



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"**

**PAPEL DEL CITOCROMO  $aa_3$  EN LA FIJACION  
SIMBIOTICA DE NITROGENO: ANALISIS DE UN  
MUTANTE  $aa_3^-$  DE Rhizobium phaseoli**

**T E S I S**

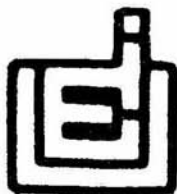
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**ERNESTO GERARDO GARCIA CORTES**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. J. EDGARDO ESCAMILLA MARVAN**



**MEXICO, D. F.,**

**1992**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. J. Edgardo Escamilla Marván y con apoyo de la Beca-Crédito Tesis de Licenciatura del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 57633.

A mis Padres y  
hermanos

A Elizabeth con amor

A la Universidad

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Edgardo Escamilla Marván, por la dirección y apoyo constante para la realización de esta Tesis profesional. En especial, agradezco al Dr. Edgardo su amistad e interés en mi formación académica.

Al Dr. Mario Soberón, por su interés y sugerencias puestas en este trabajo, además de las facilidades brindadas durante mi estancia en el Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno.

A la Unidad de Microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su trabajo profesional.

Al Biol. Germán Aguilar por su compañerismo y ayuda desinteresada.

A mis compañeros de laboratorio: Martha, Ruben, Biserka, Laura, Fedora, Carolina, Birmania y Juan por su amistad y ayuda. Gracias a todos.

## INDICE

I. ABREVIATURAS. . . . .	05
II. RESUMEN. . . . .	07
III. INTRODUCCION	
1. Generalidades sobre sistemas respiratorio bacterianos. . . . .	08
2. Fijación biológica de nitrógeno. . . . .	12
3. Bioenergética de la simbiosis <i>Rhizobium-</i> leguminosas. . . . .	15
IV. MATERIALES Y METODOS. . . . .	23
V. RESULTADOS. . . . .	38
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . .	63
VII. REFERENCIAS. . . . .	73

## I. ABREVIATURAS

<b>ARA</b>	Actividad de reducción de acetileno
<b>asc</b>	Ascorbato
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>cit</b>	Citocromo
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>cpm</b>	Cuentas por millon
<b>CO</b>	Monóxido de carbono
<b>DCPIP</b>	Diclorofenolindofenol
<b>DNAasa</b>	Deoxiribonucleasa
<b>E</b>	Coefficiente de extinción molar
<b>FMN</b>	Flavín mononucleótido
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>Lb</b>	Leghemoglobina
<b>MPB</b>	Membrana peribacteroidal
<b>MQ</b>	Menaquinona
<b>NADH</b>	Nicotinadenín dinucleótido reducido
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinadenín dinucleótido fosfato reducido
<b>Nal</b>	Acido nalidixico
<b>nm</b>	Nanometro
<b>nod</b>	Nodulación
<b>ox</b>	Oxidado
<b>PMS</b>	Metasulfato de fenazina
<b>PY</b>	Peptone-yeast
<b>red</b>	Reducido
<b>Rif</b>	Rifampicina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio

<b>Sm</b>	Estreptomicina
<b>SR</b>	Sistema respiratorio
<b>TMPD</b>	Tetrametilparafenilendiamina
<b>TRIS</b>	Hidrometilaminometano
<b>TCM</b>	Amortiguador TRIS-HCl, Cloruro de calcio y magnesio
<b>UQ</b>	Ubiquinona



## II. RESUMEN

El sistema respiratorio en *Rhizobium* está fuertemente relacionado con el proceso de fijación simbiótica de dinitrógeno: el aporte de ATP necesario para la actividad de la nitrogenasa es brindado principalmente por la fosforilación oxidativa, al tiempo que la actividad de sus oxidasas contribuyen a abatir los niveles de oxígeno intracelulares. La cadena respiratoria de *R. phaseoli* consta de los citocromos b y c, y de las oxidasas terminales aa<sub>3</sub> y o. Existe evidencia de la participación de una tercera oxidasa: citocromo d. Con el objeto de conocer el papel del citocromo aa<sub>3</sub> en la fijación simbiótica, se aisló y caracterizó una mutante respiratoria de *R. phaseoli* deficiente de esta oxidasa.

La mutante (designada como IFC) se obtuvo a partir de la cepa silvestre CFN42 por inserción de Tn5-mob, y se identificó por su incapacidad de virar al TMPD. Se comprobó que la inserción es responsable del fenotipo TMPD<sup>-</sup> al conjugar la cepa IFC con una cepa receptora sana, y encontrando nuevamente en las transconjugantes este fenotipo. Se demostró además, por hibridización Southern una sola inserción del transposón.

La mutante IFC presentó niveles disminuidos en la actividad de la Asc-TMPD oxidasa, al igual que una señal escasa de citocromo aa<sub>3</sub> en espectros diferenciales. Al ser inoculada plantas de *Phaseolus vulgaris*, la mutante mostró un fenotipo no fijador de nitrógeno (Fix<sup>-</sup>), pero sin embargo, forma nódulos no vacíos. Los resultados sugieren que el citocromo aa<sub>3</sub> es importante para la reacción de fijación debido probablemente a que esta hemoproteína representa un sitio de conservación de energía dañado en esta mutante, más no en su capacidad infectiva y/o de formación de nódulos.

### III. INTRODUCCION

#### A. Generalidades sobre sistemas respiratorios bacterianos.

La respiración bacteriana es un proceso de transferencia de equivalentes reductores ( $H$ ,  $H^-$  o  $e^-$ ), desde un reductor hasta un oxidante a través de una serie de componentes redox asociados a la membrana plasmática (Jones, 1988).

El proceso está ligado a una translocación de protones ( $H^+$ ) hacia el lado exterior de la membrana plasmática, conservandose la energía libre de las reacciones de oxidación y reducción de la cadena respiratoria, en forma de un potencial electroquímico de protones o fuerza protomotriz, de la cual dependen diversas reacciones como la síntesis de ATP (catalizada por el complejo ATP sintetasa), el transporte activo de solutos, la transferencia reversible de electrones, el movimiento flagelar, etc. (Harold, 1986; Anraku y Gennis, 1987; Anraku, 1988).

Jones (1988), propone esquematizar a la cadena respiratoria bacteriana como aquella constituida por una deshidrogenasa primaria y una reductasa terminal (denominada oxidasa cuando el oxígeno molecular actúa como oxidante), ambas unidas por uno o varios acarreadores redox enzimáticos (citocromos) y no enzimáticos (quinonas). A partir de este concepto, es posible enumerar aquellas características propias de los sistemas respiratorios (SR) bacterianos, que establecen notables diferencias con la cadena respiratoria mitocondrial:

1. Los SR bacterianos no constituyen un sistema único: diversidad es una palabra adecuada para definirlos. Existen variaciones en su composición, organización y regulación. Sus

componentes redox o enzimáticos pueden ser o bien constitutivos o sujetos a inducción o represión de acuerdo a las condiciones de su medio ambiente inmediato.

2. Son en su mayoría, ramificados a diferencia de la cadena lineal en la mitocondria. Diversas rutas alternativas al flujo de electrones pueden coexistir en una célula.

3. Con relación a lo anterior, existen varias oxidasas terminales y de acuerdo con la condiciones de crecimiento, una de ellas puede ser predominante.

4. Son capaces de emplear una gran variedad de aceptores de electrones alternos (v.gr.: nitrato, sulfato, fumarato, etc.) además de oxígeno.

5. El número de subunidades de las enzimas respiratorias bacterianas es comunmente menor al de su contraparte en la mitocondria.

En la composición de los SR bacterianos intervienen los mismos tipos básicos de acarreadores redox presentes en la membrana mitocondrial interna: flavoproteínas, proteínas ferrosulfuradas, quinonas, citocromos y citocromos oxidasas terminales (Jones, 1982, 1988; Harold, 1986).

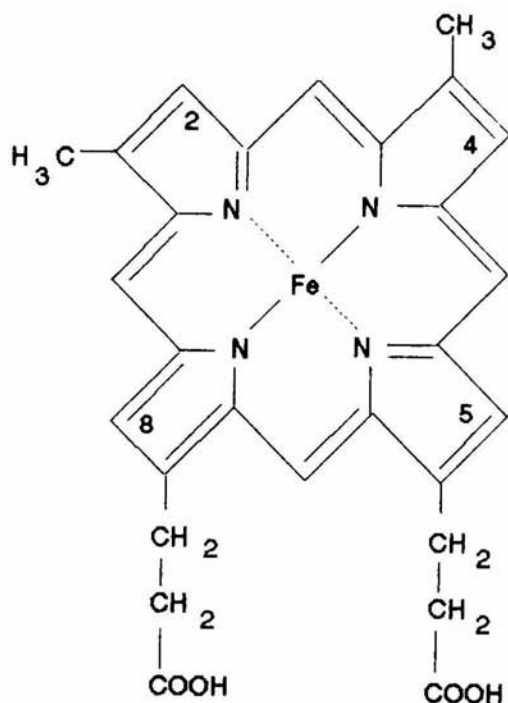
Las flavoproteínas se caracterizan por la presencia de un grupo prostético derivado biosintéticamente de la riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) y que puede ser o bien flavín mononucleótido (FMN) o flavín adenín dinucleótido (FAD). Ambos son portadores de un máximo de dos átomos de hidrógeno en sus núcleos de isoaloxazina.

Los centros redox 2Fe-2S y 4Fe-4S en las proteínas ferrosulfuradas (Fe-S), son capaces de transferir un electrón

mediante una deslocalización electrónica entre sus átomos de hierro (Meyer y Cusanovich, 1989). Cabe mencionar que las deshidrogenasas de NADH y succinato, enzimas virtualmente presentes en todas las especies bacterianas, son flavoproteínas que presentan centros Fe-S y grupos prostéticos de FMN y FAD respectivamente. La primera cataliza la transferencia de equivalentes reductores desde NADH hasta ubiquinona o menaquinona (vease la descripción de quinonas más adelante) y constituye la ruta principal mediante la cual el poder reductor generado como NAD(P)H en las vías centrales del metabolismo alimenta al sistema quinona-citocromo (Jones, 1988). La succinato deshidrogenasa por su parte, cataliza la oxidación de succinato a fumarato y transfiere equivalentes reductores a estos mismos componentes.

Las quinonas ocupan una posición central en la cadena respiratoria y pueden ser o bien ubiquinona o menaquinona (sin embargo algunos pocos organismos pueden presentar menaquinonas modificadas). Las anteriores constan de un núcleo de 1,4-benzoquinona o de naftoquinona respectivamente, unido a una larga cadena lateral poliisoprenoide. Durante la reducción la quinona acepta dos átomos de hidrógeno para formar su quinol correspondiente.

Los citocromos son hemoproteínas cuyo grupo prostético hemo consiste de un tetrapirrol cíclico con un átomo de hierro quelado al centro de la molécula. Este último sufre de oxidaciones reversibles ( $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^-$ ) durante el transporte de electrones. Existen diversos citocromos que se distinguen por sus característicos espectros de absorción resultado de la estructura y el estado redox de su grupo prostético. Así, se reconocen cuatro tipos de hemo: a, b(protohemo), c(mesohemo) y d(clorinas), en atención a diferentes constituyentes en la periferia del hemo (ver figura 1).



HEMO	C-2	C-4	C-5	C-8
a	CH <sub>3</sub> 0 C <sub>11</sub> H <sub>19</sub>	-CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	-	-CHO
b	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
c	-CH-CH <sub>3</sub> S-	-CH-CH <sub>3</sub> S-	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
d	CH-R OH	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>

Fig. 1. Estructuras de los tipos de hemo presentes en los citocromos bacterianos. Observe la posición de los diferentes sustituyentes en la periferia del grupo prostético. Un átomo de Fe se encuentra al centro de la molécula el cual sufre de cambios de valencia durante el transporte de electrones (Tomado de Jones, 1988).

En estado reducido, los citocromos exhiben tres importantes bandas de absorción dentro de la región visible del espectro electromagnético designadas como banda  $\alpha$  (rango aprox. 550-640 nm), banda  $\beta$  (520-530 nm) y la banda  $\gamma$  o de Soret (410-450 nm). La longitud de onda máxima en la región  $\alpha$  es empleada a menudo para distinguir a los citocromos.

Los valores de potencial redox ( $E_m$ ) de los citocromos bacterianos varían en un rango de -100 a 500 mV, siendo los citocromos no autooxidables tipo b y c de valores más bajos que los citocromos oxidasas (Jones y Poole, 1985).

Los citocromo oxidasas son componentes terminales de las cadenas respiratorias que catalizan la reducción de oxígeno a agua (Poole, 1983). Su función es análoga a la citocromo c oxidasa mitocondrial (EC 1.9.3.1.) pero son, sin embargo estructuralmente más simples. Recientemente, Anraku (1988) sugirió dividir a estas hemoproteínas en dos grupos en base a su reductor inmediato: citocromo c oxidasas (clase I) si el donador de electrones es ferrocitocromo c y quinol oxidasas (clase II, solo en bacterias) si reciben electrones de ubiquinoles y/o menaquinoles. En general, su estructura consta de un grupo hemo de los tipos a (citocromos a, (citocromos  $a_3$  y probablemente  $a_1$ ), b, ó d, unido a uno ó varios citocromos no autooxidables o bien centros cupricos para formar un citocromo oxidasa de alguno de los tipos:  $aa_3$ ,  $caa_3$ ,  $a_1$ , o, co, y d (Jones, 1988; Poole, 1988).

## B. Fijación biológica de nitrógeno.

La conversión del dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amoníaco que realizan algunos grupos de microorganismos procariontes (bacterias y cianobacterias), es debido a la presencia en sus células de un sistema enzimático denominado nitrogenasa.

La nitrogenasa (E.C. 1.18.2.1.) está constituida por dos proteínas oligoméricas dissociables. Una, llamada proteína Molibdeno-Hierro (proteína Mo-Fe o componente I) es un tetrámero de composición  $\alpha_2\beta_2$  con un peso molecular de 50 y 60 Kdaltones respectivamente. Presenta 24-30 átomos de hierro, un número aproximadamente igual de átomos lábiles de azufre y 2 átomos de molibdeno por molécula. La segunda proteína, proteína-Hierro (proteína Fe o componente II) es un dímero con cadenas idénticas de peptidos de peso molecular de 30 Kdaltones. La molécula posee 4 átomos de hierro y 4 átomos de azufre y a diferencia de la anterior carece de molibdeno (Mortenson y Thorneley, 1979; Gottschalk, 1986).

La relación estequiométrica entre los dos componentes es de 1 proteína Mo-Fe : 2 proteínas Fe. Ambos poseen centros Fe-S, siendo la proteína Mo-Fe portadora además de dos centros de composición  $8\text{Mo}-8\text{Fe}-6\text{S}$ , que han sido identificados como cofactores esenciales para la actividad de la enzima (Shah y Brill, 1977; Mortenson y Thorneley, 1979; Shah et al., 1984).

Para su actividad, la nitrogenasa requiere de un medio ambiente anaerobio, MgATP y un fuerte reductor. La proteína Fe es reducida por donadores de electrones de bajo potencial electroquímico como ferredoxinas o flavodoxinas. En su estado reducido la proteína une 2 moléculas de MgATP y forma un complejo con la proteína Mo-Fe. En este complejo ocurre un transferencia de electrones a la proteína Mo-Fe acoplado a hidrólisis de ATP, siendo esta última quien cataliza la reducción de diversos sustratos, v.gr.:  $\text{N}_2$ , H ó  $\text{C}_2\text{H}_2$  (Haaker y Veeger, 1984).

Los microorganismos diazótrofos, es decir, con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico pueden dividirse en dos grupos: aquellos que reducen nitrógeno en vida libre y, los que fijan nitrógeno en simbiosis con plantas. Sin embargo, en todas las

especies diazótroficas estudiadas el aparato enzimático es estrechamente similar y su estructura muy conservada (Ruvkun y Ausubel, 1980).

De enorme importancia desde el punto de vista agrícola y ecológico es la asociación endosimbiótica que establecen bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con diversas especies de plantas de la familia Leguminosae. Estos microorganismos inducen la formación de nódulos en las raíces de estas plantas (Postgate, 1987). Un nódulo es resultado de un complejo desarrollo, que involucra la expresión genética coordinada de ambos simbios, y entre los cuales se incluyen el reconocimiento de la leguminosa apropiada por la bacteria, la invasión de ésta a través de los pelos radiculares seguido de la formación de un hilo de infección, su entrada en las células corticales de la raíz, el desarrollo de una membrana peribacteroidal (MPB) sintetizada por la planta, y la diferenciación de las bacterias en bacteroides (Robertson y Farnden, 1980; Kondorosi y Kondorosi, 1986). Estos últimos, difieren morfológica (formas irregulares e hinchadas) y bioquímicamente (alta tasa de fijación de nitrógeno) de las células en vida libre (Robertson y Farnden, 1980).

La caracterización genética de *Rhizobium* muestra que la mayoría de los genes simbióticos, v.gr.: los genes de nodulación y de fijación de nitrógeno (genes nod y fix respectivamente), se encuentran localizados en plásmidos llamados simbióticos. Algunos de estos genes son inducidos por influencia de exudados de la planta, ricos en compuestos flavonoides (Zaat et al., 1988). De igual manera, se han identificado genes de la planta que codifican para diversas proteínas específicas de nódulo denominadas nodulinas (Sengupta-Gopalan et al., 1986; Campos et al., 1987). Ejemplo de ellas tenemos a la leghemoglobina (de la cual se hablara más adelante), la sacarosa sintetasa, la



glutamino sintetasa, la uricasa, etc.

