ficoll 400,000 5%, SDS 0.2% en TBE 1X). Los pozos se sellaron con agarosa 0.7% y el gel se corrió en TBE 1X por una hora a 8mA por gel y 4 horas a 40mA por gel a corriente constante .

Los geles se tñeron 15 minutos en una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml y se fotografiaron sobre una lámpara de luz ultravioleta (Fotodyne) con película Kodak Panatomic.

9.- Electroforesis de DNA total. (Maniatis et al, 1982)

El DNA previamente digerido se analizó en geles de agarosa 1% (15x15x0.3 cm) en Tris-Acetatos-EDTA 1X (Tris acetatos 40 mM pH8, EDTA 1 mM) a 30 V durante 12 a 16 horas, voltaje constante. Los geles se tñeron 15 minutos en una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml y se fotografiaron sobre una lámpara de luz ultravioleta (Fotodyne) con película Kodak Panatomic .

10.- Transferencia a nitrocelulosa por el método de Southern. (Maniatis et al, 1982)

El DNA de los geles se transfirió a membranas de nitrocelulosa Hybond C Extra (Amersham Corp.) por el método de Southern . Los

geles se lavaron 30 minutos en HCl 0.25N, 30 minutos en NaOH 0.5N NaCl 1.5M y 60 minutos en Tris 0.5M NaCl 1.5M. El gel se colocó entonces entre dos membranas de nitrocelulosa embebidas en una solución de SSC 6X (SSC 20X es citrato de sodio 1.5M y NaCl 3M) y se dejó que el DNA se transfiriera a las membranas durante 12 horas. Posteriormente el DNA se fijó a las membranas por incubación durante 2 horas a 80°C en un horno equipado con vacío (Labline DuoVac Oven).

## 11.- Hibridización

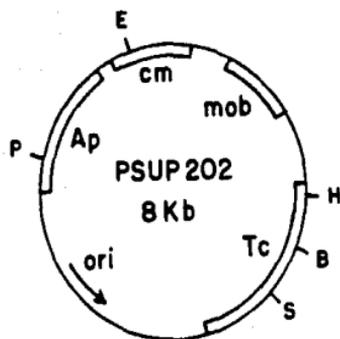
### a) Detectores

Los detectores utilizados fueron el plásmido pSUP202 (Fig. 9) (Simon et al, 1983), el fragmento SalI de 0.27 kb del gen nifH de R. phaseoli (Fig. 10) (Quinto et al, 1985). Este detector fue purificado y amablemente proporcionado por Ma. de L. Girard.

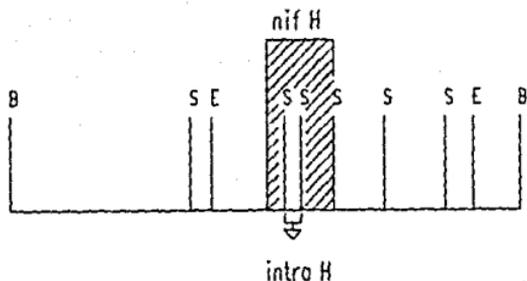
### b) Marcaje radiactivo.

El marcaje radiactivo de los probadores se realizó con <sup>32</sup>P- $\alpha$ -CTP por la técnica de "nick translation" (Maniatis et al, 1982) según las especificaciones sugeridas por el fabricante (Amersham Corp.)

### c) Condiciones de hibridización (Maniatis et al, 1982).



09.- Esquema del plásmido pSUP202. Ap: gen de resistencia a ampicilina; Cm: gen de resistencia a cloramfenicol; Tc: gen de resistencia a tetraciclina; ori: origen de replicación; mob: secuencia para movilización. B: BamHI; E: EcoRI; P: PstI; H: HindIII; S: Sali. (Tomado de Simon *et al*, 1983).



10.- Esquema de la región *nifH* donde se muestra el fragmento *Sall* de 0.27 Kb que se utilizó como detector. La porción hachurada representa la secuencia que codifica para el gen *nifH*. El recuadro de abajo delimita el fragmento empleado como detector. B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; S: *Sall*.

Las hibridizaciones se llevaron a cabo en condiciones de alta severidad (bajas concentraciones de sales, alta temperatura). Las soluciones empleadas para prehibridización fueron las siguientes: Denhardt 10X (denhardt 100X es 2% ficoll, 2% BSA (albúmina de suero de bovino), 2% PVP (polivinil pirrolidona) en H<sub>2</sub>O), amortiguador de fosfatos 0.1M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M, pH6.7), SSC 5X y DNA desnaturalizado de esperma de salmón (100 ug/ml). Las membranas se prehibridizaron por lo menos durante dos horas a 65°C al cabo de las cuales la mezcla de prehibridización se sustituyó por la de hibridización. La mezcla de hibridización fué igual a la de prehibridización pero se le agregó el detector marcado radiactivamente. Las membranas se hibridizaron durante 12 horas a 65°C. Al término de esta incubación las membranas se lavaron, con agitación, para eliminar el exceso de marca. Los lavados fueron: 15 minutos en solución SSC 2X-SDS (dodecil sulfato de sodio) 0.1% a temperatura ambiente; dos a tres lavados de 30 minutos cada uno en una solución de SSC 0.1X-SDS 0.1% a 55°C y dos lavados de 15 minutos en solución de SSC 0.1X. Posteriormente, las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y se montaron en cassettes para autorradiografía.

#### d) Autorradiografía

Las placas de radiografía Kodak (X Omat K) se expusieron a

membranas hibridizadas en cassettes de radiografía y la autorradiografía se llevó a cabo a  $-70^{\circ}\text{C}$  utilizando pantallas intensificantes.

