

FALLA DE ORIGEN

03088

3

2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL

Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

GENÉTICA MOLECULAR DE GENES INVOLUCRADOS EN LA

EXPRESIÓN DE OXIDASAS TERMINALES

EN *Rhizobium etli*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

M. en IBB. JUAN MIRANDA RIOS.

Cuernavaca, Morelos, octubre de 1995.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

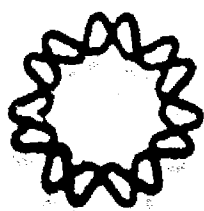
EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DEL  
DR. MARIO SOBERON CHAVEZ, PERTENECIENTE AL DEPTO. DE  
BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE BIOTEC-  
NOLOGIA DE LA UNAM.

ESTE TRABAJO FUE ASESORADO POR EL COMITE TUTORIAL  
INTEGRADO POR:

DR. MARIO SOBERON CHAVEZ      TUTOR PRINCIPAL

DR. ENRIQUE MORETT SANCHEZ      CO-TUTOR

DR. MARIO ROCHA SOSA      CO-TUTOR



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROYECTO ACADEMICO  
DE ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN BIOTECNOLOGIA

IBT

M. en IBB. Juan Miranda Rios  
P r e s e n t e.

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en Biotecnología:

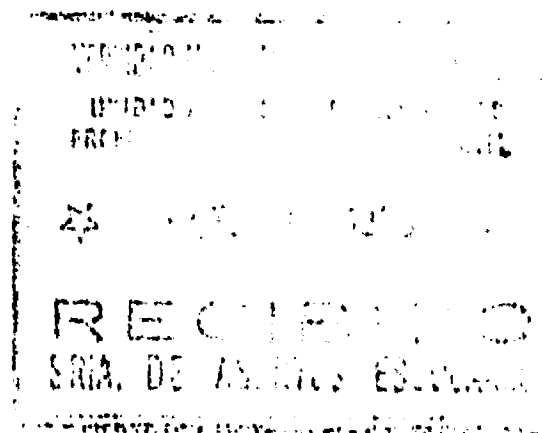
Presidente	Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Vocal	Dr. Antonio Velázquez Arellano
Vocal	Dra. Esperanza Martínez Romero
Vocal	Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Secretario	Dr. Mario Soberón Chávez
Suplente	Dr. Mario Rocha Sosa
Suplente	Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuernavaca, Mor. 5 de octubre de 1995.

*Agustín López Munguía*  
Dr. Agustín López Munguía  
Coordinador del Proyecto



TELS. (52)(73) 114900, 114690 Y 114700 FAX (52)(73) 172388  
APDO. 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62250, MEXICO

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Mario Soberón por haberme ayudado en la realización de este proyecto, por brindarme un clima de libertad para el desarrollo de nuevas ideas y proyectos y por su generoso apoyo.

A los miembros de mi comité tutorial por todas esas discusiones acerca del proyecto y sus sugerencias de experimentos para corroborar algunas hipótesis de trabajo.

A los Dres. Alejandra Covarrubias, Esperanza Martínez, Mario Rocha, Enrique Morett y Lorenzo Segovia por su minuciosa revisión de esta tesis, cuyas sugerencias mejoraron la claridad de este escrito. En especial al Dr. Antonio Velázquez quien hace 15 años me introdujo a la investigación científica en la práctica.

A Moni y Araceli por iluminar mi vida.

A mi mamá porque con su ejemplo me enseno lo lejos que se puede llegar si se trabaja duro.

A mi hermana por su incondicional apoyo.

A todas las gentes que a lo largo de estos 15 años tuvieron la paciencia de enseñarme a trabajar en el laboratorio, a usar una computadora y por medio de Internet (el invento del siglo) conectarme a todo el mundo.

A Claudia Morera por todos los espectros que realizó para este proyecto.

A Ismael por su contagioso entusiasmo y amistad.

A María Luisa, Germán, Osvaldo, Claudia II, Mayra, Roberto; Miriam, Jorge y Polo por su amistad y compañerismo.

Y por último, a esta gran aventura intelectual colectiva llamada UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Dedicada a Mónica Andrea y Araceli.

## INDICE.

RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION.	
1) Fijación biológica del nitrógeno	3
2) Sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno	4
3) Estrategias para limitar el daño por oxígeno a la nitrogenasa	5
3A) Estrategias conductuales	
3A.a) Evasión	6
3A.b) Respuestas aerotácticas, agregación y asociación con otros microorganismos	7
3B) Barreras físicas	
3B.a) Papel de los polisacáridos	8
3B.b) Heterocistos y vesículas	9
3B.c) Arquitectura del nódulo	10
3C) Estrategias fisiológicas y bioquímicas	
3C.a) Consumo metabólico de oxígeno	10
3C.b) Protección respiratoria	11
3C.c) Producción de energía en tensiones bajas de oxígeno	12
4) Respiración bacteriana	13
5) Cadenas respiratorias de <i>Rhizobium</i> en vida libre y en simbiosis	15
5A) Vida libre	15
5B) Simbiosis	16
5C) Oxidasas alternativas	18
6) Cadenas respiratorias de <i>Rhizobium etli</i>	19

7) Mecanismos de la regulación de la transcripción de los citocromos en bacterias	21
II.- OBJETIVO	24
III.- ARTICULO	25
IV.- MATERIAL Y METODOS	51
V.- RESULTADOS ADICIONALES	55
1) Análisis de la expresión de citocromos en las cepas CFN037 y CFN030	55
2) Expresión de los genes <i>fixNOQP</i> en las cepas mutantes	56
3) Identificación del gene mutado en la cepa CFN037	56
4) Regulación de la expresión del gene <i>thiC</i> en las cepas CE3, CFN037 y CFN030	57
VI.- DISCUSION	59
VII.- FIGURAS	
Figura 1	66
Figura 2	67
Figura 3	68
Figura 4	69
Figura 5	70
Figura 6	71
Figura 7	72
Figura 8	73
Figura 9	74
Figura 10	75
VIII.- TABLAS	
Tabla 1	76
IX.- BIBLIOGRAFIA	78



## RESUMEN.

En este trabajo se presenta el análisis genético y fenotípico de mutantes con una expresión derreprimida de las citocromo oxidasas terminales y una capacidad simbiótica aumentada. La mutante CFN030 de *Rhizobium etli* fue aislada por su fenotipo resistente a azida de sodio y fue obtenida por mutagenesis con el transposón Tn5-*mob*. Esta mutante tiene una expresión derreprimida del citocromo aa3, mayores actividades respiratorias en cultivos microaeróbicos y una capacidad simbiótica incrementada. Este fenotipo es similar al de una mutante previamente descrita (CFN037), la cual fue aislada debido a su capacidad incrementada de oxidar al colorante N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD, Soberón et al., 1990, J. Bacteriol. 172: 1676-1680). En este trabajo se muestran datos que indican que aunque ambas mutantes tienen un fenotipo similar, están afectadas en diferentes genes. La cepa CFN030 tiene la inserción del Tn5 en el cromosoma, mientras que en la cepa CFN037 el transposón se localiza en el plásmido b (que es uno de los seis plásmidos presentes en *R. etli* y que contiene genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos). El análisis de los espectros de citocromos en cultivos de ambas mutantes en la fase estacionaria de crecimiento mostraron la expresión de una citocromo oxidasa terminal (cbb<sub>3</sub>) que no se encuentra presente en la cepa silvestre. Esta oxidasa terminal es similar a la encontrada en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* y que se piensa es la oxidasa específica expresada durante la simbiosis (Keefe y Maier, 1993, Biochim. Biophys. Acta 1183: 91-104).

Por otro lado, se presentan datos que apuntan a una mayor expresión del operón *fixNOQP* (cuyos genes codifican para las subunidades de la oxidasa simbiótica) en la cepa CFN037.

Con el propósito de identificar al gene mutado en la cepa CFN037 se subclonó el fragmento *EcoRI* que contiene al Tn5. La secuencia contiene un marco abierto de lectura que presenta homología al producto codificado por el gene *thiC* de *Escherichia coli*, que está involucrado en la biosíntesis de la vitamina B<sub>1</sub> ó tiamina (Vander Horn et al., 1993, J. Bacteriol. 175: 982-992). El Tn5 se insertó 121 pb. hacia arriba del codón de inicio. Se estudió la expresión del gene *thiC* en la cepa silvestre y se encontró que se expresa en cultivos microaeróbicos y no se expresa en cultivos aeróbicos. En la cepa CFN037 se expresa de manera alta constitutiva en cultivos aeróbicos y microaeróbicos, posiblemente debido a que se este transcribiendo a partir de un promotor interno del Tn5.

Se presume que la tiamina tiene un efecto sobre la expresión de los citocromos tipo c y en especial de la oxidasa simbiótica.

## I.- INTRODUCCION

### 1) FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO.

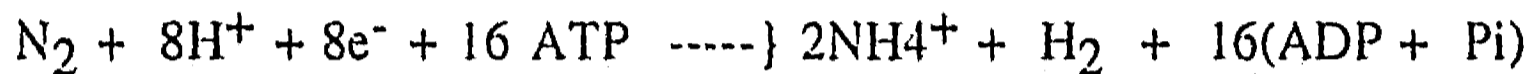
Sólo algunos organismos procariontes son capaces de obtener su nitrógeno celular del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ). Las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) pueden fijar en simbiosis (usualmente, mas no siempre, con plantas superiores) o pueden fijar en vida libre, e incluyen representantes de las arqueobacterias y las eubacterias. Son ubicuas en aguas y tierras y exhiben varios estilos de vida. Así, tenemos diazótrofos anaerobios, microaerobios, anaerobios facultativos y aerobios estrictos; algunos son quimiótrofos mientras otros son heterótrofos.

La conversión biológica de dinitrógeno a amonio está catalizada por el sistema enzimático de la nitrogenasa presente en organismos fijadores de nitrógeno. La nitrogenasa convencional consiste de dos proteínas, la proteína hierro (Fe-proteína) y la proteína hierro-molibdeno (FeMo-proteína), que juntas median la reducción dependiente de ATP del dinitrógeno. La reducción del dinitrógeno por la nitrogenasa se lleva a cabo en tres reacciones: a) la reducción de la Fe-proteína por acarreadores de electrones como las flavodoxinas; b) la transferencia dependiente de ATP de electrones de la Fe-proteína a la FeMo-proteína, con una estequiometría mínima de dos moléculas de ATP-Mg hidrolizado por electrón transferido y, c) la transferencia de un electrón y un protón al sustrato, el cual muy probablemente está unido al cofactor FeMo de la FeMo-proteína (Rees et al., 1993).

Las dos proteínas de la nitrogenasa están compuestas por un total de tres diferentes tipos de subunidades y contienen tres tipos diferentes de centros metálicos. La Fe-proteína es un dímero de dos subunidades idénticas (codificadas por el gene *nifH*) que coordinan de manera simétrica un cluster 4Fe:4S, con un peso molecular total de aproximadamente 60,000. Las propiedades de unión de nucleótidos de la Fe-proteína pura indican que está involucrada en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP a la transferencia de electrones. La FeMo-proteína es un tetrámero 2-β2 (cuyas subunidades están codificadas por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente), con un peso molecular total de aprox. 240,000. Asociados a la FeMo-proteína se encuentran dos tipos de centros metálicos, el cofactor FeMo el cual se cree que es el sitio de reducción del sustrato, y el cluster P que pudiera funcionar en la transferencia de electrones entre la Fe-proteína y el cofactor FeMo (Rees, et al. 1993).

Recientemente, se han identificado dos diferentes nitrogenasas independientes de Mo. Estas enzimas se han estudiado en la bacteria aeróbica *Azotobacter*, aunque hay evidencia circunstancial de que están presentes en otros diazótrofos. La primera de ellas, la nitrogenasa de vanadio o V-nitrogenasa, consiste de una proteína vanadio-ferro y una proteína ferro, mientras que la tercera nitrogenasa (a menudo llamada la nitrogenasa alternativa o nitrogenasa 3) contiene sólo cantidades traza de Mo y V. Ambas proteínas de esta nitrogenasa son Fe-proteínas (Gallon, 1992).

La siguiente ecuación expresa la estequiometría de la reacción de la fijación de nitrógeno:



La reacción requiere de una fuente de electrones y está acompañada por la hidrólisis de  $\text{ATPMg}^{2-}$  a  $\text{ADPMg}^{2-}$  y Pi. Las estimaciones actuales indican que se requiere hidrolizar 2 moléculas de ATP por electrón donado al  $\text{N}_2$ , i. e. 16 moléculas de ATP por molécula de  $\text{N}_2$  fijada (Gallon, 1992). Es por ésto que para fijar nitrógeno, los diazótrofos deben poseer una nitrogenasa activa y ser capaces de proporcionar a la enzima con ATP y electrones provenientes del metabolismo celular. Los electrones generalmente son proporcionados por una flavodoxina reducida o una ferredoxina reducida.

## 2) SENSIBILIDAD DE LA NITROGENASA AL OXIGENO.

Una propiedad única de la fijación biológica del nitrógeno es su extrema sensibilidad a la inactivación por oxígeno ( $\text{O}_2$ ). La enzima nitrogenasa pura, sin importar su origen, es inactivada rápida e irreversiblemente al exponerla al  $\text{O}_2$ . De aquí que la fijación de  $\text{N}_2$  y el  $\text{O}_2$  sean incompatibles. Sin embargo, el  $\text{O}_2$  está presente en la atmósfera terrestre y, para los diazótrofos que son aerobios estrictos, es esencial para la supervivencia. Además, algunos diazótrofos producen  $\text{O}_2$  por medio de la fotosíntesis (Gallon, 1992).

In vitro, la nitrogenasa es irreversiblemente inactivada por el  $\text{O}_2$ . La inhibición es incompetitiva con respecto a la reducción de  $\text{N}_2$  ( $k_i=0.014$  atm) y la hidrólisis de ATP ( $k_i=0.03$  atm), pero es competitiva con respecto

a la donación de electrones de la flavodoxina ( $k_i=0.007$  atm). Burris (1979) sugirió que el  $O_2$  podría inhibir la reducción de la nitrogenasa en el sitio que recibe los electrones de la flavodoxina reducida.

Tanto la Fe-proteína como la FeMo-proteína son inactivadas por  $O_2$  con vidas medias de decaimiento de 45 s y 10 min respectivamente. En el caso de la FeMo-proteína, el  $O_2$  causa un cambio en los estados de oxidación de los centros Fe dentro de la molécula, el cual, después de una exposición prolongada, resulta en la pérdida de Fe, Mo y S de la proteína. Los componentes de las nitrogenasas independientes de Mo son aún más sensibles a la inactivación por  $O_2$ .

In vivo, la situación es más compleja. En muchos diazótrofos, el  $O_2$  tiene un efecto benéfico sobre la fijación de  $N_2$ . La presencia de  $O_2$ , al ser el aceptor terminal de electrones de la respiración aeróbica, estimula la fosforilación oxidativa y por lo tanto el suministro de ATP para la síntesis de la nitrogenasa y su actividad. Sin embargo, esta estimulación está en contra de la sensibilidad al  $O_2$  de la nitrogenasa. Consecuentemente, para la mayoría de los diazótrofos, una gráfica de la fijación de  $N_2$  contra concentración de  $O_2$  muestra una curva en forma de campana. En concentraciones subóptimas de  $O_2$ , la introducción de más  $O_2$  estimula la fijación de  $N_2$  a través de un mayor suministro de ATP, y quizás, de esqueletos de carbono para la asimilación del nitrógeno fijado. Sin embargo, a concentraciones supraóptimas de  $O_2$ , el  $O_2$  adicional inhibe la fijación de  $N_2$  a través de una inactivación incrementada de la nitrogenasa. In vivo, la nitrogenasa no es el único blanco potencial de la inactivación por  $O_2$ . Por ejemplo, los donadores de electrones a la nitrogenasa tales como la flavodoxina, la ferredoxina y la hidrogenasa (en el caso de las bacterias que cuentan con esta enzima) pueden sufrir daño por el  $O_2$  (Gallon, 1992).