**El problema de la sensibilidad a oxígeno de la nitrogenasa.**

Se conoce que el sistema enzimático nitrogenasa al contacto con oxígeno es inactivado rápida e irreversiblemente (Robson y Postgate, 1980; Gallon, 1981). Ambos componentes de la enzima pierden su actividad por la exposición a este gas, siendo la proteína Fe más sensible a la inhibición (vida media en el aire de 30-45 seg) que la proteína Mo-Fe:  $T_{1/2} = 10$  min (Gallon, 1981).

El oxígeno es agente causal de alteraciones en ciertas características espectrales de ambos componentes y al parecer la inactivación es resultado de la interacción entre dicho elemento y estados reducidos de estas proteínas.

Los organismos fijadores de nitrógeno (de vida libre o simbióticos), han desarrollado estrategias para evitar el daño por contacto con oxígeno a la nitrogenasa. Anaerobios estrictos como *Clostridium pasteurianum* prefieren medios ambientes permanentemente anaerobios. Las especies del género *Azotobacter*, diazótrofos aerobios, sin embargo, presentan recursos más elaborados como cambios conformacionales de la enzima y asociación con proteínas protectoras, mismos a los que ha denominado Protección Conformacional (Robson y Postgate, 1980).

*Azotobacter* presenta tasas de respiración mucho más elevadas que las encontradas entre otros microorganismos. Además, la fijación de nitrógeno en estas bacterias es más eficiente a bajas tensiones de oxígeno. La cadena respiratoria de *Azotobacter vinelandii* es muy activa y sus componentes incluyen a flavoenzimas NADH-dependientes y malato deshidrogenasas, hidrogenasa, ubiquinona-8 y los citocromos b-560, c<sub>4</sub>, c<sub>5</sub>, c-551, a<sub>1</sub>, d y o. La cadena se bifurca después de la ubiquinona y posee

tres oxidasas terminales (varios autores citados por McInerney et al., 1984).

En este microorganismo la cadena transportadora de electrones tiene por funciones: 1) Conservar la energía por fosforilación oxidativa, y 2) Proteger al sistema nitrogenasa de la inactivación por oxígeno manteniendo niveles en citoplasma innocuos de este elemento cercanos a cero. De esta manera, *A. vinelandii* ante altas tensiones de oxígeno puede incrementar su tasa de respiración al aumentar la actividad de la enzima NADH oxidasa y los niveles de citocromo d, regulando con ello la concentración de oxígeno y por ende, protegiendo de daño a la enzima. Este mecanismo se conoce como Protección respiratoria (Robson y Postgate, 1980; McInerney et al., 1984).

El sistema nitrogenasa presenta como producto obligado durante la reacción de fijación al hidrógeno molecular ( $H_2$ ). La reducción de iones hidrógeno a esta molécula implica un consumo enorme de ATP (Postgate, 1987). Los microorganismos diazótrofos de los grupos rhizobia, azotobacter y cianobacterias poseen una enzima de captura de hidrógeno molecular (hidrogenasa), la cual es responsable de oxidar al  $H_2$  y ofrecer los electrones resultantes a la cadena respiratoria. De esta forma, el ATP hidrolizado durante la evolución del hidrógeno (catalizado por la nitrogenasa), es recuperado y cantidades significativas de  $O_2$  se consumen (Dixon, 1972; Gallon, 1981; O'Brian y Maier, 1989).

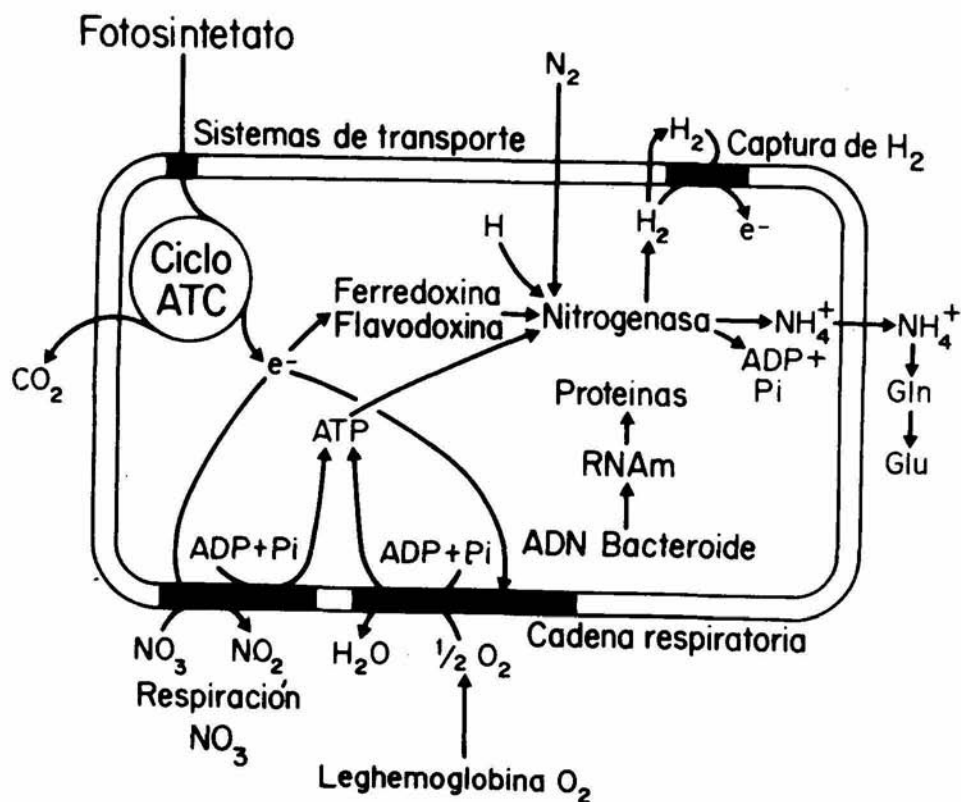
Los nódulos de las leguminosas presentan una concentración de oxígeno interna muy baja de aproximadamente 10-45 nM (O'Brian y Maier, 1989) debido en primer término, a que la corteza nodular representa una barrera física a la libre difusión de este gas, y segundo, al consumo de  $O_2$  que efectúan los bacteroides que tienen oxidasas terminales con altas afinidades por oxígeno. Existe en los nódulos además, una hemoproteína acarreadora de oxígeno

similar al pigmento hemoglobina de los mamíferos y que se conoce como leghemoglobina (Lb). Esta proteína tiene por función el transportar  $O_2$  a los bacteroides en cantidades suficientes para la producción de ATP en la cadena respiratoria y mantener a su vez, una concentración de  $O_2$  libre no tóxica (Wittenberg et al., 1974). Sin embargo, existe confusión respecto a la probable participación de la Lb en la protección de la nitrogenasa frente a altas tensiones de  $O_2$  (Appleby, 1984). La Lb es una nodulina resultado de la simbiosis, donde la apoproteína es producto de la planta y el grupo prostético hemo posiblemente de la bacteria (O'Brian y Maier, 1989).

### C. Bioenergetica de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso costoso desde el punto de vista energético. Se requieren de 16 a 30 moléculas de ATP para reducir una molécula de dinitrógeno a dos de amoníaco (O'Brian y Maier, 1989).

La energía en forma de ATP se obtiene fundamentalmente de la fosforilación oxidativa en las diversas especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (fig.2). Sin embargo, se desconoce con exactitud la clase de compuestos aportados por la planta huésped y que sostienen la alta demanda de equivalentes reductores de la reacción de fijación. Evidencia experimental basada en estudios de cinética de captura y transporte de compuestos orgánicos (Reibach y Streeter, 1984; San Francisco y Jacobson, 1985), marcaje de fotosintato (Reibach y Streeter, 1984), análisis de diversas fuentes de carbono que puedan sostener la respiración o la actividad de la nitrogenasa (Tuzimura y Meguro, 1960; Peterson y LaRue, 1981; Saroso et al., 1984), y la obtención de mutantes, sugiere que los ácidos dicarboxílicos succinato, fumarato y malato son los principales compuestos aportados a los \_\_\_\_\_



**Fig. 2.** Representación esquemática del bacteroide y de las relaciones existentes en el proceso de fijación de nitrógeno. La cadena respiratoria (parte central inferior de la figura) proporciona el ATP necesario para la actividad de la nitrogenasa (Tomado de Lim *et al.*, 1980).

bacteroides. La caracterización de mutantes deficientes en el empleo o transporte de los anteriores (mutantes dct) en *R. leguminosarum* (Finan et al., 1983; Arwas et al., 1985), *R. trifolii* (Ronson et al., 1981) y *R. meliloti* (Finan et al., 1988), muestra que forman nódulos no funcionales, esto es, incapaces de fijar nitrógeno. Recientemente se demostró la existencia de una poza importante de glutamato en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* y de su participación en el metabolismo respiratorio (Salminen y Streeter, 1987).

Los sistemas de transporte de electrones de *B. japonicum* (Appleby, 1969a,b; O'Brian y Maier, 1982, 1983; Keister et al., 1983), *R. trifolii* (De Hollander y Stouthamer, 1980), *R. leguminosarum* (Kretowich et al., 1973) y recientemente *R. phaseoli* (Soberón et al., 1989) han sido estudiados con diversa amplitud en células en vida libre o en su condición de bacteroides, siendo la primera la especie más atendida. Appleby (1969a,b) encontró en este microorganismo notables diferencias cuantitativas y cualitativas en la expresión de citocromos al comparar las células en vida libre con los bacteroides, mismas que se han interpretado como resultado del cambio de un metabolismo respiratorio de tipo aerobico a uno microaerobico.

Las células de *B. japonicum* en vida libre expresan una cadena ramificada con citocromos del tipo b y c y como oxidasas terminales los citocromos aa<sub>3</sub> y o. En vida simbiótica, el citocromo o y en algunas cepas el citocromo aa<sub>3</sub> están ausentes y en su lugar se expresan las hemoproteínas c-552, c-554, P-420, P-428, y P-450. Las anteriores integran por lo menos dos vías de transporte de electrones con diferentes eficiencias en la fosforilación oxidativa, y con oxidasas terminales de distintas afinidades por oxígeno: una vía o rama con una oxidasa de alta afinidad acoplada eficientemente a la síntesis de ATP, y otra rama con una oxidasa de baja o menor afinidad e ineficiente en la

fosforilación, pero que sin embargo, desempeña un papel de protección respiratoria similar al descrito para *Azotobacter* al mantener una baja concentración de oxígeno intracelular a expensas de electrones de alta energía (Appleby et al., 1975; Bergersen y Turner, 1975, 1980; O'Brian y Maier, 1989). Se ha demostrado además, la presencia de un componente que carece de grupo hemo y el cual tiene una alta actividad de citocromo c oxidasa. Este componente no reactivo a monóxido de carbono (CO), pero sensible a inhibidores como cianuro y atebrina, ha sido descrito como una flavoproteína y debido a su insensibilidad a CO y a su alta tasa de recambio, esta podría terminar la rama ineficiente del sistema respiratorio del bacteroide (Appleby, 1978, 1984; O'Brian y Maier, 1983).

Existe entonces una estrecha relación entre la respiración en *Rhizobium* y el proceso de fijación de dinitrógeno: mediante la fosforilación oxidativa se proporciona el ATP necesario para la reacción de fijación, en tanto que la transferencia de electrones a oxígeno puede participar como un mecanismo protector de la nitrogenasa al daño por contacto con O<sub>2</sub>. Esta interacción respiración bacteriana-fijación simbiótica de nitrógeno ha sido evidenciada aún más por el aislamiento de mutantes respiratorias que muestran diversos fenotipos simbióticos (El Mokadem y Keister, 1982; O'Brian et al., 1987; Soberón et al., 1989).

Lesiones en la cadena respiratoria pueden afectar también el desarrollo normal de los nódulos. En *R. meliloti*, se encontró que la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa es necesaria para la diferenciación normal de los bacteroides, así como de su mantenimiento y función. Una mutante de este microorganismo carente de la actividad de la enzima (mutante Sdh<sup>-</sup>) induce o forma nódulos no funcionales (fenotipo Fix<sup>-</sup>), diferenciación pobre aunada a una degeneración y lisis prematura de los bacteroides, y una tasa de consumo de O<sub>2</sub> de por lo menos tres

ordenes de magnitud menor que la de la cepa silvestre (Gardiol et al., 1982; 1987).

Soberón y cols. (1989) reportaron la composición de citocromos del sistema respiratorio de *Rhizobium phaseoli* en células en vida libre, consistente en citocromos del tipo b y c y de las oxidasas terminales aa<sub>3</sub> y o. Los mismos autores describen el aislamiento de dos mutantes respiratorias, una de las cuales (CFN4201) presenta niveles disminuidos de los citocromos b y c, así como de las actividades de las enzimas Ascorbato-TMPD, succinato y NADH oxidasas. Esta mutante induce nódulos no funcionales. La segunda (CFN4205) exhibe una merma en su contenido de citocromo o, pero muestra niveles de citocromo aa<sub>3</sub> y actividad de fijación de nitrógeno significativamente mayores que la cepa silvestre. La actividad de su enzima succinato oxidasa es mayor que la de la cepa madre, pero de valores similares en la ascorbato-TMPD y NADH oxidasas.

El conocimiento sobre el papel de la cadena respiratoria de *R. phaseoli* en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno es aún escaso. Resulta de interés, que al incrementar la eficiencia en la conservación de la energía y/o la simple actividad respiratoria pueda mejorarse la capacidad de fijación.

El presente trabajo tiene por objetivo correlacionar la capacidad respiratoria y la expresión del sistema respiratorio de *R. phaseoli* con su habilidad simbiótica de fijación de nitrógeno. La obtención de mutantes alteradas en la expresión de los diversos componentes del sistema transportadores de electrones permitiría entender la importancia de cada uno de ellos en el proceso mismo de la fijación. Aunado a lo anterior y con la finalidad de conocer el papel<sup>2</sup> de los citocromo oxidasas terminales en la vida libre y simbiótica de este microorganismo, se procedió a aislar y caracterizar una mutante respiratoria

deficiente en citocromo aa<sub>3</sub>. Esta presenta al compararsele con la cepa silvestre, una notable baja en la actividad de la ascorbato-TMPD oxidasa y además un fenotipo simbiótico no fijador de nitrógeno (Fix<sup>-</sup>).

La caracterización genética y bioquímica de esta mutante permitirá inferir la participación de las oxidasas terminales en la vida simbiótica de *R. phaseoli*. Debe señalarse que del conocimiento de la relación entre respiración y fijación de nitrógeno en *Rhizobium* y los mecanismos genéticos que lo determinan, podría llegarse a obtener cepas mutantes (útiles en el campo) con capacidades de fijación incrementada.



#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### 1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo se encuentran enlistados en la tabla 1. Las diferentes cepas de *Rhizobium phaseoli* se cultivaron a 30°C en medio completo PY (Peptone-yeast) que contuvo peptona de caseína al 0.5%, extracto de levadura al 0.3% y  $\text{CaCl}_2$  10 mM; o bien, en un medio mínimo que utilizó (gramos por litro):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.22;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.15;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.037; y sacarosa 1.0. Ambos medios fueron descritos por Noel et al., (1984).

*Escherichia coli* se cultivó a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) consistente en triptona al 1.0%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 0.5% (pH 7.2) (Maniatis et al., 1982).

Los medios fueron suplementados (de acuerdo a la cepa) con los antibióticos: kanamicina (Km), estreptomycin (Sm), rifampicina (Rif), y ácido náldixico (Nal), en una concentración final común de  $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Para medios sólidos se agregó agar-agar al 1.5%.

##### 2. Técnicas de cultivo.

Los cultivos se realizaron en un biofermentador (Centro de Instrumentos, UNAM) con 25 L de capacidad y ajustado a 30°C, flujo de aire de  $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  y agitación de 250 rpm. Un inóculo activo de 2 L de medio PY se usó para sembrar 20 L de medio.

El inóculo se preparó de la siguiente forma: 2 matraces con 200 ml de medio PY c/u, en presencia de los antibióticos

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos empleados.

Cepas o plásmidos	Característica relevante	Fuente o referencia
<b>Cepas</b>		
<i>Rhizobium phaseoli</i>		
CFN42	Tipo silvestre	Quinto et al., (1982)
CE3	Sm <sup>R</sup> derivada de CFN42	Noel et al., (1984)
CE2	Rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> derivada de CFN42	Noel et al., (1984)
IFC	Mutante aislada después de la transferencia de pSUP5011 a la cepa CE3	Presente trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	recA hsdR hasM Sm <sup>R</sup> pro leu	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
<b>Plásmidos</b>		
PJB3	R68.45 Km <sup>S</sup> Cm <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	Brewin et al., (1980)
pSUP5011	pBR325 Tn5- <u>mob</u> ( <u>mob</u> insertado en Tn5)	Simon et al., (1983)
pSUP205	Km <sup>R</sup> Tn-5	Simon et al., (1983)

adecuados (concentración final de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e inoculados con la cepa de *Rhizobium* deseada, fueron puestos como precultivos en un agitador orbital New Brunswick modelo G10 a 250 rpm por 24 h a  $30^\circ\text{C}$ . Al término, se transfirieron a matraces con 1.0 L del mismo medio y se colocaron bajo las mismas condiciones de agitación y tiempo. Los cultivos se siguieron espectrofotométricamente a 540 nm (espectrofotómetro Beckman modelo 35) y fueron observados al microscopio de contraste de fases. Las células se colectaron por centrifugación en una centrífuga Sharples modelo T1 (air turbine) de flujo continuo. Para el presente trabajo se utilizaron células en fase estacionaria temprana (aprox. 24 h después de iniciado el cultivo). Las células colectadas se lavaron en buffer TCM que contiene  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 7.4).