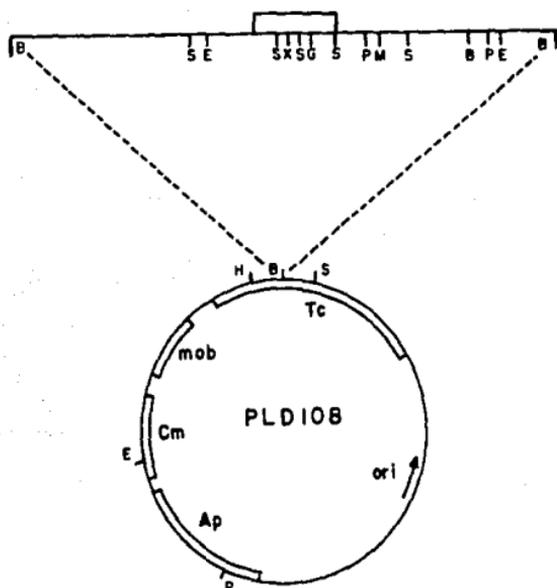
#### 12.- Análisis de perfiles de hibridización por densitometría

Para evaluar el número de copias de una banda con respecto a otras en una autorradiografía se utilizó un densitómetro de barrido GS300 y el sistema de análisis de datos GS350 de Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, Ca.).

## RESULTADOS

El plásmido pLD108 (Fig. 11) forma parte de un banco genómico del DNA de R. phaseoli que está clonado en el vehículo pSUP202 (Fig. 9) y que se mantiene en la cepa de E. coli HB101. La construcción consiste en que el pSUP202 lleva insertado en su sitio único de BamHI, inactivando el gen de resistencia a Tetraciclina del vehículo, un fragmento BamHI del pSym de R. phaseoli CFN42 de 9 Kb que contiene la región nifHa completa (Fig. 2). El pLD108 se empleó como el plásmido integracional ya que reúne las características de éste (Fig. 3) para R. phaseoli: carece de un origen de replicación funcional en R. phaseoli; lleva una secuencia de DNA homóloga al genoma de R. phaseoli (nifHa); porta un marcador genético de resistencia a Ap que se utiliza para su propagación en E. coli; lleva un marcador genético de resistencia a Cm que puede ser visualizado en R. phaseoli; se replica en E. coli; tiene una secuencia mob para movilización en conjugación cuando la función tra le es provista en trans.

Hemos empleado el sistema de transferencia e integración del pLD108 para profundizar en el estudio del papel que juegan

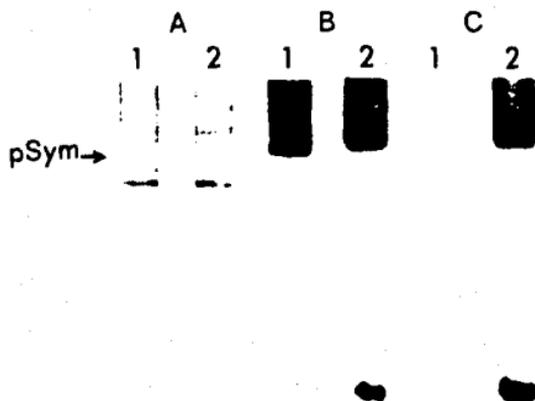


11.- Esquema del plásmido pLD108. Cm: gen de resistencia a cloramfenicol; Ap: gen de resistencia a ampicilina; Tc: gen de resistencia a tetraciclina; ori: origen de replicación para E. coli; mob: secuencia para movilización; B: BamHI.

secuencias reiteradas en la generación de rearrreglos genómicos, en particular de amplificaciones, en R. phaseoli.

El plásmido pLD108 se mantiene para su propagación en la cepa de E. coli HB101. Sin embargo, no es posible hacer la transferencia del plásmido de esta cepa a R. phaseoli por conjugación porque la cepa HB101 no provee de la función de transferencia. Por esta razón ha sido necesario extraer por el método de lisis alcalina al pLD108 de la cepa HB101 y transformar a la cepa S17-1 con este DNA. La transformación de células competentes se realizó por el método de cloruro de calcio. Una vez que el plásmido pLD108 se encontró en la cepa S17-1 se procedió a establecer la cruce entre R. phaseoli y S17-1/pLD108. La transferencia del plásmido pLD108 sí puede ser posible desde la cepa S17-1 ya que esta cepa es capaz de proveer la función de tra en trans. La cruce se realizó según las indicaciones mencionadas en material y métodos y la selección de transconjugantes se llevó a cabo en cajas de petri con medio de cultivo PY suplementado con Nal 20 µg/ml y Cm 15 µg/ml.

La cepa de R. phaseoli CFNX115 es la resultante de la cruce entre la cepa CFN42 y la cepa S17-1/pLD108. El análisis del perfil de plásmidos de la cepa CFNX115 (Fig. 12A carril 2) revela que la banda correspondiente al plásmido simbiótico ha desaparecido. Sin



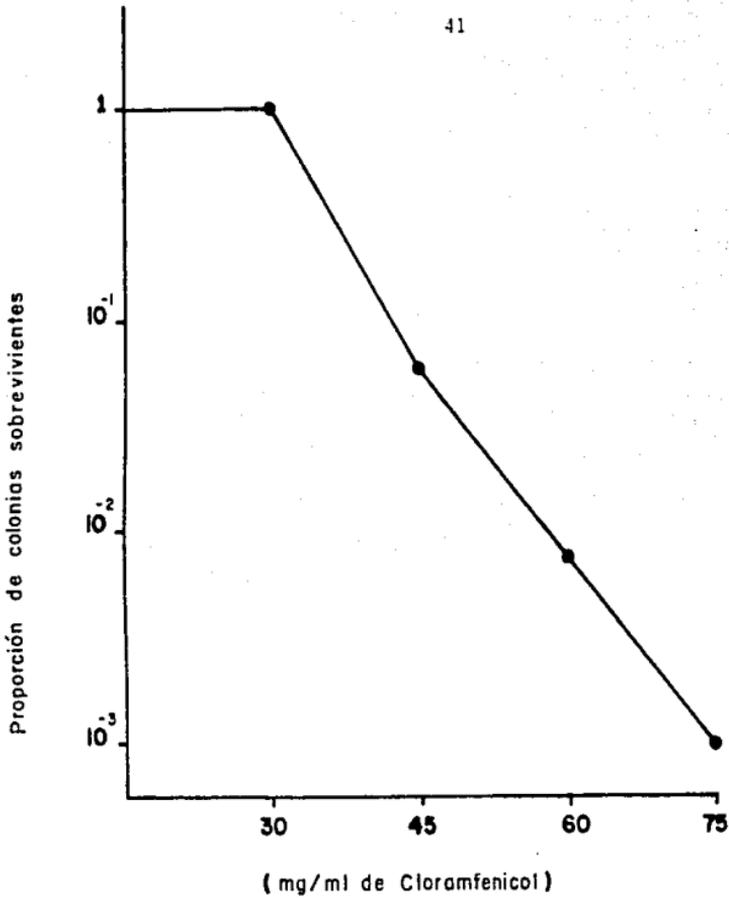
12.- Perfil de plásmidos de las cepas CFN42 (Carriles 1) y CFN115 (Carriles 2). A: tinción con bromuro de etidio; B: hibridización de A contra el detector intraH; C: hibridización de A contra el detector pSUP202. La flecha indica la posición del pSym de la cepa CFN42.