### **3) ESTRATEGIAS PARA LIMITAR EL DAÑO POR OXIGENO A LA NITROGENASA.**

En la práctica, el  $O_2$  y la fijación de nitrógeno coexisten y los diazótrofos tienen que reconciliar lo incompatible: mantener una nitrogenasa activa en presencia de  $O_2$ . Como consecuencia, durante la evolución se han seleccionado una serie de estrategias que impiden o limitan el contacto

entre la nitrogenasa y el  $O_2$  y que aseguran que cualquier contacto que ocurra resulte en una pérdida mínima de la habilidad de fijar  $N_2$ .

La mayoría de los diazótrofos fijan  $N_2$  bajo atmósferas que contienen  $O_2$  en concentraciones menores a las presentes en el aire (condiciones microaeróbicas). Aún aquellos que pueden fijar  $N_2$  en condiciones aeróbicas usualmente muestran una actividad óptima bajo condiciones microaeróbicas y son afectados adversamente por la exposición al  $O_2$  en concentraciones supraatmosféricas. Por lo tanto, parece que las estrategias empleadas por todos los diazótrofos para limitar el daño por  $O_2$  a la nitrogenasa pueden ser saturadas por una suficientemente larga exposición al  $O_2$  a una concentración alta.

Se han encontrado diferentes métodos que utilizan los diazótrofos para contender con el  $O_2$ . Frecuentemente un sólo diazotrofo emplea más de un método, y algunas estrategias son comunes a varios diazótrofos. A continuación se enlistan estas diferentes estrategias, las cuales se han clasificado como conductuales, barreras físicas y estrategias fisiológicas y bioquímicas (Gallon, 1992).

### 3A) ESTRATEGIAS CONDUCTUALES.

#### 3A.a) EVASION.

Los anaerobios estrictos, como *Clostridium spp.*, *Desulphovibrio spp.* y bacterias sulfo-fotosintéticas como *Chlorobium* y *Chromatium*, no pueden crecer en presencia de  $O_2$ , sin importar si están ó no fijando  $N_2$ . Crecen en ambientes en los cuales falta el  $O_2$ , tales como los suelos inundados o en ambientes acuáticos contaminados con materias orgánicas o ricos en formas reducidas de azufre. Esta estrategia evasiva la practican también anaerobios facultativos como *Klebsiella pneumoniae* y la bacteria púrpura no sulfurosa y fotosintética *Rhodobacter capsulatus*, la cual, aunque es capaz de crecer aeróbicamente, fija  $N_2$  sólo cuando crece de manera anaerobia o microaerobia.

### 3A.b) RESPUESTAS AEROTACTICAS, AGREGACION Y ASOCIACION CON OTROS MICROORGANISMOS.

Al menos un diazótrofo, *Azospirillum brasilense*, exhibe aerotaxis negativa. Al crecer en agar suave, este organismo altamente mótil forma una banda densa de células agregadas a una profundidad que depende de la concentración de  $O_2$  en la fase gaseosa (Barak, et al. 1982). Entre más alta es la concentración de  $O_2$  en la atmósfera por encima del agar, más profunda es la banda de *A. brasilense*. Este comportamiento refleja una necesidad de balancear el suministro de  $O_2$  para la generación de ATP por medio de la respiración, con la tolerancia al  $O_2$  de la nitrogenasa. No se sabe como es que *A. brasilense* detecta el  $O_2$  aunque parece estar relacionado al estado redox del citocromo  $c_1$  (Reiner y Okon, 1986).

La agregación de bacterias individuales puede limitar la difusión de oxígeno al centro del agregado. Además, la actividad respiratoria de muchas capas de células pueden proveer un ambiente microaeróbico que les puede permitir a las células del centro de la colonia fijar  $N_2$ . El  $N_2$  fijado y liberado por las células centrales puede sostener a toda la colonia, la cual parecería que esta fijando  $N_2$  aeróbicamente. La agregación celular se ha visto en varias bacterias diazotróficas como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Derxia gumosa* y *K. pneumoniae* (Hill, 1988). También se ha observado en varias cianobacterias donde, en especies heterocísticas, los heterocistos fijadores de  $N_2$  pueden ser los sitios de agregación. La limitación de luz en el centro de los agregados de cianobacterias puede inhibir la producción fotosintética de  $O_2$  en las células localizadas en esa región.

Muchas cianobacterias que en cultivos puros solo fijan  $N_2$  en condiciones microaeróbicas, crecen naturalmente como componentes de un complejo microbiano agregado que en conjunto puede fijar  $N_2$  aeróbicamente. Estos agregados contienen varias especies de cianobacterias y otros organismos heterotróficos. Es probable que en estos sistemas la fijación de  $N_2$  se lleve a cabo en microzonas depletadas de  $O_2$ , creadas por las reacciones que consumen  $O_2$  de cianobacterias asociadas y bacterias heterotróficas (Paerl y Prufert, 1987; Paerl y Carlton, 1988).

### 3B) BARRERAS FISICAS.

#### 3B.a) PAPEL DE LOS POLISACARIDOS.

Un número de diazótrofos están rodeados por cápsulas de polisacáridos como *Derxia gumosa* y *Gloethece*. Se pensaba que estas cápsulas podrían funcionar como una barrera al ingreso del  $O_2$ . Actualmente se piensa que el efecto podría ser contrario: Bergersen (1984) ha calculado que el material capsular extracelular pudiera funcionar para facilitar la penetración de  $O_2$  al centro de los agregados, por lo tanto sosteniendo un metabolismo aeróbico en este lugar. Otra forma que pudiera ser más efectiva para limitar la penetración de  $O_2$  a las células se ejemplifica por *Azotobacter vinelandii*. El tamaño de las células individuales de este organismo es mayor en cultivos crecidos diazotróficamente que en cultivos crecidos en  $NH_4^+$ . Esta diferencia resultaría en una menor relación de área a volumen que limitaría la difusión del  $O_2$  a las células individuales.

#### 3B.b) HETEROCISTOS Y VESICULAS.

Respecto a la fijación de  $N_2$ , las cianobacterias pueden dividirse en tres grupos. Un grupo consiste en aquellas que no fijan  $N_2$ , el segundo consiste de cianobacterias que fijan  $N_2$  sólo cuando crecen anaeróbicamente (con la evolución de  $O_2$  fotosintético inhibida), mientras que el tercer grupo consiste de cianobacterias capaces de fijar  $N_2$  aeróbicamente. Casi todas las cianobacterias del tercer grupo producen células no fotosintéticas especializadas y diferenciadas llamados heterocistos, donde se realiza la fijación de  $N_2$  (Haselkorn, 1978).

Las cianobacterias heterocísticas crecen como filamentos de células vegetativas indiferenciadas cuando se cultivan en medio que contenga  $NH_4^+$  como fuente de nitrógeno fijado. Sin embargo, si se transfieren a medio libre de nitrógeno, del 5 al 10% de las células vegetativas se diferencian para formar los heterocistos que tienen paredes gruesas que aparecen como huecos al mirarlos al microscopio de luz. La diferenciación toma un tiempo de una generación celular y los heterocistos están distribuidos uniformemente a lo largo del filamento cianobacterial. Los heterocistos producen una envoltura celular laminada y gruesa que funciona para limitar el ingreso del  $O_2$  atmosférico (Jensen y Cox, 1983; Murry et al., 1984). Debido a esto y dado que ellos no fotoproducen  $O_2$ ,



los heterocistos son un sitio ideal para la nitrogenasa. Sin embargo, los heterocistos no cuentan con la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa por lo cual no pueden fijar  $\text{CO}_2$ , así que dependen de las células vegetativas fotosintéticas adyacentes para un suministro de carbono fijado que pueda sostener la fijación de  $\text{N}_2$  (Haselkorn, 1978).

Estudios con mutantes de la cianobacteria heterocística *Anabaena* han mostrado que la envoltura del heterocisto es importante en la fijación de  $\text{N}_2$  aeróbica. La envoltura consiste de tres capas: una capa externa fibrosa de polisacárido, una capa central homogénea y una capa interna de glicolípido. El glicolípido contiene un número de componentes que no se encuentran en las células vegetativas (Wolk, 1982).

El microsimbionte fijador de  $\text{N}_2$  de los nódulos de plantas no leguminosas es un actinomiceto llamado *Frankia*. Dentro de la mayoría de los nódulos ó cuando se cultivan en medio libre de nitrógeno, las hifas de *Frankia* desarrollan unos abultamientos llamados vesículas. Dentro del nódulo, la forma de las vesículas está determinada por la planta hospedera, pero en cultivos puros tienen forma esférica (Tjepkema et al., 1986). Los cultivos puros de *Frankia* pueden fijar  $\text{N}_2$  aeróbicamente, en marcado contraste con las cultivos de rhizobia de los nódulos de las leguminosas, los cuales sólo pueden fijar  $\text{N}_2$  microaeróbicamente. Las cepas que no pueden producir vesículas son capaces de fijar  $\text{N}_2$  en cultivos microaeróbicos, pero su nitrogenasa es muy sensible a la inactivación por  $\text{O}_2$  (Murry et al., 1985). Tal parece que las vesículas son el sitio de fijación de  $\text{N}_2$  aerotolerante en *Frankia*. Estudios de incorporación de  $\text{O}_2$  sugieren que las vesículas están rodeadas por una barrera física a la difusión de  $\text{O}_2$  (Murry et al., 1984; Murry et al., 1985). Mas aún, las vesículas de *Frankia* están rodeadas por una capa laminada y por lo tanto muestran una similitud morfológica y funcional con los heterocistos de las cianobacterias. Estudios en cultivos continuos muestran que las vesículas expuestas a mayores concentraciones de  $\text{O}_2$  producen paredes más gruesas, y que la recuperación de la actividad de la nitrogenasa en cultivos microaeróbicos, que son transferidos abruptamente a condiciones aeróbicas pareciera ser dependiente del engrosamiento de las envolturas de las vesículas existentes (Harris y Silvester, 1992).

### 3B.c) ARQUITECTURA DE LOS NODULOS FIJADORES DE NITROGENO.

Los rhizobia que fijan  $N_2$  simbióticamente con su leguminosa hospedera están localizados dentro de nódulos que se desarrollan en las raíces de esas plantas. Aunque la morfología de los nódulos puede variar de leguminosa a leguminosa, los bacteroides (la forma diferenciada de los rhizobia que es capaz de fijar  $N_2$ ) ocupan células vegetales infectadas que están rodeadas de tejido cortical no-infectado. Dentro de los bacteroides se mantiene una concentración intracelular baja de  $O_2$  debido a la presencia de una barrera a la difusión de  $O_2$  en la corteza interna del nódulo. La corteza interna está formada por una capa de células con paredes celulares gruesas y con numerosos espacios gaseosos intercelulares entre ellos. A diferencia de las cianobacterias heterocísticas y de las vesículas de *Frankia*, la barrera a la difusión de  $O_2$  en los nódulos no es estática, pues se ha visto que responde a las condiciones ambientales que pudieran directa o indirectamente dañar a la nitrogenasa.

Para sostener una velocidad óptima de fijación de nitrógeno, los bacteroides requieren de  $O_2$  para la producción de ATP vía respiración. Sin embargo, si sólo actuara la difusión simple del  $O_2$ , la capa más externa de bacteroides sería la única que podría respirar. La entrega de  $O_2$  a la masa entera de células infectadas la hace la proteína leghemoglobina (Appleby, 1984; Bergersen, 1984). Dentro de la zona infectada, el  $O_2$  libre está presente en una concentración de entre 10 y 40 nM, minimizando la inactivación por  $O_2$  de la nitrogenasa en los bacteroides (Layzell et al., 1993). Sin embargo, a través de la acción de la leghemoglobina, se asegura un abastecimiento continuo de  $O_2$  el cual permite una respiración eficiente aunque limitada por  $O_2$ .

### 3C) ESTRATEGIAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

#### 3C.a) CONSUMO METABÓLICO DE $O_2$ .

Cualquier reacción metabólica que reduzca la concentración intracelular de  $O_2$  podría, en teoría, facilitar la fijación de  $N_2$ . Por ejemplo, el consumo de  $O_2$  por medio de respiración que produce ATP vía la fosforilación oxidativa. Muchos diazótrofos responden a las condiciones de limitación de  $N_2$  produciendo oxidasas terminales de alta afinidad (Bergersen, 1984).

Sin embargo, sólo en ciertos diazótrofos aerobios (*Azotobacter vinelandii* es el más ampliamente estudiado) existe evidencia de que el consumo respiratorio de  $O_2$  tiene un papel específico de proteger a la nitrogenasa de la inactivación por  $O_2$ , independientemente de cualquier papel en la generación de ATP.

### 3C.b) PROTECCION RESPIRATORIA.

En *Azotobacter vinelandii* se ha estudiado el fenómeno de la protección respiratoria. Esta bacteria ( que es un aerobio estricto) tiene una cadena respiratoria ramificada que contiene al menos dos oxidasas terminales llamadas citocromo d y citocromo o (Hoffman et al., 1979). El citocromo d tiene una baja afinidad por  $O_2$ , mientras que el citocromo o es una oxidasa con una alta afinidad y por lo tanto, es la oxidasa usada en microaerobiosis. La reducción del  $O_2$  por el citocromo d, por otra parte, ocurre a una gran velocidad. Bajo condiciones aeróbicas, esta oxidasa es responsable de reducir rápidamente casi todo el  $O_2$  que difunde por la membrana citoplásmica, manteniendo al citoplasma anaeróbico. El papel del citocromo d en la protección respiratoria ha sido documentado por métodos genéticos. Kelly et al. (1990) han aislado mutaciones inducidas por el transposón Tn5 en los genes de las subunidades I y II del citocromo d (*cydA* y *cydB*). Al contrario de lo que sucede en la cepa silvestre, las correspondientes mutantes fueron incapaces de crecer diazotóricamente en aire, mientras que no se afectó su crecimiento aeróbico en medio conteniendo amonio como fuente de nitrógeno. Cuando la concentración de  $O_2$  se disminuyó a 1.5%, las mutantes crecieron como la cepa silvestre con  $N_2$  o  $NH_4^+$  como fuente de nitrógeno. Esto muestra claramente que el citocromo d es esencial para la fijación de nitrógeno en concentraciones altas de  $O_2$  tales como las que se encuentran en el aire, mientras que no es esencial para el metabolismo energético que sostiene el crecimiento aeróbico usando una fuente de nitrógeno fijado. La conclusión es que el citocromo d brinda una protección respiratoria a la nitrogenasa debido a su alta velocidad respiratoria (Kelly et al., 1990). La oxidasa alternativa (citocromo o) es la encargada de la conservación de energía respiratoria en la mutantes *cyd*-.