### 3. Preparación de membranas.

Cada lote de cultivo (entre 90 y 150 g de células en peso húmedo) se resuspendió en igual número de mililitros de amortiguador TCM y se rompió mecánicamente en un fraccionador celular Bead-Beater (Biospec Products) con perlas de vidrio de aprox. 0.1 mm de diámetro, mediante 10 pulsos de ruptura de 30 seg c/u con intervalos de descanso de 3 min entre ellos.

En el caso de volúmenes celulares pequeños (v.gr.: cultivos en matraz), la ruptura celular se obtuvo por sonicación en un Sonicador Branson modelo B-12 con 8 pulsos de la misma duración y descansos de 1 min. En ambos casos, la ruptura fue realizada en presencia de algunos cristales de Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) como inhibidor de proteasas y a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$  con el objeto de evitar una pérdida en la actividad de las enzimas asociadas a las membranas. Al término del proceso, el homogenado se incubó por 15 min a temperatura ambiente con unos pocos cristales de DNAasa (Sigma DN-25) con el fin de abatir la viscosidad.

Las células no fraccionadas fueron eliminadas por centrifugación a 10 000 rpm por 10 min. Los fragmentos de membrana en el sobrenadante se sedimentaron por ultracentrifugación a 40 000 rpm por 40 min y fueron lavadas 2 veces con buffer TCM bajo las mismas condiciones. Todas las operaciones se realizaron a 4°C. Las membranas resultantes fueron utilizadas inmediatamente o guardadas a -70°C sin merma en sus actividades hasta su uso.

#### 4. Mutagenésis y selección.

Una mutante respiratoria de *Rhizobium phaseoli* se obtuvo por inserción de Tn5-mob. Células de la cepa CE3 (vease tabla 1) fueron conjugadas con *E. coli* HB101-(pSUP5011::Tn5-mob) (Simon et al., 1983). La conjugación se realizó a 30°C, en placas de medio PY por 12 h. Al término, las células fueron resuspendidas en H<sub>2</sub>O destilada estéril y plaqueadas en medio selectivo (medio PY con rifampicina y Kanamicina a una concentración final de 30 µg·ml<sup>-1</sup> c/u).

Posteriormente las exconjugantes (Rif<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>) se transfirieron a placas de medio mínimo con succinato 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 10 mM como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Después de 5 días de crecimiento a 30°C, se aislaron aquellas mutantes con incapacidad de virar a la Tetrametilparafenilendiamina (TMPD), reactivo cuasiespecífico de la vía citocromo c → aa<sub>3</sub>. Una gota de una solución 8 mM de TMPD se añadió a cada colonia bacteriana en placa. Las células con citocomas funcionales viran este colorante del leuco al azul violeta en pocos segundos. La prueba es útil para detectar mutantes deficientes o con actividades disminuídas (TMPD-oxidasa) en citocromos c y/o aa<sub>3</sub>.

## 5. Purificación de ADN total.

A partir de un cultivo de 50 ml inoculado con la cepa mutante se colectaron las células por centrifugación a 7000 rpm por 5 min a 5°C. El paquete celular se resuspendió en 4 ml de buffer TE estéril (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y EDTA 20 mM) para centrifugarlo nuevamente en las condiciones anteriores. Al precipitado se le agregó y resuspendió en 4 ml del amortiguador, para luego añadir: 1) 0.5 ml de una solución del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% en buffer TE 50/20 como agente lisante. 2) 0.5 ml de solución de pronasa en una concentración de 2.0 mg·ml<sup>-1</sup> en buffer TE predigerida 1 h a 37°C, y 3) 0.5 ml de RNAasa al 0.1 mg·ml<sup>-1</sup>. La mezcla anterior se incubó a 37°C por 1 h hasta su lisis completa.

La extracción del ADN se llevo a cabo en presencia de fenol. Este alcohol aromático (insoluble en agua), provoca la disociación de las proteínas de los ácidos nucleicos en solución acuosa. Se usa además, en conjunción con cloroformo que mejora notablemente la extracción por su habilidad de desnaturalizar proteínas y de alcohol isoamílico que evita la formación de espuma (Perbal, 1984).

Al lisado anterior se agregó un volumen igual de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1 v/v/v) para posteriormente centrifugarlo a 7000 rpm por 10 min a 5°C. Todo el proceso emplea tubos Corex, limpios y estériles. Al finalizar la centrifugación se formó una fase inferior orgánica, densa, que corresponde a una fase fenolica y una fase menos densa, acuosa, que contiene al ácido nucléico. En la interfase se visualizó un floculado de color blanco que corresponde a las proteínas. La fase acuosa se removió por succión con la ayuda de una pipeta Pasteur, para agregarse con un igual volumen de la mezcla de extracción, y se lavó en las mismas condiciones de centrifugación

las veces necesarias hasta la desaparición del floculado en la interfase.

Al término del último lavado, se agregó a la fracción acuosa un volumen igual de cloroformo con el objeto de remover toda traza de fenol y se centrifugó a 7000 rpm por 5 min a 5°C.

El ADN fue precipitado al añadir NaCl 0.25 M y dos volúmenes de etanol al 100% frío, y manteniendo la mezcla a baja temperatura (-70°C) por dos horas. La sal del ac. nucleico se sedimentó entonces por centrifugación a 10 000 rpm por 30 min a 5°C. El precipitado del ácido formó un material fibroso de color blanco que se resuspendió y se lavó dos veces con etanol al 70% con la finalidad de remover las sales. Entre cada lavado, la muestra se centrifugó en las condiciones anteriores por 15 min.

Por último. el precipitado fue secado mediante una débil corriente de aire, se disolvió la pastilla en 400 µl de buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se guardó para su posterior uso a -20°C.

## 6. Hibridización Southern.

La metodología se fundamenta en la técnica descrita inicialmente por Southern (1975). El ADN genómico aislado, fue sometido para su análisis a una digestión enzimática con la endonucleasa de restricción EcoRI. La mezcla de reacción contenía: 5 µl de la solución de ADN, 5 µl de buffer E4 10x (preparación comercial de la marca Amersham), 3 µl de la enzima y agua (tridestilada de marca Dupont) a un volumen final de 50 µl. La anterior, se incubó por 48 hr a 37°C y la reacción se detuvo al colocarla 5 min a 65°C.

Los fragmentos de ADN, fueron separados en tamaños mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El patrón de digestión se observó al teñir el gel con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Los segmentos fueron desnaturalizados a cadena sencilla, por medio de un tratamiento ácido inicial del gel con solución de HCl 0.25 N por 15 min y posterior saturación con NaOH 0.5 M / NaCl 1 M por 45 min para provocar una desnaturalización alcalina de los segmentos. Finalmente, el gel se neutralizó en Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 / NaCl 1.5 M por el mismo tiempo. Entre cada cambio de solución, el gel se lavó con agua corriente.

La transferencia de los fragmentos de ADN del gel a un filtro de nitrocelulosa (Southern blot) se realizó de la siguiente forma: sobre una placa de vidrio colocada transversalmente encima de un refractario que contenía solución SSC 6x (NaCl 0.9 M / Citrato de sodio 0.09 M, ajustada a pH 7.0 con NaOH 10 N) fue depositada una tira de papel filtro Whatman 3MM (previamente saturada en la solución mencionada), a manera de que sus extremos quedaran inmersos en el líquido y sobre está, el gel con los fragmentos. Una pieza de papel de nitrocelulosa puesta con anterioridad en agua hirviendo por 10 min y equilibrada en la solución de transferencia, se colocó sobre el gel y se cubrió con un trozo de papel filtro Whatman, una capa de toallas de papel absorbente, una placa de vidrio y un peso para ejercer presión. La piramide de filtros y toallas se cubrió con papel Kleen-Pack para evitar la evaporación de la solución y se guardó por 18 hr a 5°C. Al término, se desmontó la estructura y el filtro de nitrocelulosa se secó al vacío durante 2 hr a 80°C.

Como detector de ADN específico se empleó al plásmido pSUP205, portador de la secuencia Tn5 y resistente a la kanamicina, el cual fue marcado con radioactividad mediante el

procedimiento comercial de incorporación de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP *in vitro* (nick-translation) diseñado por Amersham International Ltd.

El método consistió en agregar 1  $\mu$ l de la solución de ADN empleado como marcador, 10  $\mu$ l de solución de nucleótidos fría, 10  $\mu$ l de enzima, 50  $\mu$ ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP y agua (Dupont) a un volumen final de 50  $\mu$ l, e incubar la mezcla por 2 hr a 14°C. la solución de enzima y nucleótidos son preparados comerciales de la compañía mencionada. La reacción se detuvo al agregar 6.25  $\mu$ l de EDTA 0.25 M pH 8.0, e incubando 5 min a 65°C. El plásmido marcado fue separado de los desoxirribonucleótidos libres, mediante una cromatografía en columna con buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y SDS 0.01%.

Los filtros de nitrocelulosa se colocaron en bolsas de material plástico (Micro-Seal), y fueron prehibridizadas con 625  $\mu$ l/carril de una solución que contuvo: 50 mM de fosfato de sodio a pH 6.5, NaCl 3 M/Citrato de sodio 0.3 M a pH 7.0 ajustado con NaOH 10 N, ADN de timo de ternera desnaturalizado por calor a 250  $\mu$ g/ml aprox., y 1.0% de albumina de suero bovino (BSA), ficoll y polivinilpirrolidona c/u. La bolsa se sello con calor y se incubó por 2 Hr a 65°C. Posteriormente, fue desechado el líquido para agragar nuevamente la solución, empero al ADN se incorporó el plásmido marcado en un volumen necesario para tener  $1 \times 10^6$  cpm/carril. La bolsa se incubó a la temperatura anterior por 12 hr.

El filtro hibridizado se lavó con la solución SSC 2x (NaCl 0.3 M/Citrato de sodio 0.03 M)/0.1% SDS por 10 min a 65°C, posteriormente dos cambios en solución SSC 0.1x/0.1% SDS por 20 min cada uno a la misma temperatura y finalmente dos cambios en solución SSC 0.1x por 15 min a temperatura ambiente. El filtro fue expuesto a una placa de autoradiografía a -70°C por varios días hasta su revelado.



## 7. Actividades respiratorias.

Las actividades de oxidoreductasas y oxidasas fueron determinadas de acuerdo con lo expuesto por Escamilla y Benito (1984).

**Succinato deshidrogenasa.** El ensayo enzimático se realizó en 3 ml de mezcla que contenía succinato disódico 20 mM pH 7.0, fosfato de potasio 50 mM pH 8.0, metasulfato de fenazina 1.1 mM (PMS), diclorofenolindofenol 0.08 mM (DCPIP), KCN 0.1 mM y membranas (0.25 mg de proteína). La mezcla se preincubó por 5 min a temperatura ambiente antes de iniciar la reacción con la adición de los colorantes. La reducción del DCPIP se siguió por espectrofotometría a 600 nm. Una unidad de la actividad enzimática es equivalente a la reducción de 1 nmol de DCPIP por minuto. Se usó un coeficiente de extinción molar para el DCPIP de  $21 \text{ (mM cm)}^{-1}$ .

**NADH deshidrogenasa.** El ensayo se hizo bajo las condiciones anteriores, excepto que el succinato disódico y el PMS fueron reemplazados por NADH 0.5 mM (concentración final) y el pH del buffer de fosfatos fue de 7.6. La reacción se inició por la adición de DCPIP, y se empleó el mismo coeficiente de extinción molar antes mencionado.

**Succinato y NADH oxidasas.** Las actividades se determinaron por el método polarográfico, empleando un oxímetro Yellow Springs modelo 53. El procedimiento consiste en medir la tasa de consumo de oxígeno, por medio de un electrodo de platino-plata (electrodo de Clark) sensible a la presencia de este elemento (Estabrook, 1967).

El electrodo se calibró con soluciones amortiguadoras de concentración de oxígeno conocida. Para las condiciones de la Ciudad de México, 1 ml de mezcla de reacción a 30°C contiene 400 nano gramo átomos (o bien 200 nano moles) de oxígeno.

El ensayo se realizó a 30°C en 3 ml de medio de reacción conteniendo fosfato de potasio 50 mM pH 7.4 y membranas (1.5 mg de proteína). La reacción se inició con los sustratos NADH 0.5 mM o succinato disódico 20 mM después de preincubar por 3 min a la temperatura señalada. La actividad se expresa como  $\text{ngat O}_2$  ( $\text{min/mg de proteína}^{-1}$ ).

Citocromo c oxidasa (Ascorbato-TMPD oxidasa). La actividad se determinó empleando una mezcla de TMPD 0.1 mM y ascorbato de sodio 10 mM como sistema donador de electrones a nivel de citocromo c. El ensayo se efectuó por el método anterior, excepto que el pH de la solución amortiguadora fue de 6.8. A la actividad resultante se le corrigió el consumo de oxígeno que ocurre en ausencia de membranas por autooxidación de los sustratos.

#### 8. Curvas de inhibición.

Se determinó el efecto inhibitor del KCN en la actividad de las enzimas NADH y asc-TMPD oxidasas. El ensayo se realizó bajo las condiciones ya señaladas para cada enzima, excepto que la mezcla de reacción se incubó previamente con diferentes concentraciones del inhibidor antes de iniciar la reacción con la adición del sustrato. El KCN se preparó en amortiguador de fosfatos 0.1 M a el pH empleado para cada enzima.

## 9. Análisis espectral de citocromos.

Las membranas y células enteras se resuspendieron en una solución de amortiguador TCM y glicerol 1:1 v/v a una concentración final de alrededor de 10 mg de proteína  $\text{ml}^{-1}$  y se analizaron en un espectrofotometro Aminco Dw-2a. Los espectros de absorción se registraron o bien a temperatura ambiente empleando celdas de 1.0 cm de paso de luz, o a baja temperatura (77K) con la ayuda de celdas de 2.0 mm de paso. La celda de referencia se oxidó completamente al agregarse unos pocos cristales de persulfato de amonio, mientras que la muestra se redujo con una cantidad similar de hidrosulfito de sodio (ditionita). En algunos espectros se utilizaron como agentes reductores, además de la ditionita, a NADH 5.0 mM o ascorbato 10 mM + TMPD 0.1 mM. La congelación de las preparaciones membranales (o inclusive células enteras) en nitrógeno líquido (77K), obedece al hecho de que la sensibilidad y la resolución del espectro diferencial se incrementan al medirse a bajas temperaturas (Jones, 1988). Sin embargo, una desviación o corrimiento de la longitud de onda máxima para cada citocromo a un valor ligeramente menor suele ocurrir como resultado del tratamiento.

Con relación a los citocromos reactivos a monóxido de carbono (CO), se realizaron espectros diferenciales en los cuales ambas celdas fueron reducidas con ditionita, y la muestra además burbujeada con una corriente controlada de CO por 3 min. La concentración de Tris-HCl pH 7.4 en el buffer TCM para los espectros anteriores fue de 1.0 M con el objeto de evitar la acidificación originada en la reacción de ácido sulfúrico con formiato de sodio para producir CO. En esta reacción, se genera también ácido fórmico que gasifica y el cual contribuye a disminuir el pH.

La concentración de citocromos se estimó a partir de los espectros diferenciales (ditionita reducido menos persulfato de amonio oxidado o bien ditionita-CO menos ditionita reducido) realizados a temperatura ambiente y empleando los siguientes pares de longitud de onda y coeficientes de extinción molar: citocromo aa<sub>3</sub>, coeficiente de extinción molar de 603 a 630 nm, E(603-630)= 24 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; cit b, E(560-575)= 22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; cit c, E(554-544)= 23 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; y cit o-CO, E(415-430)= 160 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Soberón et al., 1989).

#### 10. Pruebas de nodulación y actividad de fijación de nitrógeno.

Las cepas mutante y silvestre de *R. phaseoli* fueron examinadas en sus fenotipos simbióticos mediante su inoculación a plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa. Para ello, semillas de la planta mencionada fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio al 5.0% por 20 min, lavadas perfectamente con H<sub>2</sub>O destilada estéril, y puestas para su germinación sobre papel filtro húmedo en charolas o refractarios envueltos con papel estaño por 72 h a una temperatura constante de 25°C. Al término, las plántulas se transfirieron a recipientes que contenían vermiculita, donde fueron inoculadas al momento con 1 ml de la suspensión de *Rhizobium* deseada (densidad de 10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup>). Plantas control no fueron inoculadas. Las charolas con el papel filtro y las macetas con vermiculita fueron esterilizadas en autoclave.

Las plantas control e inoculadas se mantuvieron en un invernadero (Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, Mor.) y fueron regadas con soluciones de sales libres de nitrógeno (Wacek y Brill, 1976). Durante su crecimiento

se observó la presencia o ausencia de nódulos, así como los síntomas visuales por la carencia de nitrógeno señal de una simbiosis inefectiva.

La actividad de la enzima nitrógenasa se determinó mediante la prueba de reducción de acetileno. Las porciones radiculares de las plantas fueron seccionadas y colocadas en tubos o frascos viales con tapones de goma herméticos en donde se les inyectó gas acetileno a una concentración del 10% de la fase gaseosa. Después de 20 y 40 min se cuantificó la producción de etileno por medio de un cromatógrafo de gases Varian modelo 3300.