embargo, la hibridización del perfil contra el detector intraH muestra que el plásmido simbiótico de la cepa CFNX115 sí está presente en la cepa (Fig. 12B carril 2) aunque muestre un peso molecular más elevado que la silvestre. Además, la hibridización del perfil que mostramos en el panel A de la figura 12 contra el detector pSUP202 (Fig. 12C carril 2) indica que efectivamente el plásmido pLD108 se integró al genoma de *R. phaseoli* en algún punto del plásmido simbiótico ya que la localización de la banda que hibridiza contra este detector es igual a la que hibridiza contra el detector intraH.

La estructura generada por el evento de integración del plásmido pLD108 puede facilitar la ocurrencia de rearrreglos genómicos como amplificaciones. Por esto hemos decidido someter a la cepa CFNX115 a concentraciones de Cm más elevadas para provocar eventos de amplificación.

Al subcultivar la cepa CFNX115 en medio con 30 µg/ml de Cm se obtuvieron colonias resistentes a una frecuencia de 1 (Fig. 13). Se analizaron dos colonias de la cepa resultante, representadas por la cepa CFNX130.

Cuando la cepa CFNX115 se subcultivó en medio con 45 µg/ml de Cm se obtuvieron colonias resistentes a una frecuencia de  $7.6 \times 10^{-2}$  (Fig. 13). El análisis de las colonias resistentes se



13.- Frecuencia de obtención de colonias derivadas de la cepa CFNX115 resistentes a diferentes concentraciones de cloramfenicol.

dividió en dos cepas representativas: CFNX145 y CFNX245.

El subcultivo de la cepa CFNX115 en 60 y 75  $\mu\text{g/ml}$  de Cm resultó en la obtención de colonias resistentes a una frecuencia de  $8 * 10^{-3}$  y  $2.4 * 10^{-3}$  (Fig. 13) respectivamente. Las cepas resultantes están representadas por las cepas CFNX160 y CFNX175 respectivamente.

El análisis del perfil de plásmidos de la cepa CFNX115 y sus derivadas se muestra en la figura 14. En la tinción con bromuro de etidio (Fig. 14 A) podemos apreciar que igual que en el caso de la cepa CFNX115 (Fig. 14 A carril 2) en ninguna de las derivadas (Fig. 14 A carriles 3 a 7) es evidente la banda que corresponde al pSym. Sin embargo, en la hibridización del perfil observado en A contra el detector intraH (Fig. 14 B) podemos notar que en todas las cepas derivadas de la cepa CFNX115 (Fig. 14 B carriles 3 a 7), incluyendo a la cepa CFNX115 (Fig. 14 B carril 2) hay una banda que hibridiza contra dicho detector y que se localiza ligeramente por encima de la banda del pSym de la cepa silvestre (Fig. 14 B carril 1). Esto nos lleva a decir que el pSym está presente en todas las cepas analizadas pero que es de mayor tamaño que el de la cepa silvestre y que en la tinción con bromuro de etidio no se alcanza a ver ya que debe estar enmascarado por la banda que corresponde al plásmido e. Finalmente, la hibridización del perfil

1 2 3 4 5 6 7

A



B



C



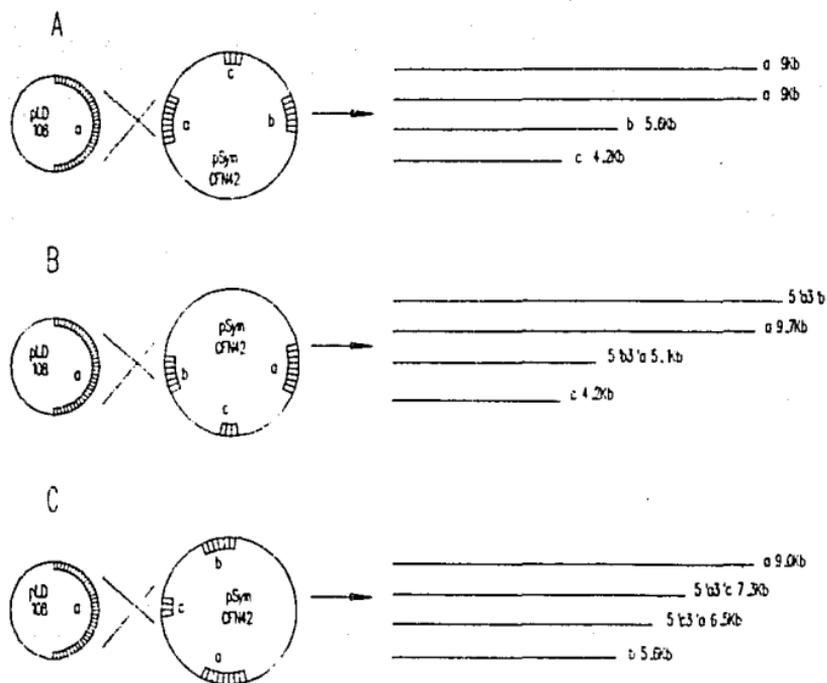
14.- Perfiles de plásmidos de diferentes cepas de *R. phaseoli* y localización de secuencias que hibridizan con los detectores *intraH* y *pSUP202*. A: tinción con bromuro de etidio; B: hibridización de A contra el detector *intraH*; C: hibridización de A contra el detector *pSUP202*. Carril 1: CFN42; carril 2: CFNX115; carril 3: CFNX130; carril 4: CFNX145; carril 5: CFNX245; carril 6: CFNX160; carril 7: CFNX175.

observado en A contra el detector pSUP202 (Fig. 14 C) nos dice que en la cepa CFNX115 (Fig. 14 C carril 2) así como en todas sus derivadas (Fig. 14 C carriles 3 a 7) el plásmido pLD108 se encuentra integrado al pSym ya que la altura de la banda que hibridiza contra este detector es, en todos los casos, la misma que la que hibridiza contra el detector intraH. La figura 14 nos revela también que además de la banda correspondiente al cointegrado entre el pSym y el pLD108 existe toda una serie de bandas de menor tamaño que podemos decir que se componen tanto de secuencias del gen nifH (Fig. 14 B carriles 2 a 7) como del pSUP202 (Fig. 14 C carriles 2 a 7) dado que los detectores empleados revelan su presencia. Estas bandas corresponden aproximadamente, en tamaño, a monómeros y multímeros del pLD108.