### 3C.c) PRODUCCION DE ENERGIA EN TENSIONES BAJAS DE OXIGENO.

*Klebsiella pneumoniae* fue escogida como el paradigma para explicar el fenómeno de la producción de energía a través de la respiración en concentraciones bajas de O<sub>2</sub> para sostener la actividad de la nitrogenasa. Esto puede sonar sorprendente, ya que esta enterobacteria es un anaerobio facultativo que se cree que fija N<sub>2</sub> sólo bajo condiciones anaeróbicas estrictas y que genera energía para este proceso vía metabolismo fermentativo. Sin embargo, Hill et al. (1990) han demostrado que si se alimenta a la bacteria con una fuente de carbono no fermentable también puede reducir acetileno eficientemente en condiciones microaeróbicas, y que la ubiquinol oxidasa llamada citocromo d es esencial para esta actividad. Hill et al. (1990) introdujeron todo el cluster de genes *nif* de *K. pneumoniae* en una cepa silvestre de *Escherichia coli* y una cepa mutante *cyd*<sup>-</sup>, y crecieron estas cepas en medio mínimo con lactato/formato y en concentraciones de O<sub>2</sub> de 0 a 6 kPa. No se detectó actividad de nitrogenasa en la cepa *cyd*<sup>-</sup>*nif*<sup>+</sup>, la cepa *cyd*<sup>+</sup>*nif*<sup>+</sup> mostró un incremento en la actividad de la nitrogenasa en tensiones de O<sub>2</sub> altas, alcanzando un máximo de actividad a los 3 kPa pO<sub>2</sub>. Tensiones mayores de O<sub>2</sub> a 6 kPa fueron incompatibles con la actividad de nitrogenasa. Es importante mencionar que tanto *E. coli* y *K. pneumoniae* poseen una cadena respiratoria que consta de dos ramas que terminan con ubiquinol oxidasas de los tipos bd y bo (citocromos d y o, respectivamente; Smith et al. 1990, Puustinen et al., 1991). El citocromo d es una oxidasa de alta afinidad mientras que el citocromo o es una oxidasa de baja afinidad (contrario a lo que sucede en *A. vinelandii*). El experimento anterior claramente demuestra que el citocromo d sostiene la fijación de nitrógeno por medio de la producción de energía en condiciones microaeróbicas. En tensiones bajas de O<sub>2</sub>, la oxidasa bo (de baja afinidad) si es que se expresa en estas condiciones, es muy ineficiente para compensar la falta del citocromo d y también es incapaz de brindar protección respiratoria a la nitrogenasa por arriba de 6 kPa de pO<sub>2</sub>. En conclusión, esta especie enterobacteriana se puede usar como modelo para simular la situación que prevalece en virtualmente todos los diazótrofos aerobios y microaerobios: la conservación de energía ocurre a concentraciones de oxígeno que son muy bajas para no inactivar la nitrogenasa pero suficientemente altas para permitir que una oxidasa de alta afinidad funcione eficientemente. La respiración en ambientes microaeróbicos también juega un papel importante en la fijación de nitrógeno que ocurre en los bacteroides que habitan las raíces de las leguminosas, como se discute a continuación.

#### 4) RESPIRACION BACTERIANA.

Las bacterias aeróbicas generalmente son capaces de hacer uso de un amplio rango de concentraciones de oxígeno para la conservación de energía por respiración. Esta flexibilidad se las da el hecho de contar con dos o más oxidasas terminales que tienen diferentes afinidades para el  $O_2$ . Los equivalentes reductores son derivados de sustratos de carbono por la acción enzimática de varias deshidrogenasas que envían los electrones hacia la poza de quinona/quinol dentro de la membrana citoplásmica. De aquí, los electrones fluyen hacia las oxidasas terminales que están integradas en la membrana, en donde se lleva a cabo la reducción del  $O_2$ . En las bacterias se conocen dos tipos principales de oxidasas terminales, las quinol oxidasas y las citocromo c oxidasas (Poole, 1988). Las quinol oxidasas reciben los electrones directamente de la poza de quinol, mientras que las citocromo c oxidasas reciben los electrones del citocromo c que ha sido reducido anteriormente por la ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa (también llamada complejo citocromo bcl; Trumpower, 1990). Por lo tanto, cuando las bacterias emplean más de una oxidasa terminal, la cadena respiratoria es ramificada, y el punto de ramificación es en la poza de quinol (por ejemplo, cuando dos quinol oxidasas o una citocromo c oxidasa más una quinol oxidasa están presentes), o bien es a nivel del complejo bcl (e.g. cuando dos citocromo c oxidasas están presentes). En contraste a lo que ocurre en mitocondria donde sólo está presente una cadena respiratoria, la existencia de una cadena respiratoria ramificada es la regla en las bacterias aeróbicas.

En los últimos años se ha generado una gran cantidad de información respecto a la composición de subunidades, el contenido de cofactores y la estructura primaria de las oxidasas bacterianas. Las oxidasas terminales consisten de un mínimo de tres subunidades, de las cuales las subunidades I y II son catalíticas (Saraste, 1990; Saraste et al., 1991; Gennis, 1991). La subunidad II lleva el sitio de unión del citocromo c y contiene un átomo de cobre (el llamado centro  $Cu_A$ ). La subunidad I une dos hemo y un cobre ( $Cu_B$ ) que está formando un complejo con uno de los dos hemo del centro metálico binuclear Fe-Cu (Babcock y Wikström, 1992; Shapleigh et al., 1992). Las ubiquinol oxidasas tienen una composición similar a las citocromo c oxidasas. La secuencia de aminoácidos de la subunidad I de las ubiquinol oxidasas comparte un alto grado de similitud con la subunidad I de las citocromo c oxidasas (Chepur et al., 1990; Saraste et al., 1991). En particular 6 residuos histidina están conservados cuyos grupos imidazol funcionan como ligandos al grupo hemo y al centro binuclear hemo- $Cu_B$  (Minagawa et al., 1992). La mayor diferencia entre las citocromo c oxidasas

y las ubiquinol oxidasas es la ausencia del centro  $Cu_A$  en estas últimas; por lo tanto, sus subunidades II no poseen los aminoácidos que unen al centro  $Cu_A$  y tampoco tienen los aminoácidos que unen al citocromo c (Chepuri et al., 1990; Santana et al., 1992). No se sabe donde se une el ubiquinol, y, por lo tanto, la función de la subunidad II en esta clase de oxidasas queda todavía por elucidarse.

Existe una gran variación respecto a los tipos de hemo que están unidos a la subunidad I. Se han encontrado hemos tipo a, b y o, y los dos hemos de la subunidad I pueden ocurrir casi en cualquier combinación dando lugar a oxidasas tipo bo, aa<sub>3</sub> y ao. Se está haciendo evidente que la designación de las oxidasas por el tipo de hemo que presentan no es muy significativa. Esta designación ni es indicativa de la afinidad hacia el O<sub>2</sub>, ni es diagnóstico de la clase a la cual la oxidasa pertenece (por ejemplo, ubiquinol versus citocromo c oxidasas).

A su vez, los citocromos tipo c unen al protohemo de manera covalente vía enlaces tioéter a dos cisteínas en la apoproteína, y un residuo de histidina y de metionina de la apoproteína usualmente sirven como el quinto y sexto ligandos al hierro del hemo (Moore y Pettigrew, 1990). Los citocromos c funcionan como proteínas que transfieren electrones en el lado exterior de la membrana citoplasmática (Ferguson, 1988). Por lo tanto, cuando son solubles se les encuentra en el espacio periplásmico, o cuando están anclados a la membrana, su dominio que une al grupo hemo está localizado en el lado periplásmico de la membrana citoplasmática (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1990; Bott et al., 1991). Como mencioné anteriormente, el citocromo c transfiere electrones del complejo bc<sub>1</sub> a la citocromo oxidasa. En este contexto es de notarse que las oxidasas de unas cuantas bacterias son multifuncionales pues un dominio de citocromo c está fusionado a una subunidad de oxidasa (Buse et al., 1989; Qureshi et al., 1990). Estas oxidasas no necesariamente requieren de un citocromo c periplásmico, pero esta posibilidad no se ha probado rigurosamente.

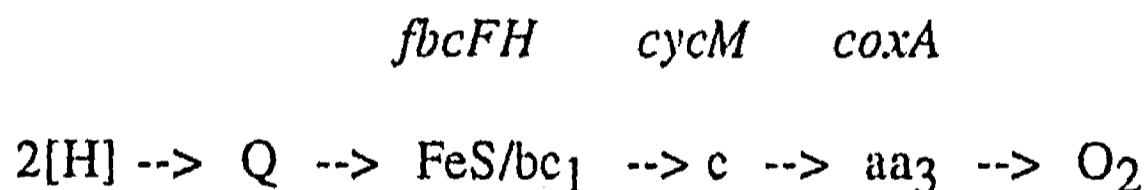
## 5) CADENAS RESPIRATORIAS DE RHIZOBIUM EN VIDA LIBRE Y EN SIMBIOSIS.

### 5A) VIDA LIBRE.

En primer lugar se discutirá lo que se conoce de las cadenas respiratorias de *Bradyrhizobium japonicum* y los genes que codifican para sus componentes, y en seguida se discutirá lo que se conoce en *Rhizobium etli*.

Desde 1958 se sabe que el patrón de hemoproteínas de cultivos aeróbicos de *B. japonicum* era diferente del presente en los bacteroides que se encuentran en los nódulos de las raíces de soya (Appleby y Bergersen, 1958; O'Brian y Maier, 1989). En particular, los citocromos aa<sub>3</sub> y o, cuya función como oxidasa en células aeróbicas se demostró por espectros de acción fotoquímica, se encontraron ausentes en los bacteroides (Appleby, 1984). Keister y Marsh (1990) mostraron que varias cepas de *B. japonicum* retenían a los citocromos aa<sub>3</sub> y o durante la simbiosis pero se desconoce si es que estas oxidasas son funcionales en el ambiente del nódulo radicular.

La presencia de una oxidasa tipo aa<sub>3</sub> en células de *B. japonicum* crecidas aeróbicamente sugirió la existencia de una cadena respiratoria de transporte de electrones similar a la que se encuentra en mitocondria y en muchas bacterias aeróbicas:



La prueba definitiva de esta aseveración provino del aislamiento y mutagénesis de genes que codifican para los componentes de esta vía. El operón *fbcFH* contiene los genes de la proteína hierro azufre Rieske y de los citocromos b y c<sub>1</sub> de la ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (Thöny-Meyer et al., 1989, 1991). El gene *cycM* codifica para un citocromo c de 20 kDa el cual, al contrario de la mayoría de citocromos c bacterianos que son solubles, está anclado a la membrana (Bott et al., 1991). La subunidad I de la citocromo c oxidasa tipo aa<sub>3</sub> está codificada por el gene *coxA* (Bott et al., 1990; Gabel y Maier, 1990). Mutaciones en el gene *cycM* ó en los genes estructurales del citocromo aa<sub>3</sub> no tienen fenotipo simbiótico (Fix<sup>+</sup>), lo cual

muestra que la rama respiratoria de los citocromos c-aa<sub>3</sub> no es esencial para la simbiosis (O'Brian y Maier, 1987; Nautiyal et al. 1989; Bott et al., 1990, 1991). Esto es consistente con el fuerte descenso o la ausencia completa de citocromo aa<sub>3</sub> detectable espectroscópicamente en bacteroides o en células crecidas microaeróbicamente de la mayoría de cepas de *B. japonicum* (Appleby, 1984; Keister y Marsh, 1990; Preisig et al., 1993).

## 5B) SIMBIOSIS.

El primer descubrimiento importante sobre una cadena respiratoria específica de la simbiosis proviene del hecho de que mutaciones por inserción en los genes del citocromo bc<sub>1</sub> (*fbcFH*) produjeron un fenotipo Fix<sup>-</sup> (Thöny-Meyer et al., 1989). Este resultado indicaba la existencia de una rama de la cadena respiratoria que se expresaba durante la simbiosis y que se ramificaba a nivel del complejo bc<sub>1</sub>. Por analogía con todas las cadenas respiratorias que se ramifican a partir de bc<sub>1</sub> conocidas, esta rama debería de consistir de un citocromo c y una citocromo c oxidasa. Esta predicción, esto es, la presencia de un citocromo c, fue corroborado por el fenotipo Fix<sup>-</sup> de una mutante por Tn5 de *B. japonicum* que aparentemente tiene un defecto en la biosíntesis de todos los citocromos tipo c, con excepción del citocromo c<sub>1</sub> (Ritz et al., 1993). Tres citocromos c solubles (c<sub>550</sub>, c<sub>552</sub> y c<sub>555</sub>) están presentes en bacteroides ó en células crecidas anaeróbicamente en nitrato como aceptor de electrones terminal (Daniel y Appleby, 1972; Appleby, 1984; Ranaweera y Nicholas, 1985), y fueron subsecuentemente purificados (Appleby et al., 1991; Tully et al., 1991). Debido a sus propiedades de unión a CO los citocromos c<sub>552</sub> y c<sub>555</sub> (antes llamados c<sub>554</sub>) se pensó que pudieran ser los candidatos para formar parte del complejo oxidasa simbiótica del bacteroide. Sin embargo, se pudo descartar esta hipótesis pues mutaciones en los genes *cycA* (c<sub>550</sub>), *cycB* (c<sub>552</sub>), y *cycC* (c<sub>555</sub>), y dobles mutantes (*cycB*<sup>-</sup> *cycC*<sup>-</sup>) ó triples mutantes (*cycA*<sup>-</sup> *cycB*<sup>-</sup> *cycC*<sup>-</sup>) mostraron un fenotipo Fix<sup>+</sup>, lo cual los excluye como componentes de la oxidasa simbiótica.

Recientemente se ha identificado, clonado y secuenciado un locus genético que contiene a los genes *fixNOQP* de *B. japonicum*, el cual es un candidato idóneo para codificar a los componentes del complejo citocromo oxidasa específica de simbiosis (Preisig et al., 1993). Genes similares a estos fueron descubiertos primero en *Rhizobium meliloti* (Boistard et al., 1991; Kahn et al., 1993) pero se desconocían su función y su secuencia. En



*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y *Azorhizobium caulinodans* se han identificado genes homólogos (Schlüter et al., 1993; Mandon et al., 1994). Los genes *fixNOQP* de *B. japonicum* se encuentran hacia el extremo 5' de los genes regulatorios *fixLJ* y se transcriben divergentemente a estos (Preisig et al., 1993). De hecho, una fusión *fixP-lacZ* insertada en el cromosoma se expresa microaeróbicamente, pero no aeróbicamente, de una manera dependiente de *fixLJ* (O. Preisig, datos no publicados).

Las siguientes características fenotípicas emergieron de un análisis de mutantes por inserción en el operón *fixNOQP*: (i) los nódulos producidos fueron  $\text{Fix}^-$  y contenían muy pocos bacteroides; (ii) las células crecidas microaeróbica o anaeróbicamente mostraron un descenso del 70% en la actividad de oxidasa con TMPD (N,N,N',N',tetrametil fenilenediamina) como donador artificial de electrones, a diferencia de lo que ocurre con células crecidas aeróbicamente; (iii) los espectros diferenciales de CO indicaron pequeñas alteraciones en los citocromos tipos b y c; (iv) al menos uno (y probablemente sean dos) citocromo(s) tipo c se encuentran ausentes de la fracción membranal aislada de células crecidas microaeróbica o anaeróbicamente.

Las secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de ADN de los productos génicos de los genes *fixNOQP* les permitieron concluir que:

(i) FixN es una subunidad I característica de una citocromo oxidasa que tiene al menos 12 hélices transmembranales, 4 histidinas conservadas como ligandos para el centro hemo- $\text{Cu}_B$ , y otras histidinas que pudieran unir al menos otro hemo adicional, posiblemente un hemo b;

(ii) FixO es un nuevo tipo de citocromo c monohemo anclado a membrana;

(iii) FixQ es una proteína de 54 aminoácidos anclada a membrana que no presenta otros motivos aparentes;

(iv) FixP es un citocromo tipo c dihemo anclado a la membrana con una duplicación interna de secuencia que presenta similitud a la clase  $c_6$  de citocromos tipo c.

Estos datos parecen sugerir que los genes *fixNOQP* codifican para un complejo citocromo oxidasa nuevo, que se induce en condiciones microaeróbicas y que es esencial en la simbiosis y que contiene hemoproteínas tipos b y c (Preisig et al., 1993). Este nuevo complejo oxidasa terminal tiene todas las propiedades requeridas para encajar como una rama respiratoria dependiente del complejo  $bc_1$  que opera en microaerobiosis y en los bacteroides que habitan los nódulos radiculares.

Faltan por estudiar las características bioquímicas de esta oxidasa. En particular, será interesante probar si es que es capaz de reducir  $O_2$  transportado por la leghemoglobina oxidada.