El contenido de nitrógeno total de tallos y hojas (previamente secas y pulverizadas) se estimó mediante un detector de nitrógeno Antek modelo 720, el cual se basa en el sistema de nitrógeno quimioluminiscente (SNQ). Este consiste en oxidar completamente una muestra que contiene nitrógeno a alta temperatura (1100°C) a óxido nítrico (NO), el cual al contacto con ozono produce dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>). Este compuesto al descomponerse "quimioluminesce" y la emisión de luz que produce es proporcional a la cantidad de nitrógeno presente en la muestra.

## 11. Histología.

Nódulos frescos fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 3.0% en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.2) por un tiempo de 2 h y lavados mediante tres cambios de medio de lavado que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M (pH 7.4)/sacarosa 0.25 M en 24 h. El tejido fue postfijado en tetróxido de osmio al 2.0% disuelto en el buffer de fosfatos anterior y lavado bajo las mismas condiciones.

El material se deshidrató mediante cambios de alcohol etílico en concentraciones crecientes del 30 al 100% efectuando dos cambios de 15 min en cada una de las concentraciones. Todo el proceso se realizó a 4°C, excepto a partir del segundo cambio en alcohol absoluto que se efectuó a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se sometió a dos cambios de 15 min c/u en óxido de propileno. Los nódulos se infiltraron en resina Epon/óxido de propileno (1:1 v/v) en un desecador por 24 h, y se incluyeron en Epon (fresca) para su polimerización por 48 hr a 60°C.

Las piezas fueron cortadas mediante un microtomo Ultracut Richter en cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  y secciones de 90 nm. Los cortes semifinos se contrastaron con azul de toluidina-fucsina básica o bien azul de metileno-fucsina y se observaron en un microscopio óptico Leitz Dialux 20.

Los cortes para microscopía electrónica se depositaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo (30 min) y citrato de plomo (10 min) según Reynolds (1963). Las piezas se observaron en un microscopio de transmisión Jeol 100 B.

## **12. Determinación de proteína.**

El contenido de proteína se determinó mediante el método de Markwell et al., (1981), cuyo procedimiento se basa en el método modificado de Lowry (Markwell, et al., 1978). Par cada lote de membranas se cuantificó la concentración de proteína usando a albumina de suero bovino (BSA) como estandar.

### 13. Químicos y reactivos.

Todos los químicos y reactivos empleados en el presente trabajo fueron de grado reactivo analizado. Los antibióticos, el extracto de levadura y la peptona de caseína, así como los reactivos TMPD, PMS, DCPIP, BSA y DNAasa DN-25 se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Se usaron además reactivos de las marcas Bioxon, Baker, Merck, y Bio-Rad. El [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y el Nick Translation Kit se consiguió de Amersham International plc. El papel filtro de nitrocelulosa fue de Schleicher & Schuell, Inc., Keene, N.H.

## V. RESULTADOS

Aislamiento de una mutante respiratoria de *R. phaseoli* deficiente en citocromo aa<sub>3</sub>. El conocimiento de la interacción existente entre la respiración bacteriana y el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, ha sido posible mediante el aislamiento y caracterización de mutantes alteradas en la expresión y/o regulación de su sistema respiratorio. En el presente trabajo, la cepa CE3 derivada de la CFN42 de *Rhizobium phaseoli* (ver tabla 1), fue la cepa madre de la cual se obtuvo una mutante respiratoria deficiente en citocromo aa<sub>3</sub> (mutante IFC) por inserción del transposón Tn5-mob.

El plásmido pSUP5011 fue el vector mediante el cual el transposón se introdujo en el genoma de CE3 según la metodología propuesta por Simon et al., (1983). Esta estrategia de mutagénesis emplea a una cepa donadora de *E. coli* portadora de un plásmido "suicida", es decir, de un vector con la habilidad de ser movilizado con alta frecuencia a cepas receptoras, pero incapaz de replicarse fuera de cepas del grupo entérico (Simon et al., 1983; Selvaraj e Iyer, 1983), El plásmido contiene al transposón y lleva un sitio de reconocimiento específico tipo-P para la movilización: sitio mob (Simon et al., 1983).

Los transposones representan secuencias específicas de ADN incapaces de autoreplicación y que pueden insertarse de una manera más o menos azarosa en replicones de ADN como plásmidos y/o cromosomas. La inserción de un transposón en un gene, puede ocasionar la pérdida completa de su función génica. A lo anterior, debe mencionarse que estos elementos genéticos móviles ofrecen una característica valiosa al poseer genes que participan no solo en la inserción, sino de aquellos que confieren nuevos fenotipos a la célula huésped, v.gr.: codificar proteínas que



ofrecen resistencia a antibióticos (Beringer et al., 1978).

El transposón Tn5 puede ser monitoreado gracias a su resistencia a la kanamicina (Km), y ha sido empleado en la obtención de diversas mutantes en especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Beringer et al., 1978; Buchanan-Wollaston et al., 1980; Meade et al., 1982; Noel et al., 1984; Hom et al., 1984).

De un total de 5000 colonias mutagenizadas con Tn5-mob se aisló una cepa (IFC) incapaz de virar de color a la Tetrametilparafenilendiamina (fenotipo TMPD<sup>-</sup>). Este reactivo en su estado reducido cede electrones a nivel de citocromo c virando del leuco al azul. Aquellas colonias incapaces del viraje, son potenciales mutantes deficientes en citocromo c y/o aa<sub>3</sub>.

**Caracterización genética de mutante IFC.** Con la finalidad de conocer el número de inserciones del transposón (en caso de resultar múltiples resultaría difícil precisar cual de ellas es responsable del fenotipo mencionado), se aisló el ADN genómico del microorganismo y se hibridizó contra secuencias que contenían al Tn5 (vease hibridización Southern en materiales y métodos). El ADN obtenido se digirió con EcoRI (enzima que respeta las secuencias del transposón), sus fragmentos separados en geles de agarosa e hibridizados contra el plásmido pSUP205 como detector específico. Al final del experimento la placa de autoradiografía mostró una sola banda que corresponde a una única inserción (ver figura 3). La banda de hibridización tuvo un peso aproximado de 11 Kpb (el transposón Tn5 pesa aprox. 5.4 Kpb).

Se comprobó que la mutación estaba ligada al fenotipo TMPD<sup>-</sup> al conjugar la cepa mutante (Km<sup>R</sup>) portadora del transposón con una cepa receptora sana (CE2 Rif<sup>R</sup>, Sm<sup>S</sup>), encontrando en las transconjugantes (Km<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>, Sm<sup>S</sup>), nuevamente el fenotipo TMPD<sup>-</sup>.



Fig. 3. Análisis por Hibridización Southern del ADN genómico total de la cepa IFC. El detector empleado fue el plásmido pSUP205 portador de Tn5 y marcado con radioactividad como se describe en materiales y métodos. Línea 1, 3: *Lambda* con HINDIII; Línea 2: Mutante IFC tratada con EcoRI.

Con antelación, la cepa mutante se conjugó con células de *E. coli* HB101/PJB3, debido a que el plásmido PJB3 contiene las funciones necesarias para movilizar las secuencias mob presentes en el transposón. Posteriormente la cepa IFC/PJB3 fue conjugada con la cepa silvestre mencionada (fig. 4). Las transconjugantes fueron plaqueadas en medio mínimo en donde a cada colonia bacteriana se le aplicó la prueba del TMPD. De un 90 a 100% de las mismas presentaron fenotipo TMPD<sup>-</sup>.

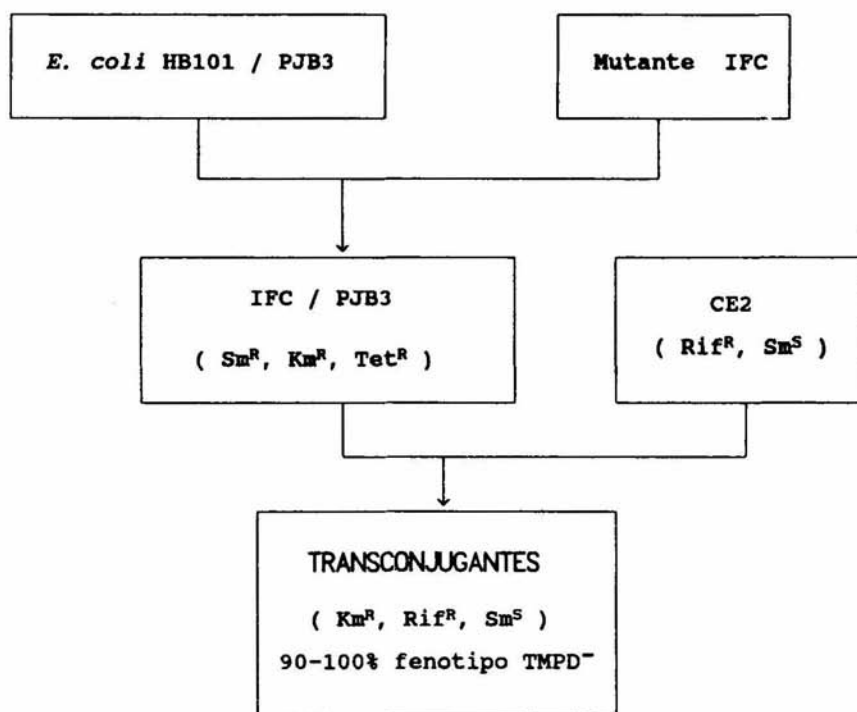


Fig. 4. Análisis de transconjugantes. En la parte superior se muestran las cepas madre de las cuales se obtuvo IFC/PJB3. Esta fue conjugada con la cepa silvestre CE2 con el objeto de generar transconjugantes portadores del fenotipo TMPD<sup>-</sup>.

**Actividades respiratorias.** Se compararon las actividades enzimáticas de oxidoreductasas y oxidasas en preparaciones membranales de células de las cepas CE2 (silvestre) y mutante IFC con el propósito de determinar los probables efectos de la mutación en sus capacidades respiratorias. Las células se colectaron en fase estacionaria temprana (aprox. 24 h después de iniciado el cultivo bajo las condiciones empleadas) y se rompieron mecánicamente (Fraccionador celular Bead-Beater) mediante el choque violento con perlas de vidrio. La actividad de oxidoreductasas de NADH y succinato se midió espectrofotométricamente gracias al cambio de color que experimenta el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) al ser reducido por dichas enzimas presentes en la membrana. Por su parte, la actividad de las enzimas oxidasas se cuantificó por el método polarográfico empleando a los sustratos NADH, succinato y ascorbato-TMPD. Los valores se muestran en la tabla 2.

Las membranas de células IFC mostraron una notable disminución en la actividad de la enzima ascorbato-TMPD oxidasa: 7 a 8 veces menor al compararlas con la cepa silvestre. Este resultado fue constante en todos los lotes de cultivo realizados. La mezcla de ascorbato de sodio y TMPD participa como un sistema donador de electrones a nivel del citocromo c, siendo su oxidación indicativa de la actividad de citocromo c oxidasa. Por otro lado, las actividades de la NADH y succinato oxidasas en la cepa mutante resultaron dos y tres veces mayor respectivamente que en la cepa CE2. Lo anterior, sugiere que la disminución en la actividad de citocromo c oxidasa terminal en el mutante IFC es compensada con el incremento de otra u otras oxidasas terminales que no usan ferrocitocromo c como sustrato. (ver tabla 2).

Al examinar la actividad de las oxidoreductasas, se observó que la NADH deshidrogenasa de la cepa IFC presentó una actividad de aproximadamente el doble de aquella de la cepa silvestre. Sin

Tabla 2. Actividades respiratorias presentes en membranas de *Rhizobium phaseoli* de las cepas CE2 e IFC.<sup>1</sup>

Enzima	Actividad específica	
	CE2	IFC
<b>Oxidoreductasas</b>		
NADH	123	250
Succinato	365	140
<b>Oxidasas</b>		
NADH	115	200
Succinato	43	109
Ascorbato-TMPD	214	30

<sup>1</sup> Membranas de células de fase estacionaria temprana cultivadas en medio PY en condiciones de aereación y agitación vigorosa. Su preparación se describe en materiales y métodos.

<sup>2</sup> Actividad específica para oxidoreductasas expresada en nmol de DCPIP reducido por min por mg de proteína y en ng atom O<sub>2</sub> por min por mg de proteína para oxidasas.

embargo, su actividad de la succinato deshidrogenasa fue menor que en la cepa CE2 (ver tabla 2). El significado fisiológico de estos cambios no es claro pero en todas formas, la disponibilidad de los sustratos NADH y succinato y del aceptor final:  $O_2$ , son los factores limitantes a la velocidad de respiración. Sólo cambios cuantitativos mayores en los niveles enzimáticos se espera que afecten la eficiencia del sistema respiratorio, tal y como se observó en el caso de la disminución de casi 10 veces en la actividad de citocromo c oxidasa (TMPD).

**Análisis espectral.** La composición de citocromos presentes en las fracciones membranales de las células silvestres y mutantes fueron comparadas por espectros diferenciales ditionita-reducido menos persulfato de amonio-oxidado a 77K (fig. 5). Las membranas correspondieron a células estacionarias tempranas cultivadas en medio PY y con alta aereación.

La cepa silvestre de *R. phaseoli* muestra las señales de los citocromos b (picos máximos de absorción a 429 y 557 nm), c (hombro pequeño a 550 nm) y de la citocromo oxidasa  $aa_3$  (hombro a 443 nm y pico a 603 nm). Este trazo (figura 5A) es acorde con los resultados obtenidos por Soberón y cols. (1989). Por su parte, el espectro de la cepa mutante presenta una pequeña señal a 603 nm, región de absorción máxima para el citocromo  $aa_3$ . Un hombro a 443 nm es pequeño o ausente (ver figura 5B). En su estado reducido, esta oxidasa terminal exhibe bandas de absorción en las regiones de 440-445 y 600-605 nm (Poole, 1983).

La figura 6 muestra el espectro diferencial ascorbato-TMPD-reducido menos persulfato-oxidado a temperatura ambiente que se obtuvo con membranas de la cepa mutante. En este trazo se aprecia un pico bien definido a 429 nm, y dos más pequeños a 556 y 564 nm que podrían ser atribuidos a citocromos tipo b. Se observa sólo rastros del citocromo  $aa_3$  a 443 o 603 nm.

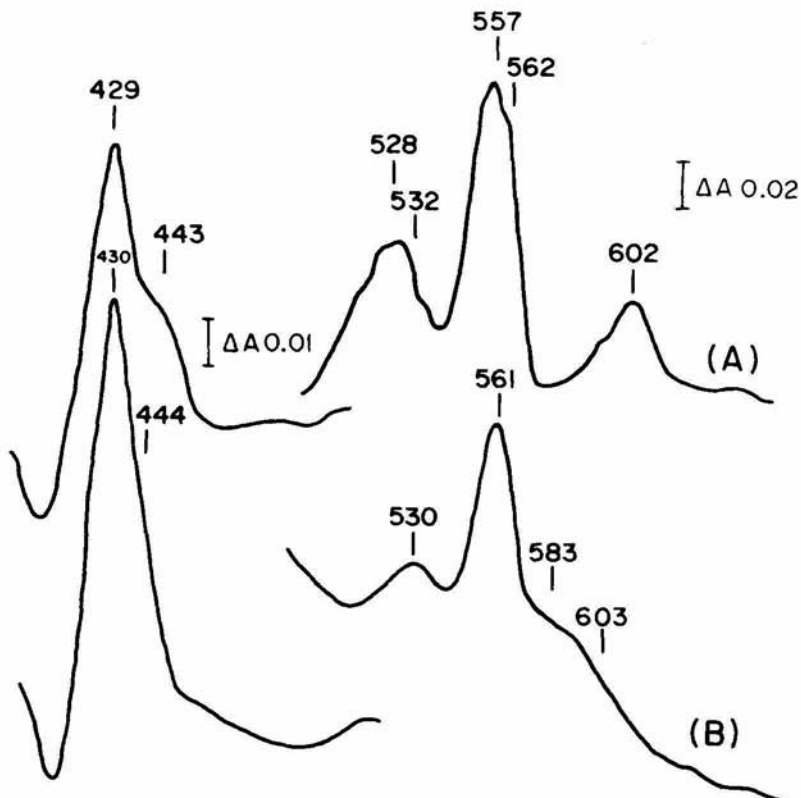


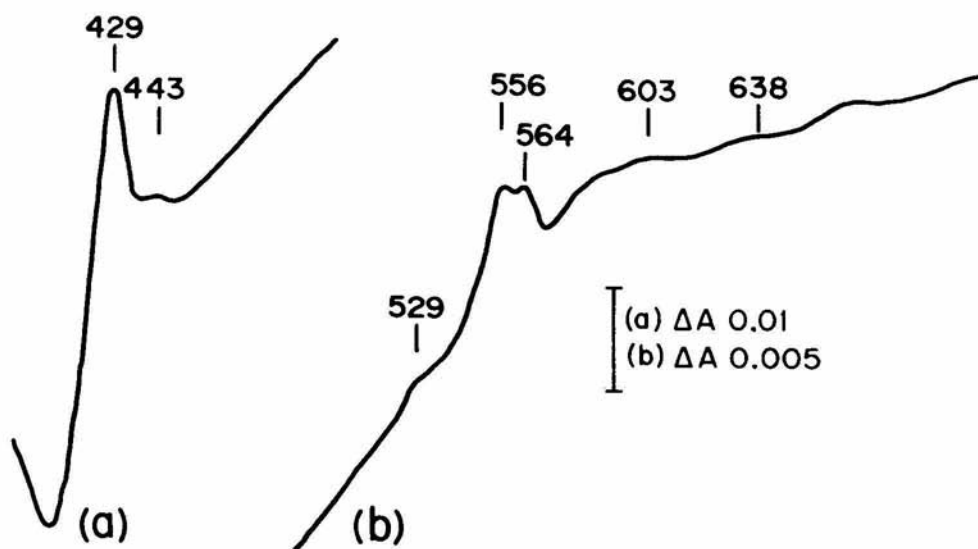
Fig. 5. Espectros diferenciales (ditionita-reducido menos persulfato-oxidado) registrados a 77K en membranas de células cultivadas de *R. phaseoli*. (A) Cepa CE2 (5.4 mg de proteína ml<sup>-1</sup>); (B) Cepa IFC (5.6 mg de proteína ml<sup>-1</sup>).