Como ya hemos mencionado, el plásmido simbiótico, pSym, tiene dos operones nifHDK completos localizados en dos regiones del plásmido, nifHa y nifHb, separados por 120 Kb y dispuestos en orientación directa. En las 120 Kb que los separan se localizan varios genes nod y la tercera reiteración de nifH ubicada en la región nifHc dispuesta en orientación opuesta a ambos operones nifHDK (Fig. 1). Debido a la homología que comparten las tres regiones nifH, la integración del pLD108 podría suceder en cualquiera de ellas. Sin embargo, la integración del pLD108 en la

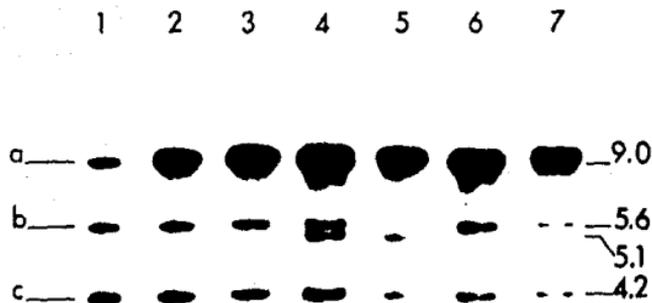
región "a" se vería favorecida por la extensión de la homología -las 9 Kb completas.

La inserción del pLD108 en las diferentes regiones nif del pSym se caracteriza por dar un patrón particular de bandas BamHI que hibridizan contra el detector intraH (Fig. 15). Al integrarse en la región "a" se revelan, en el autorradiograma, una banda de 4.2 kb que es la región nifHc y una de 5.6 kb que es la región nifHb, ambas con la misma intensidad de hibridización y una banda de 9 kb de doble intensidad de hibridización. Si la integración ocurre en la región "b" se revelan las siguientes bandas: una de 9.7 kb que corresponde a una banda híbrida formada por el extremo 5'a y el extremo 3'b, una banda de 9 kb que es la región nifHa, una banda de 5.1 kb que es la banda formada por el extremo 5'b y 3'a y la banda nifHc normal de 4.2 kb. Las cuatro bandas formadas, si es que se puede distinguir entre las bandas de 9.7 y 9 kb presentan la misma intensidad en la señal de hibridización. Cuando el pLD108 se inserta en la región "c" del pSym se forman cuatro bandas: la de 9 kb que es la región nifHa, la de 5.6 kb que corresponde a la región nifHb y dos bandas híbridas una formada por el extremo 5'a y 3'c de 7.3 kb y la otra formada por el extremo 5'c y 3'a de 6.5 kb. Todas las bandas formadas en este caso presentan la misma intensidad en la señal de hibridización.



15.- Esquema donde se muestra el tamaño en kilobases de las bandas que generaría una digestión con BamHI del DNA genómico de la cepa de *R. phaseoli* CFN42 si el pLD108 se insertara en A: *nifHa*; en B: *nifHb*; o en C: *nifHc* del plásmido simbiótico.

La figura 16 es el autorradiograma de la hibridización contra el detector *intraH* del patrón de restricción con la enzima BamHI del DNA total de las cepas CFN42, CFNX115 y sus derivadas. Como podemos ver la cepa CFN42 (Fig. 16, carril 1) presenta tres bandas que hibridizan contra el detector que son de 9, 5.6 y 4.2 Kb, que tienen la misma intensidad de hibridización y que corresponden a las regiones nifHa, nifHb y nifHc respectivamente. La intensidad de las bandas nif se espera igual ya que el detector hibridiza contra una secuencia que es idéntica en las tres regiones nif. Sin embargo, la cepa CFNX115 (Fig. 16, carril 2) presenta un patrón de hibridización igual que el de la cepa CFN42 a exceptuar por la intensa señal de hibridización de la banda nifHa. La cepa CFNX130 (Fig. 16, carril 3) es igual a la cepa CFNX115 en lo que se refiere al patrón y a la intensidad de la señal de hibridización. La cepa CFNX145 (Fig. 16, carril 4) se distingue de la cepa silvestre CFN42 y de la cepa parental CFNX115 en el patrón de bandas que hibridizan contra el detector *intraH*. Esta cepa se caracteriza por presentar una banda adicional de 5.1 kb, por la intensa señal de hibridización de la banda nifHa y por que la banda nifHc es dos veces más intensa que las bandas nifHb y que la nueva banda. En el caso de la cepa CFNX245, la banda correspondiente a la región nifHb ha desaparecido y sólo se aprecia una banda de 5.1

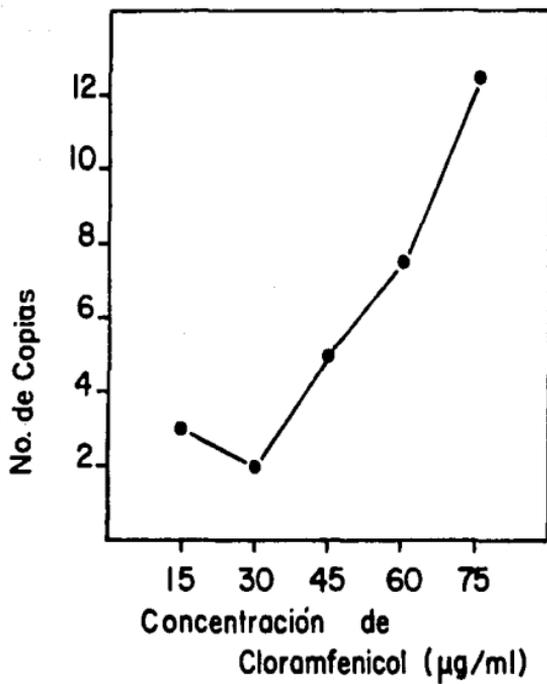


16.- Análisis por hibridización tipo Southern de cepas de R. phaseoli. El DNA genómico de cada cepa fue digerido con la enzima BamHI e hibridizado contra el detector intraH. Carril 1: CFN42; carril 2: CFNX115; carril 3: CFNX130; carril 4: CFNX145; carril 5: CFNX245; carril 6: CFNX160; carril 7: CFNX175. Las letras a la izquierda de la figura se refieren a las diferentes regiones nifH. Los números a la derecha de la figura indican los tamaños de los fragmentos en kilobases.

kb, además de la intensa señal de hibridización de la banda nifHa. Las cepas CFNX160 y CFNX175 tienen el mismo patrón de hibridización que la cepa parental CFNX115 y sólo se distinguen por la intensa señal de hibridización de la banda nifHa.