### 5C) OXIDASAS ALTERNATIVAS.

Al estar estudiando al gene *coxA* de *B. japonicum*, se descubrió otra región génica que aparentemente codificaba para una segunda oxidasa terminal que aunque era diferente del citocromo  $aa_3$ , pertenecía a la superfamilia de oxidasas hemo/cobre (Bott et al., 1992). Por análisis de la secuencia nucleotídica de esta región se descubrió al operón *coxMNOP*. El producto del gene *coxM* comparte una similitud significativa con la subunidad II de las citocromo c oxidasas de otros organismos: en particular, todos los ligandos de  $Cu_A$  propuestos están conservados, así como los residuos de aminoácidos acídicos que pudieran estar involucrados en la unión del citocromo c. El gene *coxN* codifica para un polipéptido con una identidad del 40% a los representantes de la subunidad I, incluida la proteína CoxA: las seis histidinas que se supone unen a los grupos prostéticos (dos grupos hemo y un  $Cu_B$ ) están totalmente conservadas. Los productos génicos de los genes *coxO* y *coxP* son homólogos ambos a las proteínas de la subunidad III. Una mutante *coxN<sup>-</sup>* de *B. japonicum* no exhibió defectos obvios en crecimientos en vida libre, aeróbicos o durante la simbiosis con la soya. Esto muestra que los genes *coxMNOP* no son esenciales para la respiración del bacteroide que se encuentra fijando  $N_2$ . No se sabe a ciencia cierta bajo que condiciones de crecimiento funciona esta oxidasa alternativa. Se ha especulado (Bott et al., 1992) que pudiera ser equivalente al citocromo  $o$ , el cual se ha reportado que se expresa en células aeróbicas junto con el citocromo  $aa_3$  (Appleby, 1984), pero no existe una confirmación bioquímica al respecto.

Otra oxidasa de *B. japonicum*, el citocromo P-450, alguna vez se pensó que pudiera formar parte de la oxidasa simbiótica (Appleby, 1984). Sin embargo, el gene para esta proteína se encontró recientemente en el laboratorio del Dr. Keister y una mutación en él no tiene efecto detectable en la fijación biológica del  $N_2$  (Tully y Keister, 1993).

El esquema propuesto en la fig. 1 implica que se originan tres ramificaciones respiratorias del complejo citocromo  $bc_1$ ; aún así, las bacterias con una mutación en *fbcFH* exhiben sólo una velocidad de crecimiento reducida en cultivos crecidos aeróbicamente (Thöny-Meyer et

al., 1989). Es posible especular sobre la existencia de una cuarta oxidasa que tendría que ser una quinol oxidasa (fig. 1). En este contexto es interesante aprender de una publicación de Frustaci et al. (1991) que una cepa mutante en la enzima delta-aminolevulinato sintetasa ( $h\epsilon mA^-$ ) de *B. japonicum* (Guerinot y Chelm, 1986) es capaz de crecer aeróbicamente en medio adicionado de un poco de extracto de levadura y sin la adición de delta-aminolevulinato y que estas células no tienen citocromos detectables. Esta conclusión implica que *B. japonicum* es capaz de crecer aeróbicamente usando una oxidasa que no contiene grupos hemo. De hecho, una flavoproteína pudiera servir para esta función; tal proteína se ha pensado que está involucrada en proporcionar protección respiratoria a los bacteroides fijadores de  $N_2$  (Appleby, 1984) y ha sido purificada (Maier et al., 1990). Aunque esta flavoproteína puede oxidar *in vitro* al citocromo c reducido (Maier et al., 1990), un citocromo c no necesariamente sería el donador fisiológico de electrones *in vivo*. De manera análoga, se ha reportado una ramificación alternativa sin citocromos presente en el sistema respiratorio de *Rhizobium etli* (antes *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*) por Barquera et al. (1991b). Finalmente, es relevante notar que aunque no se ha detectado una oxidasa conteniendo hemo tipo d en células de *B. japonicum* en vida libre o en bacteroides, esta oxidasa parece estar presente en otros rhizobia (Barquera et al., 1991a; Kitts y Ludwig, 1993).

## 6) CADENAS RESPIRATORIAS DE *Rhizobium etli*.

*Rhizobium etli* contiene citocromos tipos b y c, y dos citocromo oxidases terminales, el citocromo  $\alpha$  y el citocromo  $aa_3$  (figura 2, Soberón et al., 1989). Ambas citocromo oxidases fueron identificadas por espectros de foto-disociación y por ensayos de unión de  $O_2$ . En *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum* se ha observado la presencia de una tercera citocromo oxidasa terminal, el citocromo d (Barquera et al., 1991a; Kretoovich et al., 1973). Además, se ha documentado la existencia de una vía respiratoria que no contiene citocromos, la cual tentativamente se ha propuesto que contiene una flavoproteína oxidasa dependiente de NADH (Barquera et al., 1991b). Esta vía presenta una muy baja afinidad hacia el  $O_2$  ( $K_{m_{app}}=80 \mu M$ , Barquera et al., 1991b).

La expresión de los genes de las diferentes oxidases terminales de *Rhizobium etli* en vida libre está regulada por  $O_2$  como ha sido reportado en otras especies bacterianas (Poole, 1983). El citocromo  $aa_3$  se expresa en cultivos aeróbicos en crecimiento exponencial, pero se reprime en

condiciones microaeróbicas y crecimiento estacionario, condiciones en las que se induce el citocromo *d* (Barquera et al., 1991; Soberón et al., 1989). El citocromo *o*, a su vez, se expresa tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas. La flavoproteína oxidasa dependiente de NADH se expresa en cultivos aeróbicos y semi-anaeróbicos, pero no se detecta en cultivos anaeróbicos o en bacteroides (Barquera et al., 1991b).

El papel de cada una de estas oxidasas terminales en el establecimiento de una simbiosis efectiva se ha empezado a estudiar por medio del aislamiento de mutantes.

La mutante CFN031 expresa niveles reducidos de citocromo *o* y presenta expresión del citocromo *aa<sub>3</sub>* en condiciones microaeróbicas. Esta mutante está afectada en su crecimiento vegetativo y la proliferación dentro de las células vegetales está drásticamente reducida. Estos datos sugieren que el citocromo *o* pudiera jugar un papel importante durante el proceso de infección de las células vegetales por el *Rhizobium* (Soberón et al., 1990).

Las mutantes CFN4202 e IFC01 presentan niveles disminuidos de citocromos tipo *c*; forman nódulos pero no infectan (CFN4202) o infectan muy poco (IFC01), y ninguna de ellas es capaz de fijar N<sub>2</sub> (Soberón et al., 1993; García, 1992 y Tabche, 1995). Se ha reportado que ambas mutantes están afectadas en el gene *cycH* (Tabche, 1995), el cual se piensa que codifica, junto con los genes *cycJ*, *cycK* y *cycL* para una enzima que tiene como función la de unir covalentemente el grupo hemo a los citocromos tipo *c* (para una revisión, consultar a Thöny-Meyer, 1994). Otra mutante (CFN4201) también presenta niveles muy reducidos de citocromos tipo *c* y tiene un fenotipo Fix<sup>-</sup>. Esta mutante está afectada en el gene *cycW* (G. Aguilar, comunicación personal), el producto del cual se sugiere que forme parte de un translocador de una molécula necesaria para la biogénesis de los citocromos tipo *c*, junto con el producto del gene *cycV* (Thöny-Meyer, 1994). El fenotipo Fix<sup>-</sup> de estas tres mutantes afectadas en la biogénesis de los citocromos tipo *c* sugiere que existe una vía respiratoria que contiene citocromos tipo *c* y que es esencial en los primeros estadios de la interacción simbiótica y para la actividad de la nitrogenasa.

Por último, la mutante CFN037 fue seleccionada por su capacidad incrementada para oxidar al colorante TMPD. El patrón de citocromos en cultivos crecidos aeróbicamente es similar al que presentan los cultivos de la cepa silvestre (Soberón et al., 1990). Los cultivos de esta mutante crecidos en microaerobiosis presentan una alta concentración de citocromo *aa<sub>3</sub>* a diferencia de la cepa silvestre en la cual la expresión de este

citocromo se encuentra reprimida. Además, presenta tres veces más actividad de la oxidasa dependiente de ascorbato + TMPD (Soberón et al., 1990). El fenotipo simbiótico de esta cepa es  $\text{Fix}^{++}$ . Presenta su máximo de actividad de nitrogenasa dos días antes que la cepa silvestre. Quizás debido a esta fijación más temprana, las plantas inoculadas con la cepa CFN037 presentan un incremento del 22% en el contenido de nitrógeno total respecto al observado con la cepa silvestre. También se observó que los bacteroides producidos por esta cepa se desarrollan más rápidamente, son más grandes y contienen más depósitos intracelulares de PHB que los producidos por la cepa silvestre (Soberón et al., 1990). En *B. japonicum*, mutantes en el citocromo  $\text{aa}_3$  son capaces de establecer una simbiosis efectiva, sugiriendo que esta oxidasa juega un papel mínimo en la fijación simbiótica de nitrógeno (Nautiyal et al., 1989; O'Brian et al., 1987). Es posible que en la cepa CFN037 se encuentre afectada la expresión de otros citocromos que sean los responsables de su fenotipo simbiótico.

## 7) MECANISMOS DE LA REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE CITOCROMOS EN BACTERIAS.

En la mayoría de los casos, no se sabe como es que los diazótrofos detectan el  $\text{O}_2$ , pero trabajo reciente en la bacteria *E. coli* (revisado por Spiro y Guest, 1991) pudiera proveer algunos elementos de juicio. En este organismo se han identificado dos sistemas de la regulación genética de los citocromos por  $\text{O}_2$ . El primero, llamado Arc ("aerobic respiration control"), regula la síntesis de las citocromo oxidasas terminales. Es un sistema de dos componentes, similar al sistema de regulación por nitrógeno NtrB/NtrC. El sistema Arc está compuesto por dos proteínas: ArcA y ArcB (Iuchi et al., 1989). La proteína ArcB es una proteína anclada a la membrana que se autofosforila (ArcB-P) en respuesta a la limitación por  $\text{O}_2$ . No reacciona directamente con el  $\text{O}_2$ , más bien parece que detecta cambios en el estado redox de un acarreador de electrones. ArcB-P cataliza la fosforilación de su pareja regulatoria, ArcA, el cual a su vez regula la expresión genética. Por ejemplo, ArcA-P inhibe la expresión de los genes que codifican para la citocromo  $\text{c}$  oxidasa, la cual tiene una afinidad relativamente baja para el  $\text{O}_2$ . ArcA-P activa la expresión de los genes que codifican para la citocromo  $\text{d}$  oxidasa, que tiene una mayor afinidad hacia el  $\text{O}_2$  (Iuchi et al., 1990).

En *R. meliloti*, la activación de la transcripción de los genes *nif* es inhibida por el  $\text{O}_2$  a través de su efecto sobre la proteína NifA. NifA responde al oxígeno de dos formas. Primero, la proteína es inactivada por

oxígeno. En segundo lugar, la síntesis de la proteína NifA está regulada por los genes *fixLJ*. Los productos de estos genes funcionan de una manera similar al sistema Arc (David et al., 1988). FixL es una proteína membranal que sensa el O<sub>2</sub> y cataliza su autofosforilación y la fosforilación de FixJ (Stock et al., 1990). FixJ-P es un regulador positivo de la transcripción de *nifA*. FixL es una proteína que contiene un grupo hemo que puede unir O<sub>2</sub> y se ha propuesto que es el grupo hemo el que le permite "sensar" al O<sub>2</sub> (Gilles-Gonzalez et al., 1991). Sin embargo, la regulación de la síntesis de NifA a través de FixLJ no ocurre en todos los rhizobia. Aunque se ha encontrado a los genes *fixLJ* en *B. japonicum*, este operón no regula directamente la síntesis de NifA en este organismo (Anthamatten y Hennecke, 1991).

El segundo sistema regulatorio por O<sub>2</sub> en *E. coli* es el sistema FNR ("fumarate and nitrate reduction": Cotter et al., 1990). Este consiste de una sola proteína, Fnr, la cual en su estructura y acción se asemeja a la proteína activadora de genes catabólicos que une AMP cíclico (CAP), la cual actúa como un regulador positivo de varios operones. CAP produce un doblamiento en el ADN y por lo tanto facilita la unión de la ARN polimerasa dependiente de ADN a la región promotora y la formación del complejo abierto necesario para el inicio de la transcripción (Lilly, 1991). Se piensa que bajo condiciones anaeróbicas, Fnr sufre un cambio conformacional que le permite unirse, como CAP, a secuencias nucleotídicas específicas en los promotores de los genes "blanco". La expresión de algunos genes, tales como los que codifican para las enzimas terminales de las cadenas de transporte de electrones anaeróbicas (fumarato reductasa, nitrito y nitrato reductasas), son activadas por la forma anaeróbica de Fnr en *E. coli*; la expresión de otros genes, como el que codifica para la citocromo *c* oxidasa, es inhibida. No está claro cual es el mecanismo que le permite a la proteína responder al O<sub>2</sub>, pero la presencia de una región amino-terminal rica en cisteínas, acoplada a su habilidad para unir hierro ha llevado a sugerir que la conversión entre las formas aeróbica y anaeróbica involucra la oxidación y reducción del ion metálico hierro. En este respecto, Fnr se parece a NifA de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Se han encontrado proteínas semejantes a Fnr (Fnr-like) en varios diazótrofos (Anthamatten et al., 1992). Estas incluyen a FixK, el producto de un gene simbiótico necesario para la fijación de N<sub>2</sub> en *R. meliloti*, *B. japonicum* y *A. caulinodans*, y FnrN en *R. leguminosarum* *bv. viciae* (Batut et al., 1989; Anthamatten et al., 1992; Kaminski et al., 1991; Colonna-Romano et al., 1990; Schlüter et al., 1993). En *R. meliloti*, FixK actúa como un regulador positivo del operón *fixNOQP* y controla negativamente su propia

expresión así como la de *nifA* (Batut et al., 1989). La síntesis de FixK es máxima cuando la tensión de O<sub>2</sub> es baja, y está regulada por el sistema *fixLJ* antes descrito. Su papel como proteína reguladora se predijo de su homología con CAP y Fnr. En particular, su extremo carboxilo terminal contiene un motivo hélice-vuelta-hélice similar al de Fnr, lo cual sugiere que FixK pudiera reconocer secuencias de ADN idénticas a las reconocidas por Fnr. También se ha encontrado una secuencia similar localizada 480 bases hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción de *fixK* y se cree que está involucrada en el control negativo de la expresión de *fixK* (Waelkens et al., 1992). Aunque FixK y Fnr son homólogos a todo lo largo de sus secuencias, los residuos de cisteínas presentes en el extremo amino terminal que se cree son responsables de la sensibilidad al O<sub>2</sub> de Fnr, no se encuentran en FixK. Por lo tanto, mientras el control por O<sub>2</sub> de la expresión de los genes *nif* se ejerce en dos niveles de la cascada reguladora, es decir, a nivel de FixLJ y a nivel de NifA, es posible que el control por O<sub>2</sub> de la expresión de *fixNOQP* este mediado solo por la regulación de FixK por FixL y FixJ. Otra posibilidad es que la proteína FixK pudiera sensor una señal reguladora todavía no identificada y diferente al O<sub>2</sub>.

## II.- OBJETIVO.

Como se mencionó previamente, existe una íntima relación entre la respiración bacteriana y la fijación de nitrógeno en la simbiosis establecida entre *Rhizobium* y las plantas leguminosas. La respiración provee la energía necesaria para que se lleve a cabo la reacción de la fijación de nitrógeno, además de que pudiera ser un mecanismo que regule la concentración intracelular de  $O_2$ , evitando de esta manera la inactivación de la nitrogenasa (Appleby, 1984). Por la existencia de esta relación es viable pensar que se puede aumentar la efectividad simbiótica de los *Rhizobia* si se manipula la expresión de sus citocromos. Esta manipulación se facilitará si se identifican cuales son las señales ambientales y metabólicas y los mecanismos moleculares implicados en la expresión de las diferentes cadenas respiratorias. De manera práctica, se ha comprobado que algunas mutantes que derregulan la expresión de citocromos fijan más nitrógeno (Soberón et al., 1989, 1990). El conocimiento obtenido de la expresión de los citocromos nos permitirá plantear estrategias para el diseño de cepas con mejores capacidades simbióticas.

### OBJETIVO GENERAL

Este trabajo es parte de un proyecto más amplio del grupo de investigación Dr. Mario Soberón que pretende estudiar las señales involucradas y los mecanismos moleculares que regulan la expresión genética de las diferentes cadenas respiratorias de *Rhizobium etli* en vida libre y durante la simbiosis.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Caracterizar en más detalle la expresión de las diferentes cadenas respiratorias en mutantes previamente aisladas y
- 2) Clonar y caracterizar los genes mutados de dichas cepas.