Los citocromo oxidasas en su estado reducido reaccionan con monóxido de carbono para formar complejos fotodisociables (citocromo<sub>red</sub>-CO), los cuales exhiben espectros particulares de absorción (Jones y Poole, 1985). La diferencia en absorbancia entre dos muestras reducidas (membranas o células enteras), una de las cuales ha sido burbujeada con una corriente controlada de CO por algunos minutos (ver materiales y métodos) es registrada, y el espectro resultante proporciona información valiosa sobre la presencia de los citocromo oxidasas.

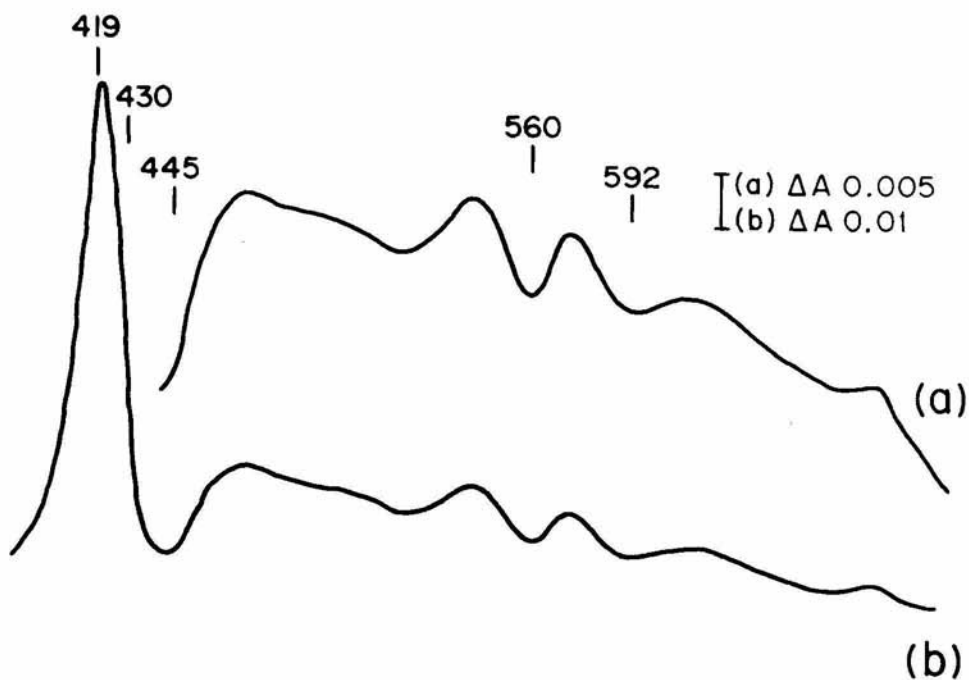
En la figura 7 se puede apreciar el espectro diferencial ditionita-reducido + CO menos ditionita-reducido que se obtuvo con membranas de la cepa mutante a temperatura ambiente. En este se observa claramente un pico de absorción alrededor de 419 nm y un valle a 560 nm que corresponderían a un citocromo tipo o (Poole, 1983). Sin embargo, no se registran señales significativas del citocromo aa<sub>3</sub> (picos a 430 y 592 nm), excepto un valle a 445 nm que define también a esta oxidasa. Este resultado está de acuerdo con lo observado en los espectros reducido menos oxidado (figs. 5 y 6).

El contenido de citocromos presente en las preparaciones membranales de las células silvestres y mutantes fueron calculadas y comparadas a partir de espectros diferenciales (ditionita-reducido menos persulfato oxidado y ditionita + CO menos ditionita-reducido) efectuados a temperatura ambiente. (ver tabla 3). Estas estimaciones no son exactas debido a que los citocromos de tipo b y c presentan una sobreposición en sus señales de absorción, más no obstante, son índices "groseros" que nos dan una aproximación de los valores reales. Destaca a primera vista, una significativa disminución en la expresión de todos los citocromos presentes en la cepa mutante. En especial, los contenidos de los citocromos aa<sub>3</sub> y c se encuentran ocho veces abajo de aquellos de la cepa silvestre. La proporción que guardan





**Fig. 6.** Espectro diferencial (ascorbato-TMPD reducido menos persulfato-oxidado) registrados a temperatura ambiente en preparaciones membranales de la cepa IFC (5.6 mg de proteína  $\text{ml}^{-1}$ ).



**Fig. 7. Espectro diferencial (ditionita-reducido + CO menos ditionita-reducido) registrado a temperatura ambiente con fracciones membranales de la cepa IFC (5.6 mg de proteína ml<sup>-1</sup>)**

**Tabla 3. Concentración de citocromos en preparaciones membranales de membranas de cepas de *R. phaseoli*.<sup>1</sup>**

<b>C E P A</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>aa<sub>3</sub></b>	<b>o-CO</b>
CE2	0.47	0.33	0.17	0.04
IFC	0.25	0.02	0.02	0.02
CE2/IFC	1.88	1.57	8.5	2.0
-----				
		<b>aa<sub>3</sub>/b</b>	<b>aa<sub>3</sub>/c</b>	
CE2		0.36	0.52	
IFC		0.08	0.1	

<sup>1</sup> Concentraciones en nmol por mg de proteína.

los niveles de citocromo aa<sub>3</sub> respecto a los citocromos tipo b y c, siempre resultó bastante mayor en la cepa silvestre que en la mutante. Podemos asegurar que el fenotipo TMPD<sup>-</sup> mostrado por la cepa IFC, es debido a la fuerte disminución en el contenido de los citocromos aa<sub>3</sub> y c.

**Efecto del cianuro sobre la actividad de la NADH y ascorbato-TMPD oxidasas.** El cianuro es un poderoso inhibidor de la transferencia de electrones del citocromo aa<sub>3</sub> al oxígeno. La transferencia de electrones del citocromo o hacia el O<sub>2</sub> es bastante menos sensible al KCN (Escamilla y Benito, 1984). Para conocer los posibles flujos o aportes de electrones en el sistema, se estudió el efecto del KCN sobre la actividad de las enzimas NADH y ascorbato-TMPD oxidasas de preparaciones membranales de las cepas CE3 e IFC. Las membranas se obtuvieron de células crecidas aerobíicamente en medio PY bajo las condiciones ya señaladas. Con relación al ensayo, esté guardo las características iniciales excepto que la enzima era preincubada con el inhibidor antes de agregar el sustrato.

En las figuras 8A,B,C,D, se muestran las curvas de inhibición de las actividades analizadas. Como se puede observar, la inhibición de la actividad de la NADH oxidasa en la cepa silvestre fue a KCN 0.2 μM de un 60% aproximadamente, sólo 20% para la ascorbato-TMPD oxidasa en esta misma concentración (ver figura 8A), y de 50% cuando el inhibidor se encontraba a 1.0 μM (fig. 8D). A diferencia de la anterior, la oxidación del NADH en la cepa mutante se inhibió un 20% por KCN 0.2 μM, un porcentaje semejante para la citocromo oxidasa (fig. 8B) y de 60% a 1.0 μM de cianuro. En la figura 8C se comparan las curvas de inhibición de la NADH oxidasa entre ambas cepas, pudiendo observarse una mayor inhibición en la cepa silvestre: a KCN 1.0 μM, el 70% de la actividad fué inhibida a diferencia del 30% de la cepa IFC.

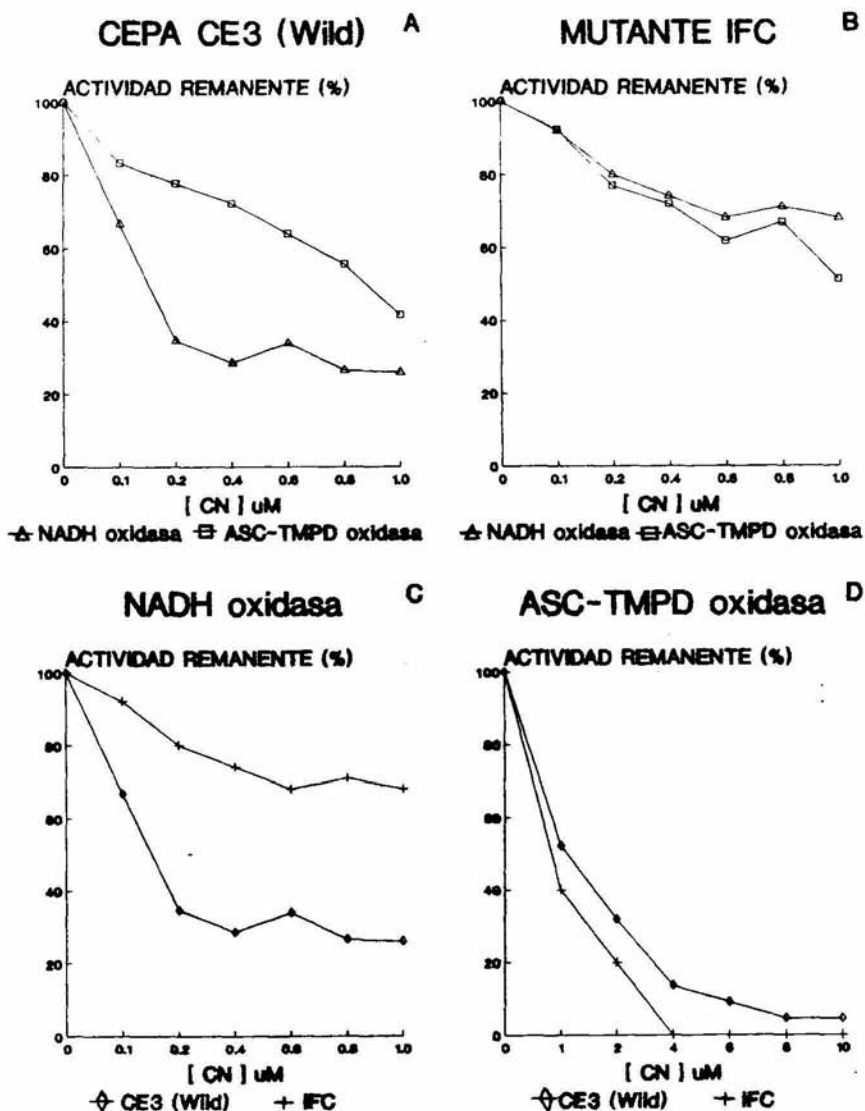


Fig. 8. Efecto del cianuro sobre la actividad de la NADH (▲) y ascorbato-TMPD (□) oxidasas de membranas de células cultivadas de *R. phaseoli* de las cepas CE3 (◇) e IFC (+). Las membranas (4.5 y 6.5 mg de proteína para CE3 e IFC respectivamente) fueron preincubadas (3 min a 30°C) con las concentraciones de KCN señaladas. La reacción se inició con la adición del sustrato. (ver materiales y métodos). Actividad expresada en  $\text{ngat O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Además en esta última, el decaimiento de la actividad a medida que aumenta la concentración de cianuro es paulatina y en forma casi lineal. La inhibición de la ascorbato-TMPD oxidasa para ambas cepas es practicamente la misma (fig. 8D), sorprendentemente baja si se considera que el ascorbato-TMPD alimenta cuasiespecificamente a la citocromo c oxidasa. Así, hemos de pensar que una segunda oxidasa poco sensible al KCN es capaz de oxidar ascorbato-TMPD en *R. phaseoli*.

**Propiedades simbióticas de mutante IFC.** Debido a nuestro interés de conocer las posibles relaciones entre la respiración bacteriana y la fijación simbiótica de nitrógeno, con fines comparativos se inocularon plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. negro jamapa con la cepa mutante así como con la cepa silvestre. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero y fueron regadas con soluciones de sales libres de nitrógeno (ver materiales y métodos). Al cabo de 21 días, las plantas inoculadas con la cepa mutante deficiente en citocromo  $aa_3$  mostraron un fenotipo no fijador de nitrógeno (fenotipo  $Fix^-$ ), como queda evidenciado por una merma en su tamaño y el color verde amarillento de sus hojas (ver figura 9). Este comportamiento se observó incluso hasta después de los 35 días de ser inoculadas.

La actividad de la nitrogenasa se estimó mediante la técnica de reducción de acetileno. Esta consistió en colocar las porciones radiculares de las plantas en tubos viales herméticos e inyectar a los mismos acetileno. Al cabo de un cierto tiempo, la producción de etileno, resultado de la actividad de la enzima, se cuantificó por cromatografía de gases (ver metodología). Como se muestra en la tabla 4, la actividad de reducción de acetileno (ARA) en las porciones radiculares de las plantas inoculadas con la cepa mutante, fue a los 35 días de crecimiento de sólo 5.0% de la actividad de la cepa CE2. A los 21 días de inoculadas, no se



Fig. 9. Plantas de *Phaseolus vulgaris* con *R. Phaseoli* CE2 (silvestre) y mutante IFC. La fotografía corresponde a 21 días de crecimiento en las condiciones mencionadas en materiales y métodos.

detectó actividad en las mismas. Debe señalarse que esta determinación representa un valor puntual expresado el día en que se llevo a cabo el experimento. Soberón y cols. (1989) encontraron en plantas inoculadas con la cepa CE2 la mayor ARA entre los 19 y 21 días de crecimiento. La prueba de reducción de acetileno es un parámetro confiable de la actividad de la nitrogenasa y por ende de la actividad de fijación de nitrógeno.

Con relación al contenido de nitrógeno total en tallos y hojas (ver tabla 4), las plantas inoculadas con la mutante IFC presentaron después de 35 días, un poco menos de la mitad de la cantidad de nitrógeno que aquellas inoculadas con la cepa silvestre. Los contenidos se expresan en mg de nitrógeno por 100 mg de tallos y hojas secas. El método empleado de nitrógeno quimioluminiscente es un sistema novedoso que supera a los Kjendahl tradicionales en rapidez y exactitud. Bajo esta técnica, se elaboró una curva patrón con muestras de nitrógeno conocidas y posteriormente se obtuvieron los valores de las muestras problema.

El examen minucioso de las raíces de las plantas inoculadas con las cepas silvestre y mutante mostró la presencia de nódulos fijadores de nitrógeno a diferencia de las plantas control no inóculadas que carecieron de ellos. Los nódulos inducidos por las cepas CE2 o CE3 fueron de color rosado (indicativo de la presencia de la leghemoglobina), bien diferenciados y de mayor tamaño que los de la cepa IFC, blanquecinos y poco diferenciados. Cabe mencionar, que estos últimos no se encontraban vacíos como se demostrará más adelante.

La histología a microscopía óptica reveló en los nódulos inducidos por las cepas silvestre un mayor número de células vegetales infectadas, así como de la cantidad de bacteroides en ellas contenido en comparación con la cepa IFC (ver figuras 10 y



Tabla 4. Actividad de fijación de nitrógeno de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con diferentes cepas de *R. Phaseoli* (35 días de crecimiento).

---

C E P A	ARA <sup>1</sup>	Nitrógeno total <sup>2</sup>
CE2	100	2.61
IFC	5	1.14

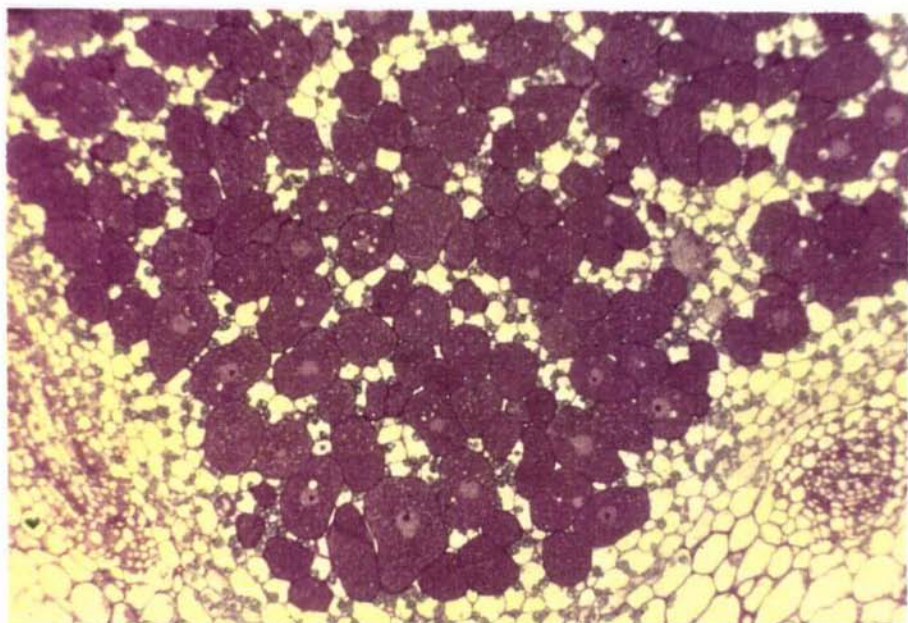
---

<sup>1</sup> Actividad de reducción de acetileno. Actividad expresada como porcentaje de actividad en cepa silvestre.