El análisis densitométrico de los carriles de la figura 16 revela que en la cepa CFNX115 la banda nifHa es tres veces más intensa que las bandas nifHb y nifHc (Fig. 17). Igualmente, la cepa CFNX130 muestra una banda nifHa tres veces más intensa que las otras dos bandas. Esto indica que la integración del pLD108 no sólo provocó una duplicación de la región nifHa sino una triplicación y que la cepa CFNX115 es capaz de resistir hasta 30 ug/ml de Cm ya que no apreciamos ninguna amplificación en la selección de la cepa CFNX130. Las cepas CFNX145 y CFNX245 tienen una banda nifHa cinco veces más intensa que la cepa parental CFNX115, la cepa CFNX160 la tiene 8 veces más intensa y la cepa CFNX175 12 veces más intensa que la cepa CFNX115 (Fig. 17).

En cuanto a la reversibilidad del evento de amplificación, se subcultivaron todas las cepas aisladas por un lapso equivalente a 20 generaciones en ausencia del antibiótico. Se analizó el nivel de resistencia a Cm de 15 colonias derivadas de cada cepa y encontramos que en la mayoría de los casos se pierde la amplificación e incluso la inserción original del pLD108, aunque no



17.- Relación entre el nivel de resistencia a cloramfenicol y el número de copias de nifHa.

detectamos ninguna deleción mayor. Sin embargo, también encontramos derivadas que no eran capaces de tolerar ni 15  $\mu\text{g/ml}$  de Cm pero que aún conservaban las secuencias del pLD108 (datos no mostrados).

## DISCUSION

Hasta el momento hemos mostrado que la introducción por conjugación de un plásmido integracional, pLD108, en R. phaseoli resulta en su integración. El incremento en la concentración de Cm empleado en el subcultivo de la cepa CFNX115 va acompañado de un incremento en el número de copias de la región nifHa.

La integración del pLD108 por un evento de recombinación recíproca de tipo Campbell en la región nifHa del pSym de R. phaseoli genera la duplicación de la región nifHa. Las secuencias propias del pSUP202, donde se localiza el gen de resistencia a Cm, quedan flanqueadas por las regiones duplicadas (Fig. 4). Esta estructura puede facilitar la amplificación cuando se emplean concentraciones de antibiótico superiores a las que puede tolerar una sola copia del gen de resistencia. La unidad de DNA amplificable incluye una de las repeticiones y las secuencias localizadas entre las dos reiteraciones (Dowds et al, 1988), en este caso el pLD108.

Los resultados que hemos presentado de la cepa CFNX115 (Fig.

12 ) nos indican que el pLD108 se ha integrado en el pSym de *R. phaseoli* y que el sitio de su inserción fué en la región nifHa (Figs. 15 y 16). El patrón de hibridización del DNA total digerido con la enzima BamHI de la cepa CFNX115 contra el detector intraH (Fig. 16, carril 2) nos dice que la integración del pLD108 sucedió en la región nifHa del pSym. Sin embargo, la intensidad de hibridización de la banda nifHa de la cepa CFNX115 (Fig. 17), evaluada por densitometría, revela que la región nifHa no sufrió una duplicación sino una triplicación. Tenemos evidencia de que cepas amplificadas derivadas de la cepa CFNX115, después de 20 generaciones de cultivo sin presión selectiva han perdido totalmente su capacidad de resistencia a 15 µg/ml de Cm aunque aún conservan al pLD108. Esto nos lleva a decir que el nivel de resistencia que confiere una sola copia del pLD108 no es suficiente para resistir a 15 µg/ml de Cm en *R. phaseoli* y por lo tanto sucede una amplificación inicial en la cepa CFNX115 produciendo la triplicación de la región nifHa.

Existen dos mecanismos por los que la amplificación de la cepa CFNX115 y sus derivadas pudieron ocurrir (Anderson & Roth, 1981; Dowds et al., 1988; Peterson & Rownd, 1985; Romero et al., 1991; Young & Hranueli, 1988 ). El primero que proponemos sucede por entrecruzamiento desigual entre secuencias reiteradas (Fig. 5) en

una molécula en replicación y la resolución del cointegrado por otro evento de recombinación. El entrecruzamiento desigual genera la duplicación de todas las secuencias comprendidas entre los puntos de recombinación. La resolución del cointegrado genera siempre ,además de la molécula amplificada, una molécula que no lleva ningún determinante de resistencia a Cm. Como la selección es sólo para aquellas moléculas que son resistentes a Cm, la molécula que no lleva el determinante de resistencia se pierde en la segregación. La extensión de la amplificación depende de la distancia entre los puntos de recombinación. El sector amplificado queda arreglado en tandem.