### III. ARTICULO.

*Rhizobium etli* cytochrome mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases and enhanced symbiotic nitrogen accumulation.

Juan Miranda-Ríos, Jorge Membrillo-Hernández, María Luisa Tabche and Mario Soberón\*.

Running Title: Cytochrome expression in *Rhizobium*.

Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 510-3, 62271, Cuernavaca, Morelos, México.

Tel.: (52)(73)114900 ext. 287. FAX: (52)(73)172388.

E-mail address:mario@ibt.unam.mx

\*Corresponding author.

## ABSTRACT

A method to isolate mutants with derepressed expression of cytochrome oxidases and better symbiotic performance is presented. A mutant of *R. etli*, CFN030, isolated by its azide-resistant phenotype, was obtained by transposon Tn5-*mob* mutagenesis. This mutant has a derepressed expression of cytochrome aa<sub>3</sub>, higher respiratory activities when cultured microaerobically and an improved symbiotic nitrogen fixation capacity. This phenotype was similar to the previously described mutant (CFN037), which was isolated by its increased capacity to oxidize N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) (Soberón, M. et al., J. Bacteriol. 172: 1676-1680, 1990). We show here that although both mutants have a similar symbiotic phenotype, they are affected in different genes. Strain CFN030 has the Tn5 inserted in the chromosome while in strain CFN037 the transposon was located in plasmid b. Cytochrome spectral analysis of both mutant strains in the post-exponential phase of growth, showed the expression of an additional terminal oxidase (cbb<sub>3</sub>) that is not expressed in the wild-type strain.

## INTRODUCTION

Symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium* species is a high energy-consuming process, requiring at least 16 molecules of ATP to reduce one molecule of N<sub>2</sub>. Bacterial respiration is closely associated with symbiotic nitrogen fixation; it supplies ATP for nitrogen fixation and is an O<sub>2</sub>-scavenging mechanism which prevents nitrogenase inactivation. It seems feasible to isolate mutants with improved symbiotic nitrogen fixation by increasing the respiratory capacity and ATP production.

The cytochrome composition of the electron transport chain of different *Rhizobium* species has been described (Appleby 1969; DeHollander and Stouthamer 1980; Kretovich et al. 1973; Stam et al. 1984; for a review see O'brian and Maier 1989). Free-living *Rhizobium* species express b-type and c-type cytochromes and two terminal oxidases: cytochromes aa<sub>3</sub> and o. In *Rhizobium etli* the cytochrome oxidases o and aa<sub>3</sub> were identified by photodissociation spectra and oxygen binding (Soberón et al. 1989). Some *Rhizobium* species express a third cytochrome terminal oxidase, cytochrome d (Barquera et al. 1991; Kretovich et al. 1973). The expression of the various terminal oxidases of *R. etli* in free-living conditions is O<sub>2</sub> regulated as has been reported for other bacterial species (Poole 1983). Cytochrome aa<sub>3</sub> is expressed in exponential-growth-aerobic cultures, but is repressed in post-exponential phase of growth conditions where cytochrome d is induced (Barquera et al. 1991; Soberón et al 1989).

The oxygen concentration within the infected nodule tissue (3 to 30 nM) is at least 10<sup>4</sup>-fold lower than under standard aerobic conditions (250 µM) (Witty and Minchin 1990). In symbiosis, an alternative and different cytochrome terminal oxidase is induced (cbb<sub>3</sub>) (Keefe and Maier 1993). This terminal oxidase is coded

by the *fixNOQP* operon described in *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Azorhizobium caulinodans* (Preisig et al. 1993; Kahn et al. 1993; Schlüter et al. 1993; Mandon 1994). This bacteroid oxidase operates at extremely low free O<sub>2</sub> tension in root nodule endosymbiosis and possesses a high affinity for O<sub>2</sub>. Thus, the O<sub>2</sub> transfer from oxygenated leghemoglobin in the nodule cell cytoplasm to the respiratory complex in the bacteroid cytoplasmic membrane is facilitated.

In previous reports we have isolated mutants with enhanced respiratory capacities which showed improved symbiotic nitrogen fixation capacities (Soberón et al. 1990; Soberón et al. 1989). These mutants showed higher levels of c- and b-type cytochromes and of cytochrome terminal oxidase *aa<sub>3</sub>* when cultured microaerobically (Soberón et al. 1990, Soberón et al. 1989). These mutants were isolated by their increased capacity to oxidize N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) (Soberón et al. 1990; Soberón et al. 1989).

In this work we devised a different selection procedure to obtain *Rhizobium* mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases, by means of the higher growth resistance of these mutants to sodium azide. The characterization of one mutant, and the further characterization of the previously isolated mutant showed that both mutants have a derepression in the *cbb<sub>3</sub>* terminal oxidase expression. We propose that the improved symbiotic performance of both mutant strains is related to the derepression of this cytochrome terminal oxidase.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** Strains and plasmids are listed in Table 1.

**Media and culture conditions.** All media were as described by Noel et al. (1984). P' medium contained 0.5% peptone, 0.3% yeast extract and 10 mM CaCl<sub>2</sub>. YS medium (yeast extract-succinate) had the following composition (grams liter<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5; MgSO<sub>4</sub> 0.2; NaCl 0.1; CaCl<sub>2</sub> 0.04; yeast extract 1; succinate 1.35 .

Microaerobic cultures were achieved by diluting an active inoculum 10 times in PY medium and incubating without shaking for 48 hours at 30°C.

**Tn5 Mutagenesis.** pSUP5011 plasmid carrying Tn5-*mob* (Simon et al. 1983) was mobilized into *R. etli* CE3. Matings were carried out on PY plates overnight at 30°C; the cells were suspended in sterile 10 mM MgSO<sub>4</sub> and plated on selective medium.

**Isolation of mutants.** For the isolation of an azide resistant mutant, the level of growth sensitivity of strain CE3 to this inhibitor was determined. For this purpose CE3 cells were plated on minimal medium (MM) with 10 mM succinate and 10 mM NH<sub>4</sub>Cl as carbon and nitrogen sources respectively, and increasing concentrations of sodium azide. After Tn5-*mob* mutagenesis, CE3 cells were plated on MM plates with 10 µg ml<sup>-1</sup> of sodium azide and 30 µg ml<sup>-1</sup> of kanamycin (km)

**Cell extracts and respiratory activities.** After growth, cells were collected and washed with 50 mM Tris-Hydrochloride (pH 7.4)-5 mM CaCl<sub>2</sub> (TCM buffer) and suspended in the same buffer at a final concentration of 30% (w/v). The cell suspension was sonicated using an MSE sonicator 6 times for 30 sec with intervals of 30 sec for cooling. Respiratory activities were determined at 30°C in a YSI model 5300 biological oxygen monitor (Yellow Springs Instruments Co.).

Endogenous respiration was measured before disrupting cells. The reaction vessel contained 3 ml of 50 mM potassium phosphate (pH 7.4 except for TMPD which wa

6.8) and cell extract (1.5  $\mu$ g of protein). The reaction was started by the addition of 40 mM succinate or 5.5 mM NADH or 10 mM ascorbate- 0.1 mM TMPD to 10 mM (final concentration), as electron donors.

**Spectral analysis of cytochromes.** Cell membranes were prepared mechanically as previously described (Soberón et al. 1989). Cytochrome spectra of whole cells or membrane particles were recorded on a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer. Samples were suspended in TCM buffer (30% w/v) and reduced with dithionite (few grains); samples were oxidized with ammonium persulfate. Carbon monoxide difference spectra was obtained by bubbling CO (2 min) to a reduced cell sample and spectra recorded against a reduced cell sample. Spectra were obtained at room temperature with 1.0 cm light path cuvettes.

**DNA manipulation.** Techniques and reagents for DNA isolation and electrophoresis were as described previously by Martínez et al. (1985). Total DNA *EcoRI* digests were transferred onto Hybond N+ as described by the manufacturer (Amersham LTD.). Hybridization was performed as described previously by Quinto et al. (1982). Plasmids were labelled with  $^{32}$ P by random primer following the instructions of the manufacturer (Amersham LTD). The CFN037 *EcoRI* fragment containing the *Tn5-mob* insertion was cloned from CFN037 total DNA, previously digested with *EcoRI* and ligated to pGEM cloning vector (Promega);  $Km^r$   $Amp^r$  colonies were selected and recombinant plasmids were characterized by restriction mapping. Plasmid pLR01 was further characterized. This plasmid was used as probe for the identification of cosmid clones which contained the wild type fragment from a wild type strain cosmid library. A 2.7 kb *EcoRI* fragment was identified and subcloned from one cosmid clone, into pBluescriptSK giving rise to plasmid pJM01.

**Nitrogen fixation determination.** For nitrogen content measurements, *Phaseolus vulgaris* cv. negro jamapa was surface sterilized in hypochlorite and germinated on moist sterile filter paper. Three-day-old seedlings were transferred to plastic growth pots, using vermiculite as growth substrate, inoculated with a bacterial suspension in PY medium, and grown with nitrogen-free salts (Wacek and Brill 1976) in a greenhouse. The plant nitrogen content was estimated in total shoots and leaves which were dried and homogenized. The total nitrogen of 34 day-old nodulated plants was determined with an Antek 720 nitrogen detector as previously described (Soberón et al. 1989).

**Protein determination.** Protein was measured by the method of Markwell et al. (1978), using serum albumin as the standard.

## RESULTS.

### Isolation of an *R. etli* mutant with increased resistance to sodium azide.

In order to better understand the molecular mechanisms involved in the expression of cytochromes in *R. etli*, we devised a screening strategy to select for mutants with increased growth resistance to sodium azide. The reason to look for this kind of mutants is that a previously isolated mutant with derepressed expression of cytochrome *aa<sub>3</sub>* and higher respiratory activities (Soberón et al. 1990), showed a higher growth resistance (growth in 10 µg/ml) to sodium azide than the wild type strain (data not shown). It has been shown in *Escherichia coli* that there is a relationship between the expression of cytochrome *d* and the resistance to the respiratory inhibitors cyanide (CN) and azide (Green et al. 1984). After a Tn5-*mob* mutagenesis of *R. etli* strain CE3, we selected mutants resistant to sodium azide (*az<sup>r</sup>*) and Km (*Km<sup>r</sup>*) (see Methods).

We were able to identify 8 strains which showed resistance to azide. These strains differed in their range of resistance to the inhibitor (data not shown). In *E. coli* most of the resistant mutants isolated to sodium azide are point mutations which map in the *secA* gene coding for a protein with ATPase activity which is involved in protein export (Gray et al. 1994, Oliver et al. 1990). To avoid these mutants, we selected azide-resistant mutations closely linked to the *Km<sup>r</sup>* phenotype and therefore most probably caused by the Tn5 insertion. The Tn5 insertion of the 8 mutant strains was mobilized to another *R. etli* strain by means of plasmid pJB3 (Brewin et al. 1980). The mutant strains harboring plasmid pJB3 were mated with a rifampicin-resistant derivative of CFN42, CE2 (Noel et al. 1984) and *Km<sup>r</sup>* transconjugants were selected. The azide-resistant phenotype was linked to the Tn5 only in mutant CFN030. Hybridization of total *EcoRI* DNA digests with



Tn5 showed a single 12 kb homologous band suggesting a single Tn5-*mob* insertion in this mutant (see figure 1A).

### Nitrogen Fixation by CFN030.

The symbiotic phenotype of strain CFN030 was determined by inoculating plants of *P. vulgaris* cv. negro jamapa. The nitrogenase activity of nodulated plants was determined. Figure 2 shows that CFN030 nodulated plants reached similar maximum nitrogenase activities as wild type nodulated plants; nevertheless, CFN030 nodulated plants reached the maximum values at least 4 days before the plants nodulated by the wild type strain. In addition, nitrogen fixation was estimated by the total nitrogen content of plants 34 days after inoculation. CFN030-nodulated plants had 25% higher nitrogen content ( $3.25 \pm 0.24$  mg of nitrogen [100 mg dry weight]<sup>-1</sup>, n=3) than with the wild type strain ( $2.61 \pm 0.28$  mg of nitrogen [100 mg dry weight]<sup>-1</sup>, n=3).

Since CFN030 resembles the previously described CFN037 mutant strain in its symbiotic phenotype (Soberón et al. 1990), we determined if these mutants were ligated. Figure 1A shows a Southern blot of *Eco*RI DNA digests of strains CFN030 and CFN037 hybridized with Tn5 sequences. This figure shows that the Tn5-*mob* was inserted in different *Eco*RI fragments. In order to map the site of Tn5 insertion in both strains, a plasmid profile of these strains and of the CE3 strain was hybridized against Tn5 sequences. Strain CE3 has 6 plasmids (named a to f), plasmid d corresponds to the symbiotic plasmid (Quinto et al. 1982). Figure 1B shows that in strain CFN037 the Tn5 hybridized in the zone where plasmids a and b comigrate and also in the upper part of the gel, the latter hybridization signal is most probably due to the lack of lysis of some cells in the well of the gel. Instead, in strain CFN030, the Tn5 hybridized to the upper part of the gel suggesting that i

is located on the chromosome in this strain. No hybridization signal was found with strain CE3.

In order to exactly identify in which plasmid (a or b) the Tn<sub>5</sub> is located in strain CFN037, we took advantage of the plasmid cured strains developed by Bron et al. (1992). We performed a Southern blot hybridization of *Eco*RI digested DNA from strains pa<sup>-</sup> and pb<sup>-</sup>, using plasmid pJM01 as a probe. This plasmid contains a 2.7 kb *Eco*RI fragment which corresponds to the wild type gene mutated in strain CFN037 (see Material and Methods). We found a 2.7 kb hybridizing band in the strain cured of plasmid a (pa<sup>-</sup>) that is absent in the plasmid b cured strain (pb<sup>-</sup>, figure 1C), demonstrating that the gene mutated in strain CFN037 is located on plasmid b.

#### Cytochrome content of strains CFN030 and CFN037.

CFN030 was isolated by its increased growth resistance to sodium azide, in contrast CFN037 was isolated by its increased capacity to oxidize N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylene-diamine (TMPD). We have previously shown that CFN037 expressed cytochrome aa<sub>3</sub> when cultured in microaerobic conditions in contrast to the wild-type strain (Soberón et al. 1990). Therefore we analyzed the cytochrome expression pattern of strain CFN030 in non-agitated cultures. Spectral analysis of whole cells are presented in figure 3A. Figure 3A shows that strain CFN030 expressed cytochrome aa<sub>3</sub> when cultured microaerobically, in contrast to the wild type strain (peak at 603nm). Cytochrome aa<sub>3</sub> expression in microaerobic cultures is similar in strains CFN037 and CFN030. Therefore it was important to compare the expression of the other cytochrome oxidases in both mutant strains. For this purpose we cultured both strains in YS medium, since in this medium the wild type strain repressed cytochrome aa<sub>3</sub> in agitated post-exponential phase of growth cultures in contrast to cultures on PY medium, where only under microaerobic

conditions the repression of cytochrome  $aa_3$  was observed (Soberón et al. 1990 and figure 3B). Membrane particles from CE3 and the mutant strains were prepared and cytochrome spectra were obtained. Figure 3B shows dithionite-reduced minus oxidized cytochrome spectra of cells from cultures grown in 36 hr in YS medium. CE3 wild type strain expressed low levels of cytochrome  $aa_3$ . Also, strains CFN037 and CFN030 showed low levels of cytochrome  $aa_3$  in this culture condition (peak at 603nm, see figure 3B). Both CFN037 and CFN030 strains expressed high levels of c-type and b-type cytochromes than the wild type strain in this culture condition (peak at 553nm and shoulder at 563nm respectively, see figure 3B).