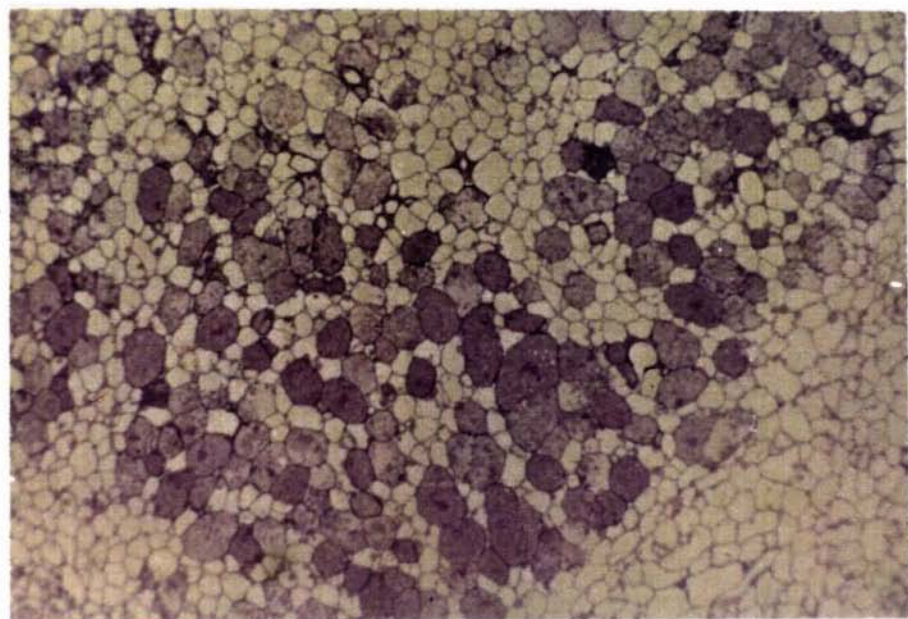
<sup>2</sup> mg de nitrógeno por 100 mg de tallos y hojas.

11). Las observaciones se realizaron en nódulos de plantas después de 21 y 35 días de inoculadas. El estudio del tejido bajo el microscopio electrónico mostraba para ambas cepas bacteroides de forma ovoide o irregular, con depositos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato y en un número de hasta 12-25 bacteroides envueltos por la membrana peribacteroidal (ver figura 12). Sin embargo, a 35 días de crecimiento, el número de bacteroides contenidos en la membrana resultó mayor (10-22) en la cepa CE3, al tiempo que en la mutante IFC la MPB comenzaba a lisarse y como consecuencia liberar a los bacteroides. (vease figura 13).

Curso temporal de expresión de citocromo  $aa_3$ . La expresión de citocromo  $aa_3$  durante todo el desarrollo de un cultivo de la mutante IFC fué estudiada. Lo anterior, con el objeto de conocer una posible expresión diferencial de esta oxidasa terminal en las distintas etapas de crecimiento del microorganismo. Los espectros diferenciales ditionita-reducido menos persulfato-oxidado que se obtuvieron con muestras de células enteras a distintas etapas de cultivo se muestran en la figura 14 (cepa silvestre) y 15 (Cepa IFC) Estos resultados señalan en la cepa IFC una sorprendente expresión del citocromo  $aa_3$  durante las primeras etapas que corresponden a la fase lag y exponencial temprana. A medida que avanza el desarrollo del cultivo, la expresión disminuye. Cabe destacar, que en la parte media o cercana al final de la fase estacionaria, fueron realizados los espectros presentados anteriormente en éste trabajo (fig. 15).

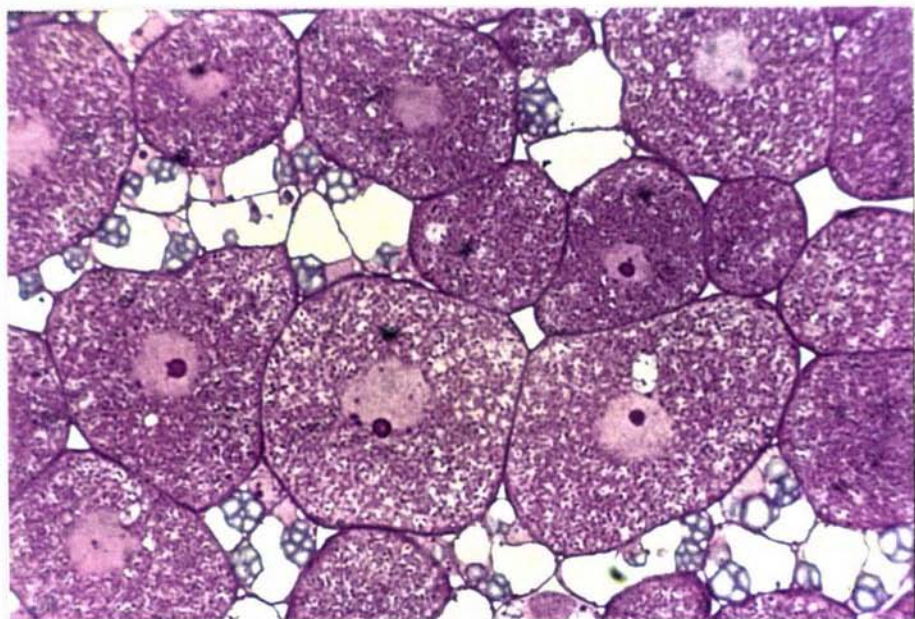


A

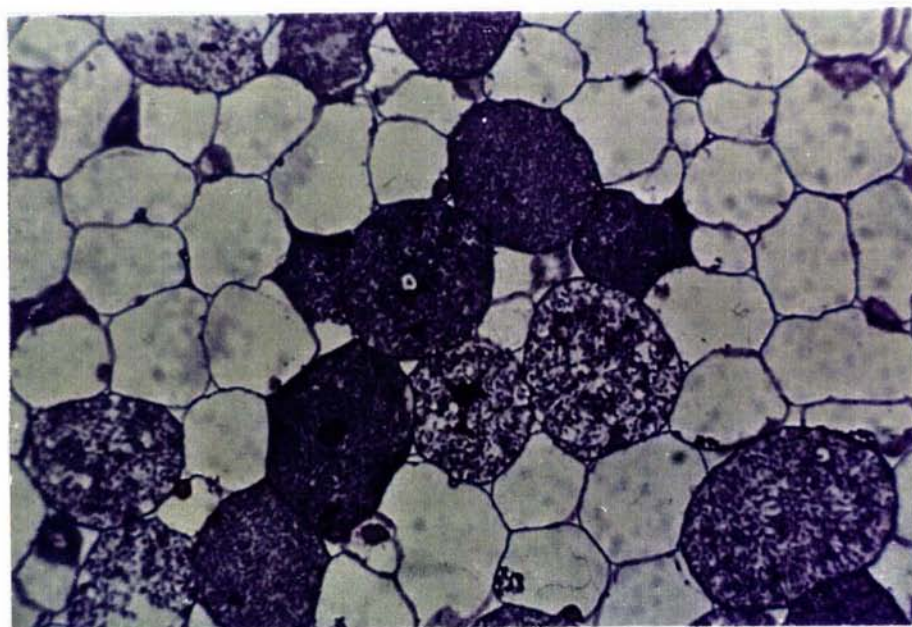


B

Fig. 10. Corte histológico de nódulo de *Phaseolus vulgaris* (10x) inoculado con *R. phaseoli* CE2 (A) y mutante IFC (B).



A



B

**Fig. 11.** Corte histológico de nódulo de *Phaseolus vulgaris* (40x) inoculado con *R. phaseoli* CE2 (A) y mutante IFC (B).

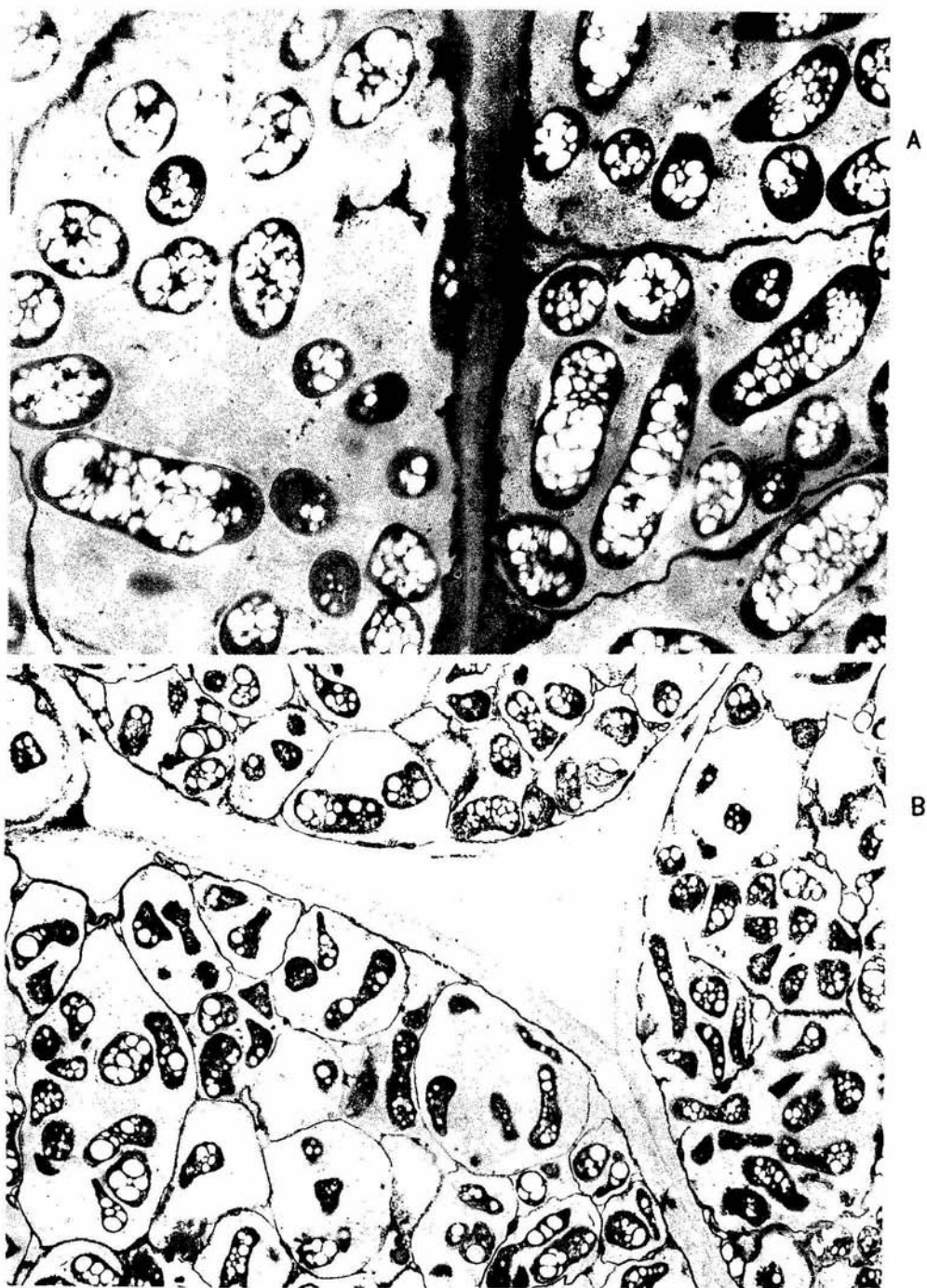
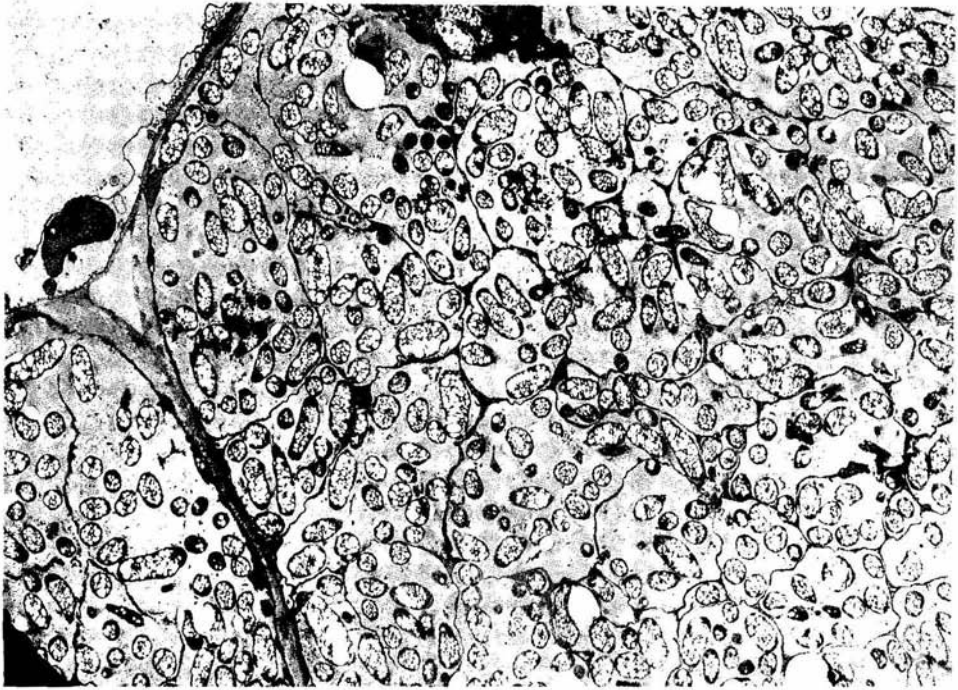
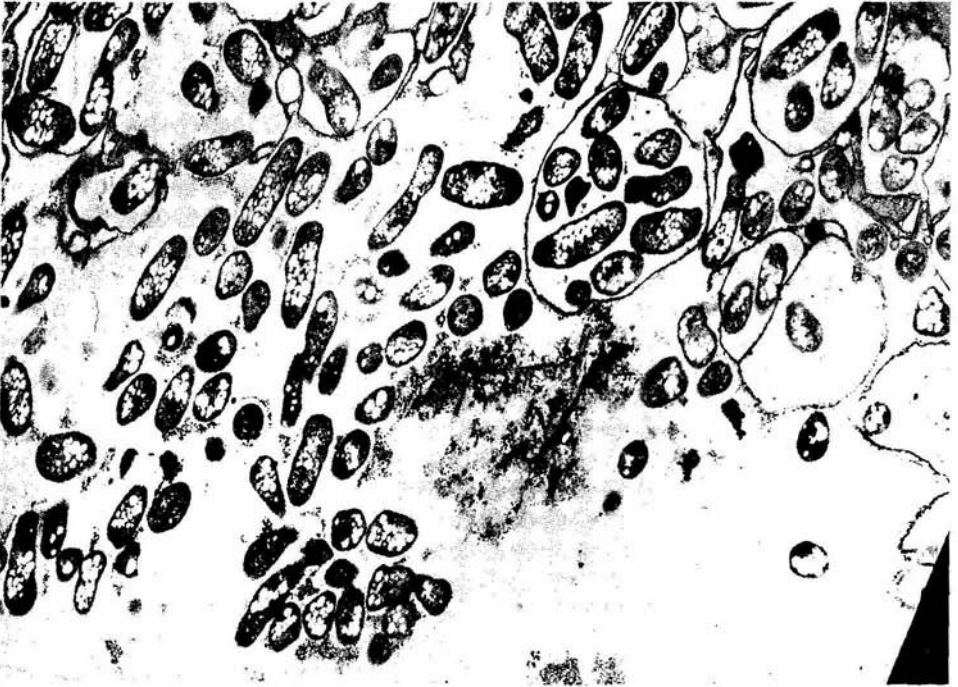


Fig. 12. Micrografías electrónicas de secciones finas de nódulos de *P. vulgaris* 21 días después de ser inoculadas con *R. phaseoli* cepa CE3 (A, 15800x) e IFC (B, 10500).