De acuerdo a este modelo, la cepa CFNX115 se generaría por entrecruzamiento desigual entre las regiones nifHa reiteradas creando una tercera región nifHa y una duplicación del vector. La cepa CFNX130 es igual a la cepa CFNX115, lo que se comprueba al ver que la frecuencia de obtención de la cepa CFNX130 a partir de la cepa CFNX115 es de 1 (Fig. 13). Las cepas CFNX160 y CFNX175 se generarían por eventos sucesivos de entrecruzamiento desigual entre dos de las regiones nifHa (Fig. 5) hasta alcanzar un número de copias de nifHa de 8 y de 12 respectivamente, así como 7 y 11 copias del gen de resistencia a Cm. La cepa CFNX145 (Fig. 16 carril 4) se distinguiría por haber tenido un evento de

entrecruzamiento desigual entre alguna de las regiones nifHa reiteradas y la región nifHb. Esto se caracteriza por la duplicación de las 120 Kb que separan a las regiones nifHa y nifHb y que incluyen a la región nifHc y por la formación de una banda híbrida de 5.1 Kb constituida por el extremo 5' de nifHb y el extremo 3' de nifHa. El patrón de hibridización del DNA total digerido con la enzima BamHI de esta cepa contra el detector intrahes, como se aprecia en la figura 16 carril 4, una banda muy intensa de 9 kb, una banda de 5.6 kb que es nifHb, una banda de igual intensidad de hibridización que la banda nifHb de 5.1 kb y una banda de 4.2 kb con una señal de hibridización del doble que las bandas de 5.1 y 5.6 kb. Las características de la cepa CFNX245 (Fig. 16, carril 5) y los elementos circulares que aparecen en el perfil de plásmidos de todas las cepas (Fig. 14) no se pueden explicar por este modelo.

El modelo de escisión y reinserción de círculos es el segundo que proponemos (Romero *et al*, 1991; Spies & Laufs, 1983; Yagi & Clewell, 1977; Young & Hranueli, 1988). En este modelo, se escinde una molécula circular por recombinación entre las dos regiones nifHa reiteradas (Fig. 6). El elemento circular está formado por una copia de nifHa y el pSUP202 (Fig. 14). La amplificación se debe a la reinserción de esta pequeña molécula en una segunda

molécula pSym/pLD108 existente en la célula. Dependiendo del número de copias de nifHa que haya en cada molécula se escindirá uno o varios monómeros de pLD108, o un monómero y un dímero etc.. En la segregación se selecciona hacia las células que hayan recibido la molécula con el mayor número de copias del determinante de resistencia a Cm. El punto de recombinación, tanto para la escisión como para la reinserción, se encuentra dentro de las 17 Kb del pLD108. La reinserción del elemento circular genera un arreglo en tandem del sector amplificado (Fig. 6).

La integración del pLD108 en el pSym de R. phaseoli genera la duplicación de la región nifHa. La recombinación entre las dos reiteraciones de nifHa provoca la escisión de un monómero del pLD108 y su reinserción en una segunda molécula del pSym con la región nifHa reiterada resulta en la formación de una molécula con tres copias de nifHa, como es el caso de las cepas CFNX115 y CFNX130 (Fig. 16, carriles 2 y 3). En la cepa CFNX145, además de la escisión y reinserción de monómeros o dímeros del pLD108, hubo escisión y reinserción de una molécula circular de 120 Kb que es resultado de la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb. La reinserción de este círculo, en algún punto de las 120 Kb homólogas de la segunda molécula, provoca la duplicación de estas 120 Kb en las que se encuentra la región nifHc (Fig. 7). Así, resulta la

presencia de una banda nifHa amplificada, una banda nifHb, una banda híbrida de 5.1 Kb formada por el extremo 5'nifHb y el extremo 3'nifHa del círculo de 120 Kb y una banda de doble intensidad de hibridización que corresponde a la región nifHc (Fig. 16, carril 4). La cepa CFNX245 se forma por escisión y reinserción de monómeros o multímeros del pLD108 pero la reinserción no sucede, como en los otros casos en la región nifHa ni en las 8 Kb del pSUP202 sino que ocurre en la región nifHb (Fig. 8). La recombinación entre estas dos regiones nif se infiere por la desaparición de la banda nifHb de 5.6 Kb y por la formación de dos bandas híbridas: una es de 9.7 Kb y lleva el extremo 5'nifHa y el extremo 3'nifHb; la otra es de 5.1 Kb y está formada por el extremo 5'nifHb y el extremo 3'nifHa (Fig. 16, carril 5). La banda de 9.7 Kb no se distingue de la banda de 9.0 Kb ya que la técnica electroforética no permite separar suficientemente las bandas de ese tamaño y porque la señal de hibridización de la banda de 9.0 Kb es muy intensa. Las cepas CFNX160 y CFNX175 son el resultado de la escisión de monómeros o multímeros del pLD108 y de su reinserción ya sea en la región nifHa o en las 8 Kb del vector (Fig. 16, carriles 6 y 7).

Los dos modelos de amplificación que hemos mencionado pudieran estar operando en R. phaseoli. Experimentalmente es difícil

distinguir uno de otro (Young & Hranueli, 1988) y en algunos casos podrían operar simultáneamente. Existe la evidencia experimental de la ocurrencia del mecanismo de escisión y reinserción de círculos en B. subtilis (Young, 1984), Streptococcus faecalis (Yagi & Clewell, 1977), Haemophilus influenzae (Spies & Laufs, 1983) y se ha propuesto el modelo de entrecruzamiento desigual para amplificación en Salmonella typhimurium (Anderson & Roth, 1981), E. coli (Hill et al., 1977; Lin et al., 1984). La evidencia de elementos circulares formados por secuencias de nifH y de pSUP202 (Fig. 14) y el patrón de bandas que hibridizan contra el detector intraH en la cepa CFNX245 (Fig. 16, carril 5) indican que probablemente el modelo de amplificación por escisión y reinserción de elementos circulares sea el que opera en el caso de R. phaseoli.

La amplificación de secuencias de DNA de R. phaseoli en un vehículo independiente en multicopia ha permitido la identificación de la secuencia psi involucrada en la inhibición de la síntesis de exopolisacáridos (Borthakur et al., 1985). La generación de amplificación en tandem de un sector específico de DNA por una estrategia como la que hemos empleado en este caso puede ser de gran utilidad en el estudio genético de R. phaseoli y de bacterias relacionadas. Se ha visto que en K. pneumoniae se inhibe la

facultad de fijar nitrógeno cuando los genes nif se encuentran amplificados en un vehículo autónomo en multicopia (Riedel et al., 1983) y en R. leguminosarum se inhibe la capacidad de nodulación al portar en un vehículo en multicopia los genes nodABC (Knight et al., 1986). La estrategia de generar amplificaciones directamente en un replicón propio del organismo puede ser una herramienta útil para evitar problemas de inhibición por un vehículo autónomo en multicopia así como para analizar el efecto de dosis génica de genes involucrados en el establecimiento de la simbiosis. La estrategia permite generar amplificación de cualquier sector de DNA y puede ser aplicado no sólo en organismos como R. phaseoli sino que puede ser empleado en casi cualquier sistema.