In order to specifically study the expression of terminal oxidases we obtained CO-reduced minus reduced difference spectra from membrane particles, since terminal oxidases react with CO. Figure 3C shows that strain CE3 expressed cytochrome  $\alpha$  (peaks at 544nm and 572nm, and trough at 562nm). In contrast, CFN037 expressed a different CO-reacting cytochrome with spectrum signals at 544nm and 572nm, and trough at 554nm. The CO-spectrum from CFN030 strain showed the expression of both CO-reacting components, cytochrome  $\alpha$  and the CO-reacting cytochrome found in CFN037, with peaks at 544nm and 572nm and troughs with minimal at 554nm and 562nm (see figure 3C). Figure 3C also shows that CFN030 strain expressed higher levels of CO reactive cytochrome  $aa_3$  in contrast with both CFN037 and CE3 strains. We also performed cytochrome spectra of soluble fractions but we could not detect any cytochrome signal probably due to the expression of soluble cytochromes at levels below detection (data not shown).

Table 2 shows the respiratory rates of cell-free extracts from CE3 and CFN030 cultured in PY microaerobically. Mutant CFN030 showed similar respiratory activities as the wild type strain when both strains are cultured aerobically, in contrast microaerobically cultured cells of CFN030 had a two-fold higher TMPD-

ascorbate oxidase activity than the wild type strain. Also microaerobic cultured cells of CFN030 strain showed higher endogenous respiration and higher respiration rates with succinate and NADH as substrates. The respiratory activities of CFN030 in this condition are similar to the ones reported for CFN037.

## DISCUSSION

In this work we describe the isolation of an *R. etli* mutant strain (CFN030) isolated by its enhanced growth resistance to sodium azide and the further characterization of another *R. etli* mutant strain (CFN037) isolated due to its enhanced capacity to oxidize TMPD (Soberón et al. 1990). Both mutants had an enhanced nitrogen fixation capacity as judged by nitrogenase activity and measurements of the total nitrogen content of nodulated plants (Soberón et al. 1990, this work). We have previously shown that CFN037 fixed more nitrogen in young nodules and that bacteroids developed earlier (Soberón et al. 1990). This could explain the higher nitrogen content found in plants nodulated by this strain (Soberón et al. 1990). In addition CFN030 also fixed nitrogen at early stages of nodule development but showed similar maximal nitrogen fixation activity in mature nodules (fig. 2). Whether the enhanced nitrogen fixation activity found in young nodules induced by both CFN030 and CFN037 mutant strains is the main reason for the higher nitrogen fixation capacity of both strains remains to be determined. Both strains had a similar and higher nitrogen fixation capacity as judged by the nitrogen content found in nodulated plants. One of the aims of this work was to perform a selection method for isolating improved *Rhizobium* strains for inoculation of bean plants. The analysis of the performance of the strains reported here in field conditions is necessary. This analysis should include grain-yield data and total nitrogen content of grains, nevertheless the total nitrogen content of plants inoculated with the strains characterized here, grown in greenhouse conditions, suggest that selection of azide resistant strains of *Rhizobium* will provide improved strains for inoculation.

CFN030 strain expressed cytochrome *aa<sub>3</sub>* in microaerobic cultures in contrast to the wild type strain, as we had previously shown to be the case for CFN037 (Soberón et al. 1990). Post-exponential phase of growth cultures showed that both CFN030 and CFN037 strains expressed higher levels of b-type and c-type

cytochromes. CO-difference spectra showed that CE3 expressed cytochrome  $\alpha$ . CFN030 strain expressed cytochrome  $\alpha$  but also expressed an unusual CO-reacting cytochrome which showed spectrum signals similar to cytochrome  $\alpha$  but slightly shifted to the blue part of the spectrum (trough at 554nm). The CFN037 mutant strain also expressed the 554nm CO-reacting component. Recently, the partial purification of an oxidase complex from nitrogen-fixing *B. japonicum* bacteroids was described (Keefe and Maier 1993). The spectrum signals of this oxidase indicated a component with a trough at 553nm very similar to the spectrum found in strains CFN037 and CFN030. This component was suggested to be a c-type cytochrome which can react with CO (Keefe and Maier 1993). Recently, the purification and characterization of a cbb<sub>3</sub> type terminal oxidase has been reported in *Rhodobacter capsulatus* (Gray et al. 1994) and in *Paracoccus denitrificans* (de Gier et al. 1994). The *R. capsulatus* cbb<sub>3</sub> oxidase has a CO-spectrum similar to *B. japonicum* bacteroid terminal oxidase, but the CO-reactive component with trough at 553nm is proposed to be a high-spin b-type cytochrome rather than a c-type cytochrome. The higher b-type and c-type cytochrome content of CFN037 and CFN030 and the expression of the CO-reactive component with trough at 554nm, suggests that both strains express a cbb<sub>3</sub> type terminal oxidase in post-exponential phase of growth cultures in contrast with the wild type strain that did not express this component under the same culture conditions. Additional evidence which suggests the expression of a different terminal oxidase in the mutant strains is that both strains had a respiratory activity more resistant to inhibition with potassium cyanide or sodium azide when cultured microaerobically than the wild type strain (data not shown). It has been proposed that this terminal oxidase must have a high affinity for O<sub>2</sub> and to be tightly coupled to ATP synthesis. Therefore, the expression of this enzyme by the mutant

strains could explain the better performance in young nodules where nitrogen fixation could be limited by the disponibility of ATP.

We showed here that both mutants characterized in this work have a similar cytochrome expression pattern although both were affected in different genetic regions, since the mutated gene of CFN037 was localized in plasmid b while the mutated gene of CFN030 was located in the chromosome. It has been reported that plasmid b is indispensable for nitrogen fixation on bean roots (Brom et al. 1992). Work is in progress regarding the cloning and sequence of the mutated genes identified in this work in order to understand the molecular mechanisms involved in cytochrome expression in *Rhizobium*. In other bacterial species different genes involved in the regulation of gene expression by oxygen, and which are involved in the regulation of cytochrome expression, have been described. In *E. coli* it has been shown that two independent genetic systems are involved in the oxygen regulation of gene expression. The *arc* system is involved in the regulation of genes needed under aerobic conditions (Iuchi et al. 1989). Mutants in the *arc* locus derepressed the expression of genes that are repressed during aerobiosis (Iuchi et al. 1990). The second system is composed by the *fnr* gene which is necessary for the derepression of genes needed under anaerobiosis (Cotter et al. 1990).

Finally, the data reported here suggests the participation of different genes in the regulation of cytochrome terminal oxidases expression in *R. etli* and provide an alternative selection method for *Rhizobium* strains with higher nitrogen fixation activities.

### **Acknowledgments.**

We would like to thank Osvaldo López, Claudia Morera and Laura Rodríguez for technical assistance; Dr. Jorge Calderón for facilitating the use of the CE3 gene bank to Miriam Ortiz García for maintenance of our strain collection and to Dr. Alejandro Bravo de la Parra for reviewing this manuscript. This work was supported by the European Communities Through the International Scientific cooperation program, contract nCI1\* - 0787 (SMA), by CONACyT (México) project no. 1158-N9202 and by DGAPA project no. IN204291. Juan Miranda was supported by a fellowship of CONACyT (México) and a grant from PADEP-UNAM.



## REFERENCES.

- Appleby CA (1969) Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. II. *Rhizobium* haemoproteins, cytochromes and oxidases in free living (cultured) cells. *Biochim. Biophys. Acta* 172:88-105.
- Barquera B, García-Horsman A and Escamilla EJ (1991) Cytochrome d expression and regulation pattern in free living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 115: 114-119.
- Brewin NJ, Beringer JE, and Johnston AWB (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120:413-420.
- Brom S, García de los Santos A, Stepkowsky T, Flores M, Dávila G, Romero D and Palacios R (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseol* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bact.* 174:5183-5189.
- Cotter PA, Chepuri V, Gennis RB and Gunsalus RP (1990) Cytochrome o (*cyoABCDE*) and d (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* 172:6333-6338.
- DeHollander JA, and Stouthamer AH (1980) The electron transport chain of *Rhizobium trifolii*. *Eur. J. Biochem.* 111:473-478.
- Fortin Y, Phoenix P and Drapeau GR (1990) Mutations conferring resistance to azide in *Escherichia coli* occur primarily in the *secA* gene. *J. Bacteriol.* 172:6607-6610.
- de Gier J-WL, Lübben M, Reijnders WNM, Tipker CA, Slotboom D-J, van Spanning RJM, Stouthamer AH and van der Oost J (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* 13:183-196.
- Gray KA, Grooms M, Myllykallio H, Moomaw C, Slaughter C and Daldal F. 1994. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a Cu<sub>A</sub> center. *Biochemistry* 33:3120-3127.

Green GN, Kranz RG, Lorence RM and Gennis RB (1984) Identification of subunit I as the cytochrome b558 component of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 59:7994-7997.

Iuchi S, Cameron DC and Lin ECC (1989) A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171:868-873.

Iuchi S, Chepuri V, Fu H-A, Gennis RB and Lin ECC (1990) Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the *arc* regulatory system in *Escherichia coli* : study utilizing deletions and *lac* fusions of *cyo* and *cyd*. J. Bacteriol. 172:6020-6025.

Kahn D, Batut J, Daveran ML and Fourment J (1993) Structure and regulation of the *fixNOQP* operon from *Rhizobium meliloti*, p. 474. In R. Palacios, J. Mora, and W.E. Newton (ed.), New horizons in nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Keefe RG and Maier RJ (1993) Purification and characterization of an O<sub>2</sub>-utilizing cytochrome c oxidase complex from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1183:91-104.

Kretovich WL, Romanov VI and Korolyov AU (1973) *Rhizobium leguminosarum* cytochromes (*Vicia faba*). Plant Soil 39:614-634.

Mandon K, Kaminski PA and Elmerich C (1994) Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. J. Bacteriol. 176:2560-2568.

Markwell MAK, Haas SM, Vieber ZZ and Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87:206-210.

Martínez E, Pardo MA, Palacios R and Cevallos MA (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* inoculation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. J. Gen. Microbiol. 13:1779-1786.

- Noel KD, Sánchez A, Fernández L, Leemans J and Cevallos MA (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol 158:148-155.
- O'Brian MR and Maier RJ (1989) Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbiosis. Biochim. Biophys. Acta. 974:229-246.
- Oliver DB, Cabelli RJ, Dolan M and Jarosik GP (1990) Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-component of the protein export machinery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8227-8231.
- Poole RK (1983) Bacterial cytochrome oxidases: A structurally and functional diverse group of electron transfer proteins. Biochim. Biophys. Acta 726:205-243.
- Preisig O, Anthamatten D and Hennecke H (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen fixing endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3309-3313.
- Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernández L, Ballado R, Soberón G and Palacios R (1982) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature (London) 224:724-726.
- Schlüter A, Patschkowski T, Weidner S, Uden G, Hynes MF and Priefer UB (1993) Functional and regulatory characteristics of FnrN, an oxygen-responsive transcriptional activator in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, p. 493. In R. Palacios, J. Mora, and W.E. Newton (ed.), New horizons in nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Simon R, Priefer U and Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/technology 1:784-791.

Soberón M, Membrillo-Hernández J, Aguilar GR and Sánchez F (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.

Soberón M, Williams HD, Poole RK and Escamilla E (1989) Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 171:465-472.

Stam H, Van Verseveld WH, de Vries V and Stouthamer AH (1984) Hydroge oxidation and efficiency of nitrogen fixation in succinate-limited cultures of *Rhizobium* ORS 571. Arch. Microbiol. 139:53-60.

Wacek T and Brill WJ (1976) Simple rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soybean. Crop. Sci. 16:519-512.

Witty JF and Minchin FR (1990) in Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives, eds. Gresshoff, P. M., Roth, L.E., Stacey, G. and Newton, W. E. (Chapman and Hall, New York), pp. 285-292.

TABLE 1. Bacterial Strains and Plasmids.

Strain or plasmid.	Relevant characteristics.	Source or reference
<i>Rhizobium etli</i> strains		
CFN42	Wild type	Quinto et al.1982
CE3	Sm <sup>r</sup> derivative of CFN42	Noel et al. 1984
CE2	Rif <sup>r</sup> derivative of CFN42	Noel et al. 1984
CFN037	TMPD++ Tn5- <i>mob</i> mutant of CE3	Soberón et al. 1990
CFN030	az <sup>r</sup> Tn5- <i>mob</i> mutant of CE3	This work.
CFNX182	CFN42 cured of plasmid a	Brom et al. 1992
CFNX183	CFN42 cured of plasmid b	Brom et al. 1992
Plasmids		
pGEM	Ap <sup>r</sup>	Promega
pSK	Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pJB3	R68.45 Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> .	Brewin et al.1980
pSUP202	pBR325- <i>mob</i>	Simon et.al 1983
pSUP5011	pBR325 Tn5- <i>mob</i>	Simon et.al 1983
pLR01	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , pGEM containing Tn5- <i>mob</i> insertion of CFN037	This work.
pJM01	Ap <sup>r</sup> , pSK containing the 2.7 kb <i>EcoRI</i> fragment	This work.

TABLE 2. Respiratory activities in cell-free extracts of *R. etli* strains grown under different culture conditions.

Strain	Endogenous <sup>b</sup>	Oxidase Activity <sup>a</sup>		
		Succinate	NADH	Ascorbate-TMPD
CE3 aerated	39.58	79.03	85.62	184.42
CE3 microaerobic	35.54	79.90	79.20	61.24
CFN030 aerated	43.60	64.80	79.46	134.50
CFN030 microaerobic	58.71	93.50	105.70	132.71

<sup>a</sup> Activities are given in nanogram-atoms of oxygen consumed minute<sup>-1</sup> milligram of protein<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Activities obtained with whole cells. Representative results of three experiments with a typical variation of less than 15% are shown.

## FIGURE LEGENDS.

Figure 1. A) Southern blot of *EcoRI* digested total DNA probed with Tn5 sequences. Strains: CE3 (lane 1), CFN030 (lane 2), and CFN037 (lane 3). B) Plasmid profile of wild type and mutant strains. Odd-numbered lanes are ethidium bromide-stained plasmid profiles. Even-numbered lanes are Southern blots of each plasmid profile probed with Tn5 sequences. Strains: CE3 (lanes 1 and 2), CFN030 (lanes 3 and 4), and CFN037 (lanes 5 and 6). C) Southern blot of *EcoRI* digested total DNA of plasmid-cured strains probed with pJM01. Strains: pb- (lane 1), pa- (lane 2), CFN037 (lane 3), and CE3 (lane 4).

Figure 2. Acetylene reduction activity in plants inoculated with strains CE3 (0) and CFN030 (0). Ten pots with three plants each were inoculated with each strain. Acetylene reduction activity was determined in one pot on the specified days. Activity is expressed as % of acetylene production per nodule dry weight<sup>-1</sup>. Vertical bars represent SD of three determinations.

Figure 3. Cytochrome spectra of whole cells (A) and membrane particles (B and C). A) Reduced minus oxidized difference spectra of cells cultured in PY medium under microaerobic conditions. Strains: CE3 (trace 1) and CFN030 (trace 2). The amount of protein used was 18.09 mg ml<sup>-1</sup> for strain CE3 and 15.93 mg ml<sup>-1</sup> for strain CFN030. B) Reduced minus oxidized difference spectra of cells cultured in YS medium under microaerobic conditions. Strains: CE3 (trace 1), CFN030 (trace 2), CFN037 (trace 3). C) CO-reduced minus reduced difference spectra of cells cultured in YS medium under microaerobic conditions. Strains: CE3 (trace 1), CFN030 (trace 2), and CFN037 (trace 3).

(trace 3). The amount of protein used in 3B was 25.2, 20.9 and 17.8, in 3C 25.2, 15.5 and 17.8 mg ml<sup>-1</sup> for CE3, CFN030 and CFN037 strains, respectively.



FIGURE 1.