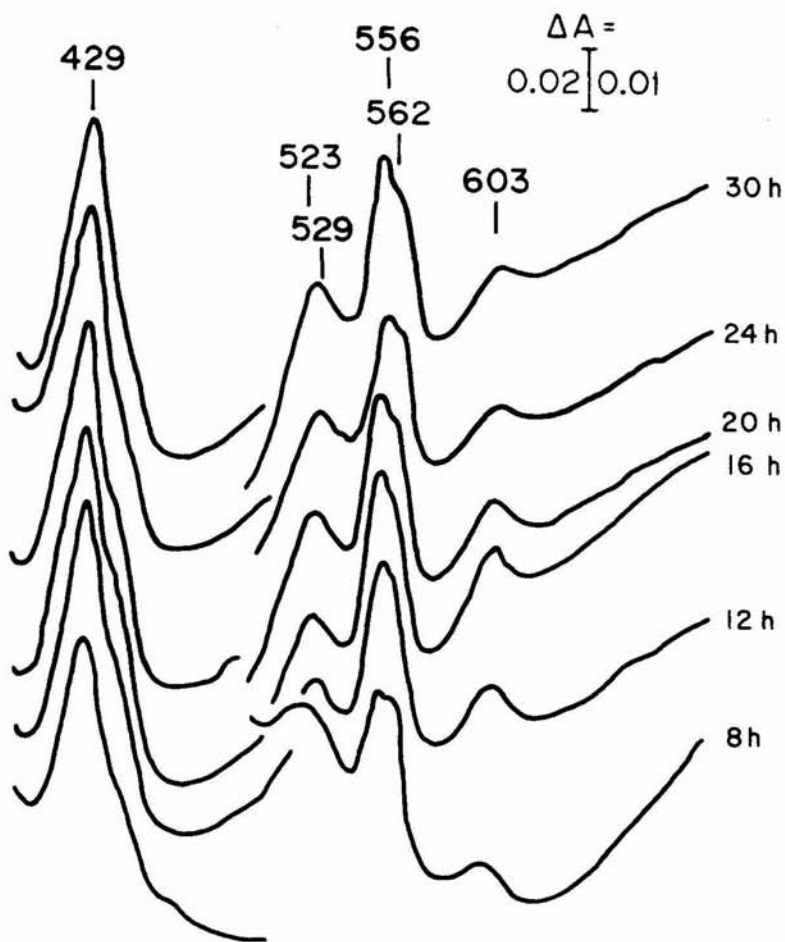


A

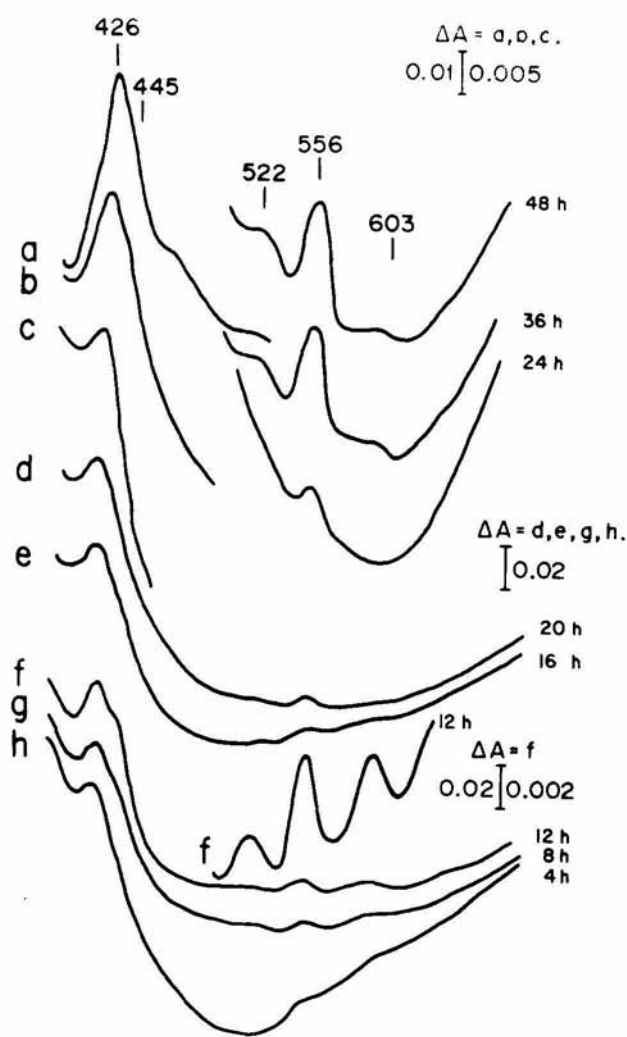


B

Fig. 13. Micrografías electrónicas de secciones finas de nódulos de *P. vulgaris* 35 días después de ser inoculadas con *R. phaseoli* cepas CE3 (A, 5000x) e IFC (B, 9500x).



**Fig. 14.** Curso temporal de expresión de citocromo  $aa_3$  en *R. phaseoli* cepa CE2 durante su cultivo en condiciones aerobias en medio PY.



**Fig. 15.** Curso temporal de expresión de citocromo  $aa_3$  en *R. phaseoli* cepa IFC durante su cultivo en condiciones aerobias en medio PY.



## VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El sistema respiratorio (SR) en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* presenta una interacción dinámica con el proceso de fijación simbiótica de dinitrógeno. En primer término, el ATP necesario para la actividad de la nitrogenasa se obtiene principalmente de la fosforilación oxidativa, y segundo, gracias a la actividad de sus oxidasas el SR contribuye a disminuir los niveles de  $O_2$  intracelulares. Por otra parte, la leghemoglobina presente en los nódulos es responsable de llevar  $O_2$  a los bacteroides que se encuentran respirando activamente, a la vez que mantiene una concentración muy baja de éste elemento.

La fijación biológica del dinitrógeno atmosférico es energéticamente costosa. Las bacterias de los géneros diazótrofos deben no solo satisfacer sus necesidades energéticas, sino además sostener la alta demanda de energía en forma de ATP que requiere la nitrogenasa. No obstante, resulta extraordinario la antipatía existente entre este sistema enzimático y el oxígeno, aceptor éste último de electrones en los microorganismos aerobios (Gallon, 1981; Postgate, 1987). El conocimiento de la manera en que estas bacterias producen y utilizan la energía, es primordial para esclarecer las relaciones energéticas en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.

Soberón y cols. (1989) en un trabajo previo reportaron un esquema del SR de *Rhizobium phaseoli* en células cultivadas, consistente en citocromos del tipo b, tipo c y de las oxidasas terminales  $aa_3$  y o. Con el objeto de conocer la posible participación del citocromo  $aa_3$  en la fijación simbiótica, este estudio giró en torno al aislamiento y caracterización genética y bioquímica de una mutante de *R. phaseoli* deficiente en la expresión de esta oxidasa terminal. Así de esta forma, la

carencia o deficiencia de algún componente de la cadena transportadora de electrones, resulta una estrategia valiosa para entender el papel de éstos en el proceso de fijación simbiótica.

La cepa mutante (mutante IFC) se obtuvo por inserción del transposón Tn5-mob y se aisló por su incapacidad para virar de color al TMPD (fenotipo TMPD<sup>-</sup>). Se optó por esta técnica de mutación debido a sus ventajas de no reversión y fácil monitoreo de mutantes gracias al carácter de resistencia a la kanamicina que les confiere el transposón a las células. Por otro lado, la prueba del TMPD (ver materiales y métodos) constituyó un criterio de selección de mutantes que se consideró en éste trabajo. Cabe recordar, que éste ensayo permitió "visualizar" en pocos segundos, mutantes respiratorias con alteraciones en la expresión de los citocromos c y aa<sub>3</sub>.

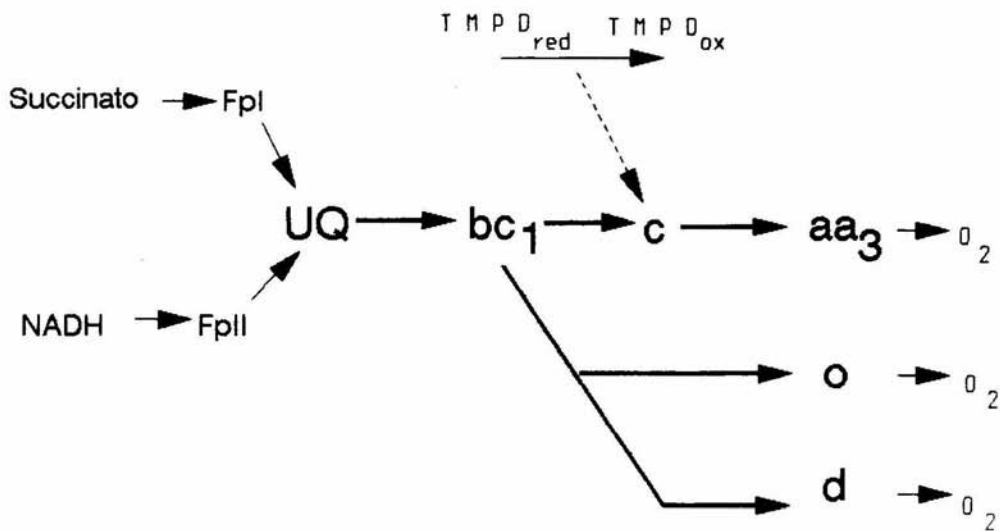
Las preguntas inmediatas a resolver fueron las siguientes: ¿Estaba la mutación ligada al fenotipo TMPD<sup>-</sup> observado?, ¿Existe una o varias inserciones del Tn5-mob?, ¿En caso de ser múltiples, a quién atribuirle el efecto provocado?. Para dar respuesta a la primera pregunta, la cepa IFC fue conjugada con una cepa receptora sana, encontrándose nuevamente la presencia del fenotipo TMPD<sup>-</sup> en casi la totalidad de las transconjugantes (vease resultados). La incapacidad de oxidar al TMPD así como la resistencia a la kanamicina adquirida por estas últimas, sugiere que la inserción del Tn5-mob estaba vinculada con los fenotipos mencionados. Ahora bien, los experimentos de hibridización Southern mostraron una sola banda de hibridización (fig. 3), sugiriendo con ello una sola inserción del transposón y por ende, responsable de la alteración genética.

Nuestros resultados mostraron que las fracciones membranales de la cepa IFC presentaron una notable disminución en la actividad de la ascorbato-TMPD oxidasa al compararse con la

cepa silvestre. Este comportamiento resultó acorde con la presencia del fenotipo TMPD<sup>-</sup>.

El análisis espectral de las fracciones membranales de las células cultivadas con aereación y agitación vigorosa de la cepa silvestre, muestra la presencia de los citocromos tipo b y c y de las oxidasas terminales aa<sub>3</sub> y o (ver figura 5). Este resultado equivale al reportado por Soberón y cols. (1989), y también ha sido descrito en células cultivadas de *B. japonicum* (Appleby, 1969b; Keister, et al., 1983; O'Brian, et al., 1987), *R. trifolii* (De Hollander y Stouthamer, 1980) y *R. leguminosarum* (Kretovich et al., 1973). Existe el consenso de que en estas especies, el SR ramificado presenta como punto de ramificación a un citocromo tipo b. Una de las ramas estaría constituida por la unidad funcional de los citocromos c y aa<sub>3</sub>, al tiempo que la otra tendría como oxidasa terminal al citocromo o (ver figura 15).

O'Brian y Maier (1989) proponen que dado que en los espectros de CO, la respiración en *B. japonicum* no es completamente inhibida, debe existir al menos otra oxidasa en células cultivadas. El candidato podría ser el citocromo d (designado inicialmente como a<sub>2</sub>). La expresión del citocromo d ha sido reportado en especies como *E. coli* (Anraku y Gennis, 1987), y *B. cereus* (Escamilla y Benito, 1984). Células cultivadas de *R. trifolii* y *R. leguminosarum* bajo condiciones de aereación limitada expresan esta oxidasa (O'Brian y Maier, 1989). Soberón (1989), reportó la presencia del citocromo d en una mutante de *R. phaseoli* designada como CFN4201, la cual tiene además una expresión elevada de los citocromo oxidasas aa<sub>3</sub> y o. El mismo autor señala la expresión de esta oxidasa en células de la cepa silvestre cultivadas en condiciones de limitación de oxígeno, aunado a que una cepa mutante de *E. coli* carente de los citocromos o y d, al ser complementada con un plásmido de la cepa CFN42 reestablece la señal de esta hemoproteína. De igual



**Fig. 15.** Esquema del sistema respiratorio propuesto para *Rhizobium phaseoli* en condiciones aerobias y de vida libre.

manera, Barquera et al., (1991a) presenta evidencias que señalan la síntesis de citocromo d en *R. phaseoli* en cultivos envejecidos y en condiciones de cultivo semi-anaerobias. El citocromo d presenta como características relevantes su notable insensibilidad a inhibición por cianuro y su alta afinidad por oxígeno, al grado que su síntesis se incrementa drásticamente bajo condiciones de limitación de oxígeno (Jones y Poole, 1985).

En *Azotobacter* spp., la tasa de síntesis del citocromo d se eleva significativamente durante el crecimiento a altas tensiones de O<sub>2</sub>. Esta oxidasa terminal se encuentra en la vía de baja eficiencia de síntesis de ATP del SR ramificado de este microorganismo diáztrofo, y por consecuencia está involucrado en la protección respiratoria de la nitrogenasa (Jones y Poole, 1985; Robson y Postgate, 1980).

El trazo del espectro diferencial ditionita<sub>red</sub> menos persulfato<sub>ox</sub> a una temperatura de 77K de las preparaciones membranales de la cepa IFC (ver figura 5B), muestra una señal disminuida a 603 nm, lo cual evidencia una alteración de la información genética que codifica para el citocromo aa<sub>3</sub>. De igual forma, la señal a 443 nm indicativa de este citocromo oxidasa es también pobre o ausente. Lo mismo ocurre con el citocromo c. La mutación afecta la expresión de los dos citocromos.

Los espectros diferenciales ascorbato-TMPC<sub>red</sub> menos persulfato<sub>ox</sub> evidenciaron la presencia de citocromo tipo b, al tiempo que no se registra señal significativa a 443 o 603 nm propios del citocromo aa<sub>3</sub> y dudosamente hay señal de c (ver fig. 6). Por su parte, los espectros ditionita<sub>red</sub> + CO menos ditionita<sub>red</sub> (fig. 7) presentaron una escasa señal en los picos de absorción de esta oxidasa (430 y 592 nm). En estos últimos, únicamente se detectó señales que corresponden a un citocromo tipo o (vease resultados). Debe mencionarse, que la reacción del

CO con los citocromos es indicativa o sugiere una función de oxidasa, más no es concluyente (Jones, 1988); técnicas como la espectroscopía de acción fotoquímica y las de intercambio de ligandos a baja temperatura, constituyen herramientas y criterios útiles en el estudio de estas hemoproteínas (Poole et al., 1985).

La concentración de citocromos en las fracciones membranales de la cepa mutante presentó una notable disminución en los contenidos del citocromo aa<sub>3</sub> (ver tabla 3). El bajo nivel de citocromo aa<sub>3</sub> (o bien de citocromo c o de ambos) es sin duda, responsable de la baja actividad en la ascorbato-TMPD oxidasa (Escamilla et al., 1986). Cabe señalar que en todos los lotes de cultivo examinados, siempre existió una pobre actividad de la ascorbato-TMPD oxidasa (15-30 ng atom O<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína) al compararse con la cepa silvestre, más nunca fue ausente. Lo anterior, puede asociarse a que la mutante es de tipo regulatorio y no estructural, debido a esta traza en los contenidos de citocromo aa<sub>3</sub>.

El efecto del KCN sobre la respiración dependiente de los sustratos NADH y ascorbato-TMPD fué evaluado. Se encontró una inhibición mayor del cianuro sobre la actividad de la NADH oxidasa de la cepa silvestre que en la mutante, además de que el patrón inhibitorio de la ASC-TMPD oxidasa es muy similar en ambas cepas. Lo anterior, sugiere que el TMPD no aporta electrones en la vía del citocromo o. Así tenemos que considerar que la expresión residual del citocromo aa<sub>3</sub> en el mutante IFC es causante de la muy baja actividad de la TMPD oxidasa, pero que sigue siendo igualmente sensible al KCN. Es importante señalar que el patrón de inhibición de la TMPD oxidasa tiene un comportamiento atípico. Lo anterior puede estar relacionado con la presencia en *R. phaseoli* de una flavoproteína que actúa como oxidasa capaz de oxidar al TMPD y que muestra resistencia al KCN (Barquera et al., 1991b).

Se han descrito varias mutantes respiratorias en especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (El Mokadem y Keister, 1982; O'Brian et al., 1987; Soberón 1989, et al., 1989; Nautiyal, et al., 1989) que muestran diversos fenotipos simbióticos. La mutante IFC sujeto de este estudio, presentó un fenotipo no fijador de nitrógeno (Fix<sup>-</sup>) durante la simbiosis con *Phaseolus vulgaris* (ver fig. 9). La actividad de la nitrogenasa estimada por la reducción de acetileno fue pobre o ausente (ver resultados), al tiempo que el contenido de nitrógeno total en tallos y hojas de plantas inoculadas con la cepa IFC, representó un poco menos de la mitad de los valores encontrados en plantas inoculadas con la cepa silvestre (ver tabla 4).

Este resultado contrasta con aquel obtenido con una mutante inducida por Tn5-mob de *B. japonicum* carente del citocromo oxidasa aa<sub>3</sub> en células cultivadas e incapaz de oxidar a los sustratos TMPD o NADH. Los nódulos pertenecientes a plantas inoculadas con esta cepa, presentaron un comportamiento similar al de la silvestre, en su capacidad de fijación estimado como ARA, su contenido de leghemoglobina, así como en su crecimiento (O Brian et al., 1987). Los autores proponen que lo anterior es debido a que en este microorganismo, la expresión del citocromo aa<sub>3</sub> no ocurre normalmente durante la simbiosis. La expresión de los citocromo oxidasas aa<sub>3</sub> y o en las diversas especies de *Rhizobium* se encuentra reprimida en los nódulos y en su lugar otras oxidasas únicas de la condición simbiótica se expresan (O'Brian y Maier, 1989).