La presencia de secuencias de DNA reiteradas no es una característica exclusiva del genoma de R. phaseoli (Flores et al., 1987; Martínez et al., 1988; Martínez et al., 1985; Quinto et al., 1982; Quinto et al., 1985), también se presenta en organismos relacionados (Badenoch-Jones et al., 1989; Flores et al., 1987; Gyorgypal, et al., 1988; Hahn & Hennecke, 1987; Honma & Ausubel, 1987; Kaluza et al., 1985; Norel & Elmerich, 1987; Prakash & Atherly, 1984; Renalier et al., 1987; Watson & Schofield, 1985). Por esta razón estos organismos son susceptibles de rearrreglos genómicos entre los que podemos mencionar a la amplificación. En

B. subtilis (Albertini & Galizzi, 1985) y en S. faecalis (Yagi & Clewell, 1977), E. coli y Salmonella (Petes & Hill 1990) el mecanismo de amplificación ya sea por entrecruzamiento desigual o por escisión y reinserción de círculos depende de recA. En R. phaseoli se han realizado estudios de la frecuencia de aparición de rearreglos entre secuencias reiteradas y los resultados indican que dependen de recA (Martínez-Salazar *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que el mecanismo de amplificación, ya sea por entrecruzamiento desigual o por escisión y reinserción de círculos, involucra la recombinación entre secuencias homólogas y que es recA dependiente. La evidencia que hemos presentado sugiere que el mecanismo de amplificación que sufrió R. phaseoli fue el de escisión y reinserción de círculos aunque debemos determinar, todavía, su composición exacta .

Hasta el momento se ha logrado crear la amplificación de los genes de fijación de nitrógeno. Sin embargo, uno de los intereses principales en el estudio de R. phaseoli es conocer su efectividad simbiótica. Nuestros esfuerzos se centrarán, en el futuro, en lograr estabilizar cepas con los genes de fijación amplificados con el fin de evaluar su fenotipo simbiótico.

## CONCLUSIONES

1. El plásmido integracional que empleamos, el pLD108, se integró en la región nifHa del plásmido simbiótico.
2. Es posible seleccionar para amplificaciones de un sector determinado al ejercer presión sobre uno de los genes contenidos en el plásmido integracional.
3. Proponemos dos modelos de amplificación que son:
  - a) Por entrecruzamiento desigual entre las regiones nif en una molécula replicativa y
  - b) Por escisión y reinserción de elementos circulares.

Ambos modelos pudieran operar en los casos que hemos observado en R. phaseoli, aunque el modelo de entrecruzamiento desigual no explica todos los eventos observados y existe evidencia de la presencia y de la composición de los elementos circulares. El modelo de escisión y reinserción de elementos circulares es el que proponemos como más viable.

4. Los eventos de amplificación observados suceden por recombinación entre las regiones nif:
  - a) entre las regiones nifHa duplicadas por la integración del plásmido pLD108 o
  - b) entre una de las regiones nifHa reiteradas y la región nifHbEstas regiones reiteradas juegan un papel importante en la generación de rearrreglos genómicos.
5. Se puede establecer una relación directa entre la concentración de antibiótico empleado y el grado de amplificación seleccionado.
6. La utilización de plásmidos integracionales es funcional en este caso para los genes nif y su empleo se podría ampliar a otros sectores del genoma de R. phaseoli así como para otros estudios de ingeniería genética. El sistema es ventajoso cuando se quiere evitar el empleo de vehículos autónomos en multicopia para estudios de dosis génica.
7. La amplificación seleccionada por este método es inestable ya que desaparece al no existir ninguna presión.

8. Se sugiere continuar con estos estudios para conocer mejor los mecanismos moleculares involucrados en la plasticidad genómica de este organismo con el fin último de establecer estrategias de manipulación de éste sobre bases más racionales.

## REFERENCIAS

Albertini, A. M. y A. Galizzi. 1985. Amplification of a chromosomal region in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 162: 1203-1206.

Anderson, P. y J. Roth. 1981. Spontaneous tandem genetic duplications in Salmonella typhimurium arise by unequal recombination between rRNA (rrn) cistrons. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3113-3117.

Arnold, W., A. Rump, W. Klipp, U. B. Priefer y A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of Klebsiella pneumoniae. J. Mol. Biol. 203: 715-738.

Badenoch-Jones, J., T. A. Holton, C. M. Morrison, K. F. Scott y J. Shine. 1989. Structural and functional analysis of nitrogenase genes from the broad-host-range Rhizobium strain ANU240. Gene 77: 141-153

Berry, J. O., y A. G. Atherly. 1984. Induced plasmid-genome rearrangements in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 157: 218-224.

Borthakur, D., J. A. Downie, A. W. B. Johnston, y J. W. Lamb. 1985. psi, a plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 200: 278-284

Djordjevic, M. A., W. Zukowski y B. G. Rolfe. 1982. Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium trifolii. J. Bacteriol. 151: 560-568.

Dowds, B. C. A., C. O'Kane, E. Gormley, D. J. McConnell, y K. M. Devine. 1988. Integrating plasmids in the genetic engineering of bacilli. in Recombinant DNA and bacterial fermentation, Jennifer A. Thomson (Ed.). CRC Press Inc. pp

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1: 584-588.

Flores, M., V. González, S. Brom, E. Martínez, D. Piñero, D. Romero, G. Dávila y R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol. 169: 5782-5788.

Flores, M., V. González, M.A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, D. romero, D. Piñero, G. Dávila y R. Palacios. 1988. Genomic instability in Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 170: 1191-1196.

Girard M. L., M. Flores, S. Brom, D. romero, R. Palacios y G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of Rhizobium leguminosarum bv.phaseoli. J. Bacteriol. 173: 2411-2419

Gyorgypal, Z., N. Iyer y A. Kondorosi. 1988. Three regulatory nodD alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 212: 85-92.

Hahn, M. y H. Hennecke. 1987. Mapping of a Brabryrhizobium japonicum DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2247-2252.

Hill, C. W., R. H. Grafstrom, B. W. Harnish y B. S. Hillman. 1977. Tandem duplications resulting from recombination between ribosomal RNA genes in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 116: 407-428.