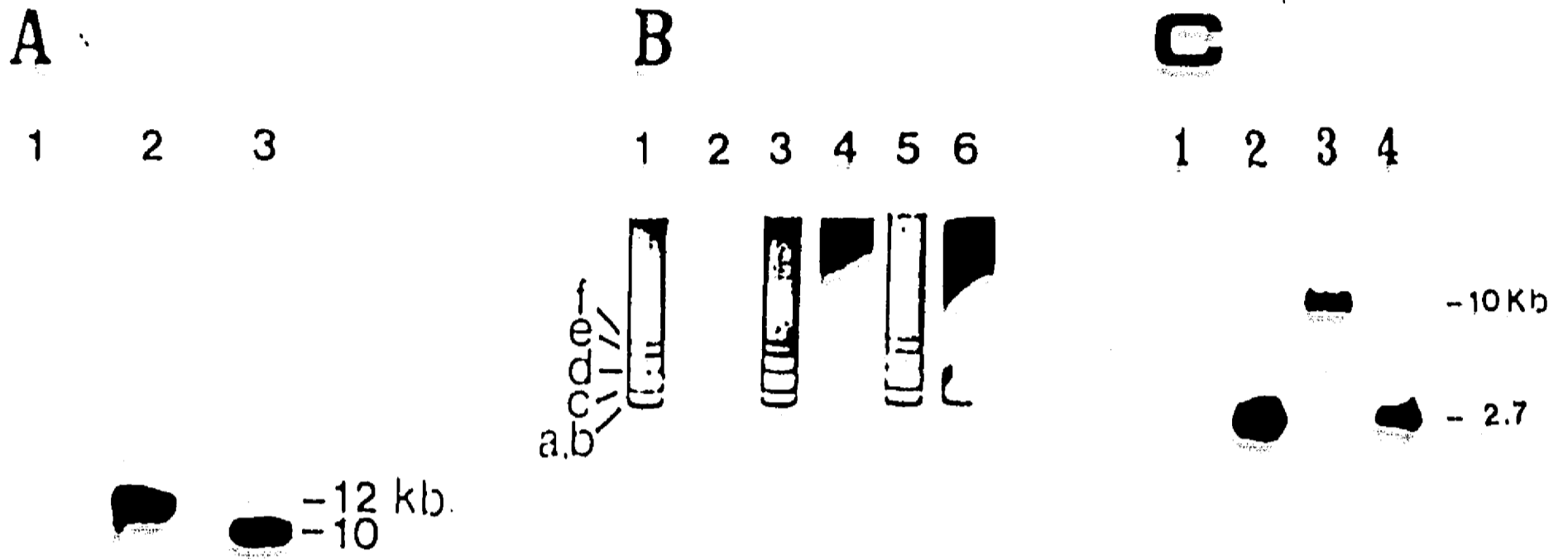


FIGURE 2.

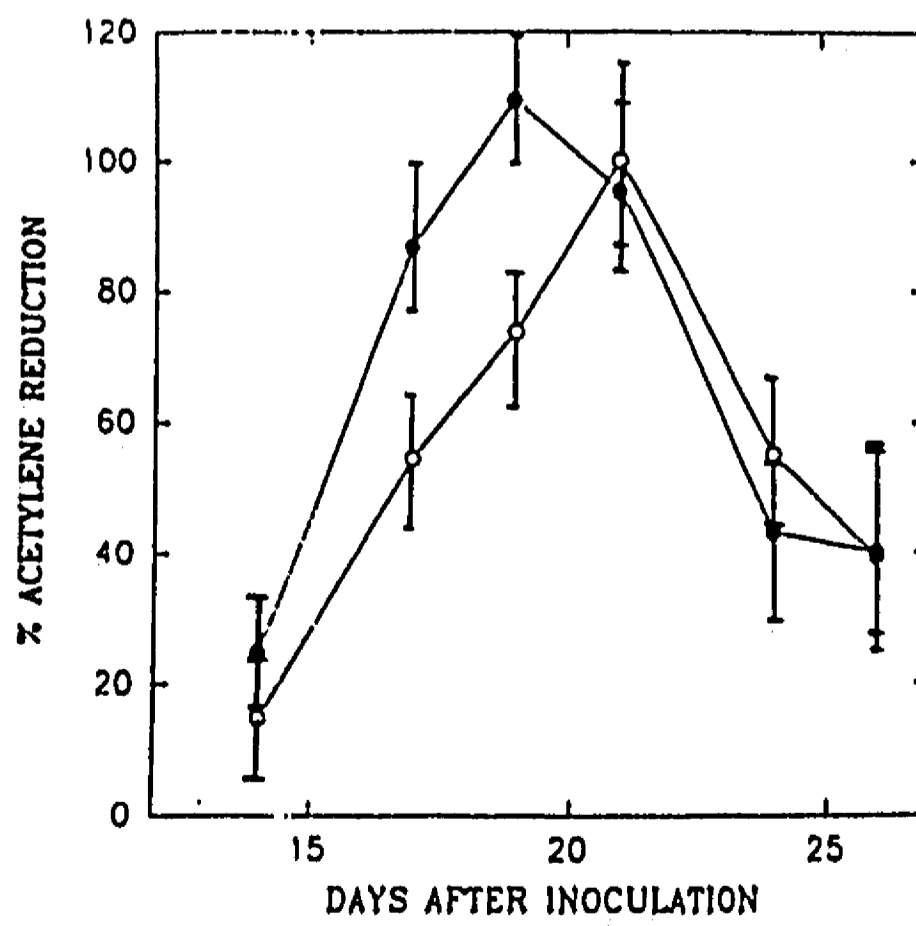
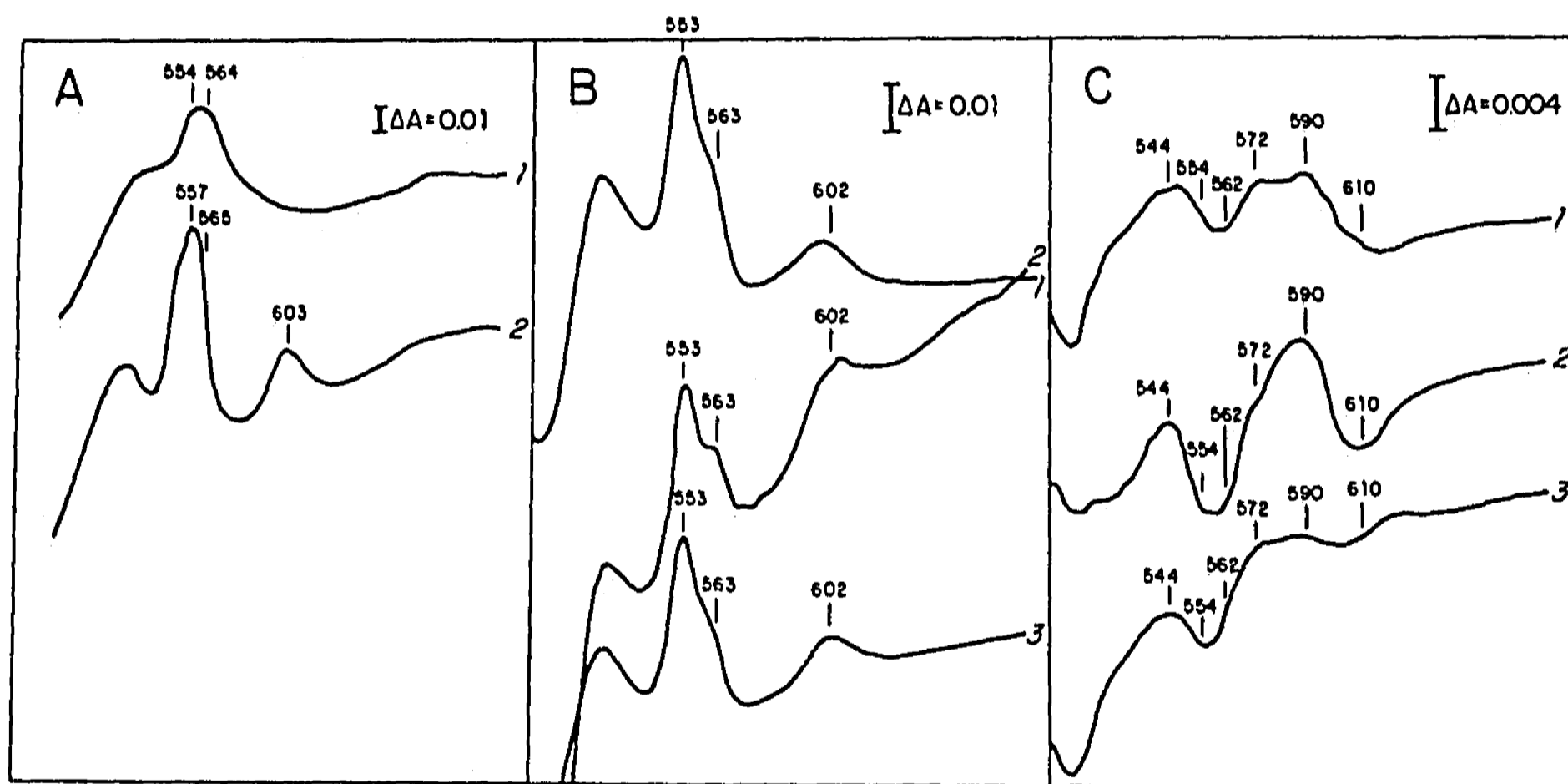


FIGURE 3.



#### IV.- MATERIAL Y METODOS.

##### Medios de cultivo.

El medio de cultivo YS (levadura+succinato) tiene la siguiente composición (gramos por litro):  $K_2HPO_4$  0.5;  $KHPO_4$  0.5;  $MgSO_4$  0.2; NaCl 0.1;  $CaCl_2$  0.04; extracto de levadura 1 y succinato de sodio 1.35.

El medio de cultivo mínimo M9 se preparó como se reporta en Maniatis et al. (1982).

Los antibióticos se usaron a las siguientes concentraciones ( $\mu g/ml$ ): tetraciclina (Tc) 5; kanamicina (Km) 30; nalidíxico (Nal) 20; ampicilina (Ap) 100.

La tiamina o vitamina  $B_1$  se usó a una concentración de 100  $\mu g/ml$  final.

##### Análisis espectral de los citocromos.

Los espectros de los citocromos se hicieron de células completas y se obtuvieron mediante un espectrofotómetro SLM Aminco DW2000. Las muestras se resuspendieron en buffer TCM (30% peso a volumen; Tris-HCl 50 mM pH 7.4,  $CaCl_2$  5 mM y  $MgCl_2$  5 mM) y reducidos con ditionita (unos pocos granos) u oxidados con persulfato de amonio. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente usando cuvetas de 1.0 cm.

##### Determinación de la secuencia nucleotídica.

El fragmento *Eco* RI conteniendo la inserción Tn5-*mob* se clonó del ADN total de la cepa CFN037, previamente digerido con *Eco* RI y ligado al vector pGEM (Promega). Se seleccionaron las colonias  $Ap^r$  y  $Km^r$ . Los plásmidos recombinantes se caracterizaron por mapeo de restricción. A esta clona se le llamó pLR01. A partir de la clona pLR01 se subclonaron los fragmentos *Xho*I-*Eco*RI que nos permitieron obtener secuencia nucleotídica usando un "primer" específico de los extremos del Tn5 (Thöny et al., 1985).

El inserto del plásmido pLR01 se usó como sonda para buscar en un banco de genes de la cepa silvestre CE3 aquellos cósmidos que contuvieran al fragmento silvestre *Eco* RI de 2.7 kb. Se encontraron 4 cósmidos llamados pJMR1045, pJMR1121, pJMR1149 y pJMR1188. A partir del cósmido pJMR1149 se subclonó el fragmento silvestre *Eco* RI de 2.7 kb al vector pSK. A este plásmido se le llamó pJMR01. La secuencia nucleotídica se continuó en el plásmido pJMR01 usando "primers" sintéticos diseñados en base a la secuencia nucleotídica ya obtenida. Se secuenciaron las dos

hebras del ADN. La secuencia nucleotídica se obtuvo manualmente por el método de Sanger et al. (1977) usando reactivos y Sequenase version 2.0 de un kit de USB (Amersham Ltd.). Para detectar las cadenas nacientes se uso [alfa -<sup>35</sup>S]-dATP alfaS (New England Nuclear). Los análisis de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos fueron realizados con los programas GeneWorks (Intelligenetics Inc.), y del Genetics Computer Group (Wisconsin). Las búsquedas en bancos de genes se realizaron usando el programa BLAST del server del National Center of Biotechnology Information (USA).

### Manipulación del ADN.

Las técnicas y los reactivos para el aislamiento y electroforesis del ADN, las hibridaciones en colonia y las transformaciones se hicieron como se describió en Maniatis et al. (1982). Los plásmidos fueron marcados con <sup>32</sup>P por "random priming" siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Ltd.).

### Clonación por PCR del operón *fixNOQP* de *Bradyrhizobium japonicum*.

Para clonar el operón *fixNOQP* de *B. japonicum*, se diseñaron y sintetizaron dos "primers" complementarios a los extremos 5' y 3' de dicho operón. El "primer" de arriba es complementario al inicio de la proteína *fixN* incluyendo el codón de inicio ATG y conteniendo una secuencia extra de 8 pares de bases que presenta un sitio de restricción *NcoI*: 5' TTCCATGGTCCGCATGCGCCAGCCCTCCATC 3'. Este primer contiene un mismatch con la secuencia reportada en la posición 17 creando un sitio de restricción *Sph I* no presente en la secuencia reportada. El primer de abajo contiene un sitio *XbaI* en su extremo 5' y es complementario a la parte final del gene *fixP*: 5' GCTCTAGAGCTATTTTCCACCGCCCAGC 3'. Las condiciones de amplificación fueron: 3 min. de desnaturalización a 95 °C, seguido por 26 ciclos de 1.5 min. a 63 °C para anillar, 3 min a 73 °C para polimerizar y 1.5 min a 95 °C para desnaturalizar; al final se le dieron 10 min extra a 73 °C. El aparato utilizado es un ciclador térmico marca Perkin-Elmer. Los primers se añadieron a una concentración de 250 μM, el ADN total de la cepa USDA110 de *B. japonicum* a una concentración final de 50 ng., dTTP, dGTP, dATP y dCTP a 200 μM y 2 unidades de *Taq* polimerasa en un volumen final de 50 μl (M. Soberón, comunicación personal). Se usó un buffer de PCR 10X reportado ser más eficiente para la amplificación de fragmentos grandes de ADN que no contiene KCl y con 20 mM MgCl<sub>2</sub>

(Ponce y Micol, 1992). La *Taq* polimerasa y los reactivos de PCR fueron obtenidos de Boehringer Mannheim.

### Obtención de una sonda *fixP* de *R. etli*.

Como parte de los proyectos del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (Cuernavaca) de mapear los genes de fijación de nitrógeno en el plásmido simbiótico de la cepa CE3 de *R. etli*, se encontraron dos cósmidos sobrelapados que contienen secuencias que hibridan contra los genes *fixNOQP* de *R. leguminosarum biovar viciae* (M.L. Girard, comunicación personal). Se decidió clonar un fragmento de ADN interno del operón *fixNOQP* de *R. etli* con el objeto de estudiar su expresión. Para esto utilizamos el operón *fixNOQP* de *B. japonicum* obtenido como se especificó en el apartado anterior. El producto de PCR tiene un tamaño de 3.5 kb con un sitio *NcoI* en el extremo 5' y un sitio *XbaI* en el 3', y fué clonado en el plásmido pSPTBM20, dando origen al plásmido pMSfix1. Se le practicó un mapeo por restricción a este fragmento y se mostró que corresponde al esperado del operón *fixNOQP* de *B. japonicum*. Se usaron dos diferentes sondas después de digerir al plásmido pMSfix1 con *NcoI* y *EcoRI*, ya que hay un sitio *EcoRI* único en el operón *fixNOQP*, el cual se encuentra 856 pares de bases antes del final del gene *fixP*. Así, al digerir el fragmento con *NcoI* y *EcoRI* se obtuvieron dos fragmentos de 2.6 y 0.85 kb. El fragmento de 2.6 contiene a los genes *fixNOQ*, mientras que el fragmento de 0.85 contiene al gene *fixP*. Este último fragmento se generó por la restricción con *EcoRI* ya que existe un sitio para esta enzima en el polilinker del vector, cercano al sitio *XbaI* que se usó para la clonación. Cuando se hibridó una digestión *BamHI* del cósmido pcos101 contra la sonda de *fixP*, ésta hibridó con un fragmento de 0.8 kb. Se clonó este fragmento *BamHI* de 0.8 kb que hibrida contra el gene *fixP* de *B. japonicum* para usarlo como sonda para estudiar la expresión del operón *fixNOQP* de *R. etli*. A este último plásmido se le llamó pMSfix2.