La mutante IFC de *R. phaseoli* mostró un fenotipo similar al descrito para un grupo de cepas mutantes de *B. japonicum* aisladas por Nautiyal y cols. (1989), las cuales presentan las siguientes características: i) carecen de los citocromos c y aa<sub>3</sub>, ii) los contenidos de citocromo b alcanzan sólo la mitad de aquellas de

la cepa silvestre, y iii) son capaces de nodular pero no de establecer una simbiosis efectiva.

Es importante señalar que la mutante IFC presentó una disminución generalizada en sus contenidos de citocromos. Lo anterior, puede estar relacionado a la presencia de fenotipos pleiotropicos para citocromos debidos a una sola mutación. Este comportamiento ha sido reportado en otras mutantes de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Nautiyal et al., 1989) y puede ser atribuido a lesiones en las vías de síntesis del grupo hemo, en la síntesis de la membrana o bien alteraciones en un componente esencial para el ensamblaje de las hemoproteínas en la membrana.

La presencia del citocromo aa<sub>3</sub> en la condición de bacteroides ha sido reportada para algunas cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Keister et al., 1983; Nautiyal et al., 1989). En particular, Nautiyal et al., (1989) describieron una cepa silvestre de *Bradyrhizobium* sp., cuyos bacteroides retenían una cantidad significativa de esta oxidasa. Mutantes obtenidas a partir de esta cepa madre, carecían por completo del citocromo aa<sub>3</sub> y sin embargo, inducían un fenotipo Fix<sup>+</sup>. Este resultado sugiere que el citocromo aa<sub>3</sub> es dispensable para establecer una simbiosis efectiva en estas cepas.

Por otra parte, una mutante de *R. phaseoli* que expresa el citocromo aa<sub>3</sub> de forma constitutiva induce la formación de nódulos, los cuales en cortes histológicos revelan células infectadas con más bacteroides que la cepa silvestre (Soberón, 1989). Este dato evidencia un papel importante de esta oxidasa en la capacidad infectiva y de formación de nódulos del microorganismo en la planta. No obstante que la cepa IFC presentó un fenotipo Fix<sup>-</sup>, está es capaz de infectar en un grado mayor que una cepa de *R. phaseoli* (CFN031), misma que presenta niveles muy disminuidos de citocromo o y alteraciones en sus propiedades



vegetativas de crecimiento. Esta mutante se encuentra afectada de manera notable su capacidad infectiva y de proliferación en las células vegetales, sugiriendo con ello la probable participación del citocromo o en el proceso de infección (Soberón et al., 1990). El papel del citocromo o puede estar asociado con una disminución en la contribución cuantitativa a la economía energética celular.

El fenotipo simbiótico de la mutante IFC con niveles disminuidos de citocromo aa<sub>3</sub> es interesante, puesto que es capaz de infectar e inducir la formación de nódulos no vacíos (las células infectadas presentan bacteroides al parecer sin alteraciones, aunque en menor número que en la cepa silvestre), pero sin embargo, tiene un fenotipo no fijador de nitrógeno. Lo anterior, puede explicarse a que siendo el citocromo aa<sub>3</sub> un sitio de conservación de energía en la cadena respiratoria, una lesión en la información genética que codifica para esta hemoproteína, o en los elementos que participan en su regulación, necesariamente disminuye un importante aporte de ATP indispensable para la actividad de la nitrogenasa. La mutante IFC permite entonces separar de manera clara la capacidad infectiva de la actividad de fijación de nitrógeno.

Aunado a lo anterior, durante el curso temporal de expresión del citocromo aa<sub>3</sub> se observó la señal de esta oxidasa en las etapas tempranas de desarrollo del cultivo de la mutante IFC. Estos resultados sugieren que la mutación en IFC no ocurre en el gen estructural del citocromo aa<sub>3</sub>, debido a la expresión diferencial de ésta oxidasa en las primeras etapas. Sin embargo, no se puede descartar que la mutación se encuentre en el gen estructural puesto que cabría la posibilidad de la presencia de dos isoenzimas con controles de síntesis separados y que no comparten alguna subunidad dañada por la mutación. Una explicación alternativa a estos resultados sería que la mutación

ocurriese en algun gen regulador c/aa<sub>3</sub> responsable de la síntesis del apocitocromo c y aa<sub>3</sub>. Además, éste hecho puede estar asociado con la capacidad infectiva y de formación de nódulos de IFC, puesto que el microorganismo tendría todas sus oxidasas activas al momento de la infección a la planta. No obstante, no se conoce aún si la expresión del sistema respiratorio en *R. phaseoli* y en particular la del citocromo aa<sub>3</sub> es regulada de igual manera en condiciones simbióticas.

Por lo expuesto, se puede concluir que el citocromo aa<sub>3</sub> es importante para la reacción de fijación de nitrógeno, por las razones ya mencionadas, más no en su capacidad de infección y/o formación de nódulos. Los resultados obtenidos en éste trabajo, sugieren además, el papel del citocromo aa<sub>3</sub> en la infección durante las etapas tempranas de formación del nódulo. Las oxidasas alternativas o y d no parecen ser capaces de reemplazar las funciones del citocromo aa<sub>3</sub> en vida simbiótica.

## VII. REFERENCIAS

1. Anraku, Y. 1988. Bacterial electron transport chains. *Ann. Rev. Biochem.* 57:101-132.
2. Anraku, Y., y R.B. Gennis. 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 12: 262-266.
3. Appleby, C.A. 1969a. Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. I. Haemoprotein P-450, other CO-reactive pigments, cytochromes and oxidases in bacteroids from N<sub>2</sub>-fixing root nodules. *Biochim. Biophys. Acta* 172:71-87.
4. Appleby, C.A. 1969b. Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. *Biochim. Biophys. Acta* 172:88-105.
5. Appleby, C.A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:443-478.
6. Appleby, C.A., G.L. Turner, y P.K. Macnicol. 1975. Involvement of oxyleghaemoglobin and cytochrome P-450 in an efficient oxidative phosphorylation pathway which supports nitrogen fixation in *Rhizobium*. *Biochim. Biophys. Acta* 387:461-474.
7. Arvas, R., I.A. McKay, F.R.P. Rowney, M.J. Dilworth y A.R. Glenn. 1985. Properties of organic acid utilization mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* 131:2059-2066.
8. Barquera, B., A. Garcia-Horsman, y J.E. Escamilla. 1991a. Cytochrome d expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 155:114-119.
9. Barquera, B., A. García-Hersman, y J.E. Escamilla. 1991b. An alternative non-cytochrome containing branch in the respiratory system of free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 155:428-435.
10. Bergersen, F.J., y G.L. Turner. 1975. Leghaemoglobin and the supply of O<sub>2</sub> to nitrogen-fixing root nodule bacteroids: presence of two oxidase systems and ATP production at low free O<sub>2</sub> concentration. *J. Gen. Microbiol.* 91:345-354.

11. Bergersen, F.G., y G.L. Turner. 1980. Properties of terminal oxidase systems of bacteroids from root nodules of soybean and cowpea and of N<sub>2</sub>-fixing bacteria grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 118:235-252.
12. Beringer, J.E., J.L. Beynon, A.V. Buchanan-Wollaston y A.W.B. Johnston. 1978. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature (London)* 276:633-634.
13. Brewin, N.J. J.E. Beringer, y A.W.B. Johnston. 1980. Plasmid-mediated transfer of the host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120:413-420.
14. Buchanan-Wollaston, A.V., J.E. Beringer, N.J. Brewin, P.R. Hirsch, y A.W.B. Johnston. 1980. Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 178:185-190.
15. Campos, F., J. Padilla, M. Vázquez, J.L. Ortega, C. Enríquez y F. Sánchez. 1987. Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9:521-532.
16. Daniel, R.M. 1979. The occurrence and role of ubiquinone in electron transport to oxygen and nitrate in aerobically, anaerobically and symbiotically grown *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 110:333-337.
17. Dixon, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodules bacteroids: occurrence and properties. *Arch. Microbiol.* 85:193-201.
18. Escamilla, J.E. y M.C. Benito. 1984. Respiratory system of vegetative and sporulating *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 160:473-477.
19. Escamilla, J. E., R. Ramirez, I.P. Del Arenal, G. Zarzoza, y V. Linares. 1987. Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus Cereus*: effects of oxygen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* 133:3549-3555.
20. Estabrook, R.W. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzimol.* 10:41-47.
21. Finan, T.M., I. Oresnik, y A. Bottacin. 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. *J. Bacteriol.* 170:3396-3403.

22. Finan, T.M., J.M. Wood y D.C. Jordan. 1983. Symbiotic properties of C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 154:1403-1413.
23. Gallon, J.R. 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. Trends Biochem. Sci. 6:19-23.
24. Gardiol, A., A. Arias, C. Cerveñansky y G. Martínez-Drets. 1982. Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 151:1621-1623.
25. Gardiol, A.E., G.L. Truchet y F.B. Dazzo. 1987. Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules. Appl. Environment Microbiol. 53:1947-1950.
26. Gottschalk, G. 1986. Bacterial metabolism, 2nd. ed. Springer-Verlag, New York, pp. 318-326.
27. Haaker, H., y C. Veeger. 1984. Enzymology of nitrogen fixation. Trends Biochem. Sci. 9:188-192.
28. Harold, F.M. 1986. The vital force: a study of bioenergetics. W.H. Freeman and company, New York, pp. 91-126.
29. Hoffman, P.S., T.V. Morgan, y D.V. DerVartanian. 1979. Respiratory-chain characteristics of mutants of *Azotobacter vinelandii* negative to Tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase. Eur. J. Biochem. 100:19-27.
30. De Hollander, J.A., y A.H. Stouthamer. 1980. The electron transport chain of *Rhizobium trifolii*. Eur. J. Biochem. 111:473-478.
31. Hom, S.S.M., S.L. Uratsu y F. Hoang. 1984. Transposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants. J. Bacteriol. 159:335-340.
32. Jones, C.W. 1982. Bacterial respiration and photosynthesis. Van Nostrand Reinhold, London, pp. 1-37.
33. Jones, C.W. 1988. Membrane-associated energy conservation in bacteria: a general introduction. En: Anthony, C. (ed), Bacterial energy transduction, Academic Press, London, pp. 1-82.
34. Jones, C.W., y R.K. Poole. 1985. The analysis of cytochromes. Methods Microbiol. 18:285-328.

35. Keister, D.L., S.S. Marsh y M.T. El Mokadem. 1983. Cytochromes of *Rhizobium japonicum* 61A76 bacteroids from soybean nodules. *Plant Physiol.* 71:194-196.
36. Kondorosi, E., y A. Kondorosi. 1986. Nodule induction on plants roots by *Rhizobium*. *Trends Biochem. Sci.* 11:296-299.
37. Kretoovich, V.L., V.I. Romanov, y A.V. Korolev. 1973. *Rhizobium leguminosarum* cytochromes (*Vicia faba*). *Plant Soil* 39:619-634.
38. Laane, C., H. Haaker y C. Veeger. 1979. On the efficiency of oxidative phosphorylation in membrane vesicles of *Azotobacter vinelandii* and of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *Eur. J. Biochem.* 97:369-377.
39. Lim, S.T., K. Andersen, R. Tait y R.C. Valentine. 1980. Genetic engineering in agriculture: hydrogen uptake (*hup*) genes. *Trends Biochem. Sci.* 5:167-170.
40. Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 68-73.
41. Markwell. M.A.K., S.M. Hass, L.L. Bieber y N.E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87:206-210.
42. Markwell, M.A.K., S.M. Hass, N.E. Tolbert y L.L. Bieber. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol.* 72:296-303.
43. McInerney, M.J., K.S. Holmes, P. Hoffman y D.V. Der Vartanian. 1984. Respiratory mutants of *Azotobacter vinelandii* with elevated levels of cytochrome *d*. *Eur. J. Biochem.* 141:447-452.
44. Meade, H.M., S.R. Long, G.B. Ruvkun, S.E. Brown y F.M. Ausubel. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149:114-122.
45. Meyer, T.E. y M.A. Cusanovich. 1989. Structure, function and distribution of soluble bacterial redox proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 975:1-28.
46. El Mokadem, M.T. y D.L. Keister. 1982. Electron transport in *Rhizobium japonicum*. Isolation of cytochrome *c* deficient mutants. *Isr. J. Botany.* 31:102-111.

47. Mortenson, L.E., y R.N.F. Thorneley. 1979. Structure and function of nitrogenasa. *Ann. Rev. Biochem.* 48:387-418.
48. Nautiyal, Ch.S., P.V. Berkum, M.J. Sadowsky y D.L. Keister. 1989. Cytochrome mutants of *Bradyrhizobium* induced by transposon Tn5. *Plant Physiol.* 90:553-559.
49. Noel, K.D., A. Sanchez, L. Fernandez, J. Leemans y M.A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
50. O'Brian, M.R., P.M. Kirshbom y R.J. Maier. 1987. Tn5-induced cytochrome mutants of *Bradyrhizobium japonicum*: effects of the mutations on cells grown symbiotically and in culture. *J. Bacteriol.* 169:422-430.
51. O'Brian, M.R. y R.J. Maier. 1982. Electron transport components involved in hydrogen oxidation in free-living *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 152:422-430.
52. O'Brian, M.R. y R.J. Maier. 1985b. Role of ubiquinone in hydrogen-dependent electron transport in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 161:775-777.
53. O'Brian, M.R. y R.J. Maier. 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium-legume* symbioses. *Biochim. Biophys. Acta* 974:229-246.
54. Perbal, B. 1984. A practical guide to molecular cloning. John Wiley & Sons, New York, pp. 7-10.
55. Peterson, J.B. y T.A. La Rue. 1981. Utilization of aldehydes and alcohols by soybean bacteroids. *Plant Physiol.* 68:489-493.
56. Poole, R.K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases. structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 726:205-243.
57. Poole, R.K. 1988. Bacterial cytochrome oxidases. En: Anthony, C. (ed). *Bacterial energy transduction*. Academic Press, London, pp. 231-291.
58. Poole, R.K., B.S. Baines, J.A.M. Hubbard y H.D. Williams. 1985. Microbial metabolism of oxygen: the binding and reduction of oxygen by bacterial cytochrome oxidases. En: Poole, R.K. y C.S. Dow (eds). *Microbial gas metabolism: mechanistic, metabolic and biotechnological aspects*. Society for General Microbiology, Academic Press, London, pp.31-62.
59. Postgate, J. 1987. Nitrogen fixation. 2nd. Edition, Edward Arnold, London.

60. Reibach, P.H. y J.G. Streeter. 1984. Evaluation of active versus passive uptake of metabolites by *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 159:47-51.
61. Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH: an electron opaque stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-211.
62. Robertson, J.G. y K.J.F. Farden. 1980. Ultrastructure and metabolism of developing legume root nodule. En: Mifflin, B.J. (ed). *The biochemistry of plants*. Vol. 5, Academic Press, New York, pp. 65-113.
63. Robson, R.L. y J.R. Postgate. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:183-207.
64. Ronson, C.W., P. Lyttleton y J.G. Robertson. 1981. C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4284-4288.
65. Ruvkun, G.B., y F.M. Ausubel. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:191-195.
66. Salminen, S.O., y J.G. Streeter. 1987. Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 169:495-499.
67. San Francisco, M.J.D., y G.R. Jacobson. 1985. Uptake of succinate and malate in cultured cells and bacteroids of two slow-growing species of *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 131:765-773.
68. Saroso, S., A.R. Glenn, y M.J. Dilworth. 1984. Carbon utilization by free-living and bacteroids forms of cowpea *Rhizobium* strain NGR234. *J. Gen. Microbiol.* 130:1809-1814.
69. Selvaraj, G., y V.M. Iyer. 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* 156:1292-1300.
70. Sengupta-Gopalan, Ch., J.W. Pitas, D.V. Thompson, y L.M. Hoffman. 1986. Expression of host genes during root nodule development in soybeans. *Mol. Gen. Genet.* 203:410-420.
71. Shah, V.K., y W.J. Brill. 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3249-3253.



72. Shah, V.K., R.A. Ugalde, J. Imperial, y W.J. Brill. 1984. Molybdenum in nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 53:231-257.
73. Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
74. Soberón, M., J. Membrillo-Hernández, G.R. Aguilar, y F. Sánchez. 1990. Isolation of *Rhizobium phaseoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa<sub>3</sub>. *J. Bacteriol.* 172:1676-1680.
75. Soberón, M., H.D. Williams, R.K. Poole, Y E. Escamilla. 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171:465-472.
76. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
77. Thöny-Meyer, L., D. Stax, y H. Hennecke. 1989. An unusual gene cluster for the cytochrome bc<sub>1</sub> complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirements for effective root nodule symbiosis. *Cell* 57:683-697.
78. Tuzimura, K., y H. Meguro. 1960. Respiratory substrate of *Rhizobium* in the nodules. *J. Biochem.* 47:391-397.
79. Verma, D.P.S., V. Kazazian, V. Zogbi, y A.K. Bal. 1978. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell Biology* 78:919-936.
80. Wacek, T., y W.J. Brill. 1976. Simple rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soybean. *Crop Science* 16:519-522.
81. Wittenberg, J.B., F.J. Bergersen, C.A. Appleby, y G.L. Turner. 1974. Facilitated oxygen diffusion: the role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* 249:4057-4066.
82. Zaat, S.A.J., H.P. Spaank, C.A. Wijffelman, A.A.N. van Brussel, R.J.H. Okker, y B.J.J. Lugtenberg. 1988. Flavonoid compounds as molecular signals in *Rhizobium*-legume symbiosis. En: Scannerini, S., et al., (eds.). *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 189-205.