Honma, M. A., F. M. Ausubel. 1987. Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84: 8558-8562.

Hombrecher, G., N. J. Brewin y A. W. B. Johnston. 1981. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in Rhizobium leguminosarum and R. phaseoli. Mol. Gen. Genet. 182: 133-136.

Kaluza, K., M. Hahn y H. Hennecke. 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the nif region of the Rhizobium japonicum genome. J. Bacteriol. 162: 535-542.

Knight, C. D., L. Rossen, J. G. Robertson, B. Wells y J. A. Downie. 1986. Nodulation inhibition by Rhizobium leguminosarum multicopy nodABC genes and analysis of early stages of plant infection. J. Bacteriol. 166: 552-558.

Layzell, D.B., S. Hunt, A.H.M. Moloney, S.M. Fernando y L. Diaz del Castillo. 1990. Physiological, metabolic and developmental implications of  $O_2$  regulation in legume nodules. pp. 21-32. En: Gresshoff, P., L. E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds). Nitrogen Fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall. N.Y.

Lin, R-J., M. Capage y C. W. Hill. 1984. A repetitive DNA sequence, rhs, responsible for duplications within the Escherichia coli K-12 chromosome. J. Mol. Biol. 177: 1-18.

Long, S. R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. Cell 56: 203-214.

Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Sping Harbor, N. Y.

Martínez, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila y R. Palacios. 1988. Rhizobium phaseoli: a molecular genetics view. Plant and Soil 108: 179-184.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Martínez, E. M. A. Pardo, R. Palacios y M. A. Cevallos. 1985.

Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen. Microbiol. 131: 1779-1786.

Martínez, E., D. Romero y R. Palacios. 1990. The Rhizobium genome. Crit. Revs. in Plant Sci. 9: 59-93.

Martínez-Salazar J. M. 1991. Clonación y caracterización del gene recA de Rhizobium phaseoli. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM.

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

Noel, K. D., F. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans y M. A. Cevallos. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with trasposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158: 148-155.

Norel, F., y C. Elmerich. 1987. Nucleotide sequence and functional analysis of the two nifH copies of Rhizobium ORS571. J.

Gen. Microbiol. 133: 1563-1576.

Peterson, B. C. y R. H. Rownd. 1985. Drug resistance gene amplification of plasmid NR1 derivatives with various amounts of resistance determinant DNA. J. Bacteriol. 161: 1042-1048.

Petes, T.D. y C.W. Hill. 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. Annu. Rev. Genet. 22: 147-168.

Phillips, D.A., y R. L. Teuber. 1985. Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. En: Evans, H.J., P. J. Bottomley y W. E. Newton (Eds). Nitrogen Fixation Research Progress. Martinus Nijhoff Publ. E.E. U.U.

Prakash, R. K. y A. G. Atherly. 1984. Reiterations of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing Rhizobium japonicum. L. Bacteriol. 160: 785-787.

Prakash, R. K., R. A. Schilperoort y M. P. Muti. 1981. J Bacteriol. 145: 1129-1136.

Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G.

Soberón, y R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature (London) 299: 724-726.

Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, M. L. Girard, E. Calva y R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 82: 1170-1174.

Renalier, M. H., J. Batut, J. Ghai, B. Terzaghi, M. Gherardi, M. David, A. M. Garnerone, J. Vasse, G. Truchet, T. Huguet y P. Boistard. 1987. A new symbiotic cluster on the psym megaplasmid of Rhizobium meliloti 2011 carries a functional gene repeat and a nod locus. J. Bacteriol. 169: 2231-2238.

Riedel, G. E., S. E. Brown y F. M. Ausubel. 1983. Nitrogen fixation by Klebsiella pneumoniae is inhibited by certain multicopy hybrid nif plasmids. J. Bacteriol. 153: 45-56

Rolfe, B.G. y P. M. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.

32: 297-319.

Romero, D., P. W. Singleton, L. Segovia, E. Morett, B. B. Bohlool, R. Palacios y G. Dávila. 1988. Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in Rhizobium phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54: 848-850.

Romero, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M. L. Girard, R. Palacios y G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a nod-nif region in the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 173: 2435-2441.

Ronson, C.W., A. Bosworth, M. Genova, S. Gudbrandsen, T. Hankinson, R. Kwiatowski, H. Ratcliffe, C. Robie, P. Sweeney, W. Szeto, M. Williams y P. Zablotowicz. 1990. Field release of genetically-engineered Rhizobium meliloti and Bradyrhizobium japonicum strains. pp. 397-403. En: Cresshoff, P., L. E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds). Nitrogen fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, N.Y.

Rosenberg, C., P. Boistard, J. Denarié y F. Casse-Delbart. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located

on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 184: 326-333.

Segovia, L. 1988. Construcción de mutaciones en las regiones nif de Rhizobium phaseoli. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPYP del CCH, UNAM.

Simon, R., U. Prierer y A. Pühler. 1983. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of Gram-negative bacteria. in Molecular Genetics of the bacteria, A. Pühler (Ed.) Springer Verlag. Berlin Heidelberg. pp.98-106.

Soberón-Chávez, G., R. Nájera, H. Olivera y L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol. 167: 487-491.

Spies, T. y R. Laufs. 1983. Circularized copies of amplifiable resistance genes from Haemophilus influenzae plasmids. J. Bacteriol. 156: 1263-1267.

Sprent, J. I. 1986. Benefits of Rhizobium to agriculture. Tibtech 4: 124-129.

Triplett, E.W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in Rhizobium and Bradyrhizobium. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 199-206.

Watson, J. M. y P. R. Schofield. 1985. Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in Rhizobium trifolii. Mol. Gen. Genet. 199: 279-289.

Yagi, Y. y D. B. Clewell. 1977. Identification and characterization of a small sequence located at two sites on the amplifiable tetracycline resistance plasmid pAM 1 in Streptococcus faecalis. J. Bacteriol. 129: 400-406.

Young, M. 1984. Gene amplification in Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 130: 1613-1621.

Young, M. y D. Hranueli. 1988. Chromosomal gene amplification in Gram-positive Bacteria. in Recombinant DNA and bacterial fermentation, Jennifer A. Thomson (Ed.). CRC Press Inc.