### Aislamiento de ARN y blotting.

Las muestras de ARN fueron preparadas de cultivos celulares que fueron cosechados por centrifugación. El ARN se purificó con el kit RNAid-PLUS (Bio-101 Inc.). El ARN fue transferido a membranas de Hybond-N+ e hibridadas como sugiere el fabricante (Amersham Ltd.).

Los niveles de expresión de los genes *fixP* y *thiC* se cuantificaron por una densitometría de los autorradiogramas de una hibridación en slot-blot de ARN total de cultivos de 12 y 36 horas en medio YS. Los valores obtenidos con las sondas de *fixP* y *thiC* se normalizaron con los valores correspondientes de la hibridación con el gene del ARN ribosomal 16S

contenido en un fragmento *Hind* III de 560 pares de bases del plásmido pKK3535 (Brosius et al., 1981).

### Complementación del fenotipo *thi*<sup>-</sup>.

La cepa CAG18500 (*thiC39* ::Tn10) se transformó con el plásmido pJMR02, el cual contiene un fragmento *Bam* HI de 9 kb y que contiene al fragmento *Eco* RI de 2.7 kb. Las diferentes cepas se estriaron en medio M9 sólido conteniendo 10 µg/ml de tiamina. De ahí se inoculó un overnight conteniendo la misma cantidad de tiamina. Con el overnight se inocularon matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio M9 sin tiamina y con tiamina (100 µg/ml). A los tiempos indicados se tomaron muestras y se leyeron al espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

## V.- RESULTADOS ADICIONALES.

### 1) ANALISIS DE LA EXPRESION DE CITOCROMOS EN LAS CEPAS CFN037 Y CFN030.

Como se describe en el artículo anexo, la cepa CFN030 desreprime la expresión de la oxidasa terminal  $aa_3$  en cultivos de PY microaeróbicos (36 hrs), al igual que la cepa CFN037 descrita anteriormente (Soberón et al., 1990) y a diferencia de la cepa silvestre que en esta condición no expresa dicha oxidasa.

Los espectros diferenciales de CO mostraron que la cepa CE3 expresa al citocromo  $\alpha$ . La cepa CFN037 expresa un citocromo que reacciona con CO que muestra señales similares al citocromo  $\alpha$  pero ligeramente desviadas hacia la parte azul del espectro. El espectro diferencial de CO de la cepa CFN030 sugiere que esta cepa expresa tanto al citocromo  $\alpha$  como al componente de 556nm observado en la cepa CFN037. Recientemente se ha descrito la purificación parcial de un complejo oxidasa a partir de bacteroides de *B. japonicum* (Keefe y Maier, 1993). Las señales espectrales muestran un componente con un valle a los 553nm análogo a la señal detectada en los espectros de la cepa CFN037. Se sugirió que este componente pudiera ser un citocromo tipo c que puede reaccionar con CO (Keefe y Maier, 1993). Recientemente también se ha descrito la purificación y caracterización de una oxidasa terminal tipo  $cbb_3$  en *R. capsulatus* (Gray et al., 1994) y en *Paracoccus denitrificans* (de Gier et al., 1994). La oxidasa  $cbb_3$  de *R. capsulatus* tiene señales espectrales similares a la oxidasa terminal presente en bacteroides de *B. japonicum*, pero en este caso se propone que el componente con un valle a los 553nm es un citocromo tipo b de high-spin. El mayor contenido de citocromos tipos b y c y la expresión del componente reactivo al CO con un valle a los 553nm sugiere que las cepas CFN037 y CFN030 expresan una oxidasa terminal tipo  $cbb_3$  en cultivos estacionarios en contraste con la cepa silvestre CE3.

Como se menciona en el artículo anexo, la inserción con el trasposón Tn5, en la cepa CFN037 se encuentra alojada en el plásmido b de esta cepa. Quisimos saber si en este plásmido se encontraban presentes genes que afectaran la expresión de citocromos, por lo cual se obtuvieron espectros reducidos menos oxidados de la cepa curada del plásmido b proveniente de cultivos estacionarios en medio YS. En la figura 3 se puede apreciar que esta cepa no expresa citocromos tipo c, al no observarse el pico característico a los 553nm. Esto sugiere que existe(n) un(os) gene(s) en el

plásmido b que afectan la expresión de los citocromos tipo c. No sabemos si es a nivel de la transcripción de los genes que codifican para los citocromos tipo c ó de la biogénesis de los mismos (transporte de las apoproteínas y del grupo hemo al espacio periplásmico y pegado del hemo a la apoproteína).

## 2) EXPRESION DE LOS GENES *fixNOQP* EN LAS CEPAS MUTANTES.

Los resultados de los espectros (ver artículo anexo) sugieren la expresión de la oxidasa simbiótica en las cepas CFN037 y CFN030. El operón *fixNOQP* codifica para una oxidasa terminal del tipo *cbb<sub>3</sub>* que se cree funciona durante la simbiosis. Con el objeto de estudiar la expresión del operón *fixNOQP* en las mutantes, se purificó ARN total de células cultivadas por 12 y 36 horas y se realizó una hibridación en slot-blot contra una sonda del gene ribosomal 16S y contra una sonda de *fixP*. La figura 4 muestra que ninguna cepa expresó al gene *fixP* en cultivos aeróbicos, aunque todas las cepas mostraron una alta inducción de la expresión del gene *fixP* en cultivos de 36 horas. La cepa CFN037 expresó niveles 2 veces mayores del mensajero de *fixNOQP* que la cepa silvestre, mientras que la cepa CFN030 expresó niveles 2 veces menores que la cepa silvestre. De cualquier forma, la cepa CFN030 en cultivos de 36 horas presentó una inducción 6 veces mayor de lo que se observó en cultivos aeróbicos.

## 3) IDENTIFICACION DEL GENE MUTADO EN LA CEPA CFN037.

Con el objeto de conocer cual es el gene mutado en la cepa CFN037, se clonó el fragmento *Eco* RI de 10 kb que contiene al transposón *Tn5-mob*. En la figura 5 se muestra el mapa físico de esta clona llamada pLR01, la localización exacta del transposón y la estrategia de secuencia.

La secuencia obtenida de las regiones aledañas al *Tn5-mob* se muestra en la figura 6. Esta secuencia es capaz de codificar para un marco abierto de lectura (ORF) que se extiende más allá del sitio *Eco* RI. Este ORF principia con un codón de inicio AUG en la posición 323 de la secuencia mostrada en la figura 6 y está precedida por la secuencia TGGAGC situada 7 bases hacia arriba del codón AUG y que es similar al sitio consenso de unión a ribosoma (Shine y Dalgarno, 1975). El transposón *Tn5-mob* se insertó 121 pares de bases hacia arriba del codón AUG.



Como se puede apreciar en la figura 7, la secuencia de aminoácidos del ORF presenta homología al extremo amino-terminal de la proteína ThiC de *E. coli* (46% de identidad y 62% de similitud si se toman en cuenta los cambios conservativos). La proteína ThiC está codificada por el gene *thiC*, el cual forma parte del operón *thiCEFGH* cuyos productos están involucrados en la síntesis de tiamina ó vitamina B<sub>1</sub> (figura 10, van der Horn et al. 1993).

Por medio de hibridación en colonia y usando como sonda al plásmido pLR01 se buscó en un banco de cósmidos de la cepa silvestre CE3 aquellos cósmidos que contuvieran al fragmento *Eco* RI silvestre. Se encontraron cuatro cósmidos llamados pJMR1020, pJMR1121, pJMR1149 y pJMR1188. Todos ellos contienen un fragmento *Eco*RI de 2.7 kb que hibrida con el inserto del plásmido pLR01.

A partir del cósmido pJMR1149, se subclonó el fragmento *Eco* RI de 2.7 kb para dar origen al plásmido pJMR01. Este plásmido se utilizó para completar la secuencia de la región mostrada en la figura 6. A partir del cósmido pJMR1149 se subclonó un fragmento *Bam* HI de 9 kb que contiene al fragmento *Eco* RI de 2.7 kb. A esta clona se le llamó pJMR02. Para confirmar la identidad del gene afectado por la inserción del Tn5, se usó la clona pJMR02 para complementar a la mutante *thiC39 ::Tn10* de *E. coli*. La figura 8 muestra que la clona pJMR02 es capaz de complementar la auxotrofia por tiamina de la mutante de *E. coli*, lo cual confirma la identidad del gene de *R. etli*.

#### 4) REGULACION DE LA EXPRESION DEL GENE *thiC* EN LAS DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium etli*.

Como se mencionó anteriormente, la inserción del Tn5 en la cepa CFN037 se localiza en la región promotora del gene *thiC* que está presente en el plásmido b (ver artículo anexo). Para estudiar el efecto de la inserción por Tn5 sobre la expresión del gene *thiC*, se purificaron muestras de ARN de la cepa silvestre CE3, la cepa CFN037, la cepa CFNX183 (curada del plásmido b) y la cepa CFN030, de cultivos exponenciales o estacionarios. (12 y 36 hrs. respectivamente) en medio YS. La figura 9 muestra los datos obtenidos por hibridación en slot-blot en el cual se observa una muy baja expresión del gene *thiC* en cultivos exponenciales de la cepa CE3; sin embargo, se observa una inducción de 10 veces en la expresión del gene *thiC* en cultivos estacionarios de esta cepa. En contraste, la cepas CFN037 y CFN030 presentaron una expresión alta constitutiva del gene *thiC* en ambas condiciones de cultivo. Como era de esperarse, la cepa curada del

plásmido b no mostró niveles detectables de hibridación en ninguna condición.

## DISCUSION.

El estudio de las bacterias fijadoras de nitrógeno que se involucran en una simbiosis con las raíces de las plantas leguminosas ha sido muy útil para elucidar las interacciones simbióticas. Los esfuerzos de varios laboratorios han revelado la existencia de numerosos genes que codifican para la formación y el funcionamiento de los nódulos fijadores de nitrógeno (para una revisión, ver Martínez et al., 1990). Sin embargo, todavía no se sabe cuales genes son los responsables de la efectividad simbiótica, la cual es una característica de importancia práctica en la agricultura. La efectividad simbiótica generalmente se mide como el incremento del crecimiento de la planta hospedera a expensas de la fijación de nitrógeno que se lleva a cabo en los nódulos de la raíz.

Se ha documentado que las mutaciones al azar y la recombinación genética pueden dar lugar a cepas con propiedades simbióticas mejoradas (Maier y Brill, 1978; Shukla et al., 1989; Williams, 1981). Sólo en un caso se trató de identificar los genes que al mutarlos, aumentan la efectividad simbiótica de *R. meliloti* (Plazinski, 1981). Desafortunadamente, el autor no pudo correlacionar una mutación que ocasionó la aparición de este fenotipo con la inserción Tn5, y falló al localizar a ambos en el cromosoma de *R. meliloti*. Se propuso que el gene mutado estaba en alguno de los plásmidos presentes en la cepa 41.

A nivel bioquímico y fisiológico, se supone que la efectividad simbiótica de *Rhizobium* está determinada por la expresión concertada de la nitrogenasa y las funciones complementarias asociadas, tales como el reciclado de hidrógeno (Evans et al., 1987), el transporte de C4-dicarboxilatos a los bacteroides (Birkenhead et al., 1988), la expresión constitutiva de los genes *nod* (Spaink et al., 1989) y la respiración de los bacteroides (Soberón et al., 1989, 1990), etc. Por esta razón, varios investigadores creen que las cepas de *Rhizobium* pueden ser mejoradas a través de la manipulación de genes involucrados en el control de estas funciones, e.g. el gene *nifA*, que codifica para un regulador positivo de la expresión de los genes *nif/fix* (fijación de nitrógeno, Ronson et al., 1990).

En esta tesis se reporta el aislamiento de la cepa CFN030, la cual fue previamente aislada por Jorge Membrillo (1991) y la posterior caracterización molecular de la cepa CFN037. Ambas cepas presentan un fenotipo de efectividad simbiótica incrementada y ambas fueron aisladas como mutantes respiratorias. En el caso de la CFN037 se aisló como una cepa que oxidara más rápidamente al colorante TMPD (fenotipo TMPD<sup>++</sup>),

mientras que la cepa CFN030 fue aislada como una cepa que tuviera una resistencia incrementada al inhibidor respiratorio azida de sodio. Ambas cepas tienen una expresión desreprimida del citocromo *aa<sub>3</sub>* en condiciones microaeróbicas, empiezan a fijar nitrógeno un par de días antes que la cepa silvestre y las plantas inoculadas con ellas presentan un incremento del 20% en el contenido de nitrógeno total.

Dado que tienen un fenotipo simbiótico similar, surgió la pregunta de si están afectadas en el mismo gene o en genes diferentes. Se comprobó por experimentos tipo Southern que en cada una de las cepas sólo existe una inserción del Tn5 y que este elemento se insertó en fragmentos *EcoRI* de diferente longitud. Además, el Tn5 está insertado en diferentes replicones: en el cromosoma en el caso de la cepa CFN030 y en el plásmido b en el caso de la CFN037.

La siguiente pregunta que surgió fue ¿porqué ambas mutantes fijan más nitrógeno que la cepa silvestre? Al parecer no es por la expresión desreprimida de la citocromo oxidasa terminal *aa<sub>3</sub>*, pues se sabe en *B. japonicum* que esta oxidasa no interviene durante la simbiosis, pues una mutante en esta oxidasa fija igual de bien que la cepa silvestre (O'Brian et al., 1987). Probablemente estas cepas fijan más nitrógeno porque, como se documentó en el artículo anexo, expresan un citocromo similar en características espectrofotométricas a un complejo citocromo oxidasa terminal purificado de bacteroides de *B. japonicum* (Keefe y Maier, 1993). La expresión de esta citocromo oxidasa terminal se da, en ambas mutantes, en cultivos estacionarios. Es de notar que en la cepa silvestre en igualdad de condiciones no se detecta esta citocromo oxidasa terminal. Dado que se ha postulado que la oxidasa terminal denominada *cbb<sub>3</sub>* es la oxidasa que provee de la energía que se requiere para la fijación biológica de nitrógeno y que en las mutantes esta oxidasa se expresa en condiciones en que en la cepa silvestre no se expresa, es posible sugerir que la diferente expresión de la oxidasa simbiótica en las cepas mutantes sea la causante de la incrementada capacidad de fijar nitrógeno de las mismas. Otra posibilidad es que las mutantes CFN037 y CFN030 pudieran afectar el crecimiento de las plantas al optimizar la asimilación de nitrógeno, al elevar la producción de hormonas o de vitaminas (como la tiamina).

En la cepa CFN037 se encuentra aumentada, respecto a la observada en la cepa silvestre, la transcripción del operón *fixNOQP*, el cual codifica para la citocromo oxidasa terminal *cbb<sub>3</sub>* y presenta una expresión alta constitutiva del gene *thiC*, que está involucrado en la síntesis de la vitamina B1 o tiamina.

La tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) es un nutriente requerido por las células y, en su forma coenzimática, pirofosfato de tiamina, participa como un acarreador de unidades de 2 carbonos en reacciones como las catalizadas por las enzimas piruvato deshidrogenasa, la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y la transcetolasa. La tiamina consiste de una mitad pirimidina (4-amonio-5-hidroximetil-2-metil-pirimidina o HMP) y una mitad tiazol (4-metil-5-(beta-hidroxietil)tiazol) los cuales se sintetizan independientemente y luego son unidos para formar la vitamina funcional (figura 10, Brown y Williamson, 1987). Se ha invertido mucho esfuerzo en dilucidar como es que son sintetizados estos compuestos antes de ser unidos. Los primeros trabajos bioquímicos y genéticos indicaron que las primeras cinco reacciones de la biosíntesis de novo de purinas son usadas por la célula para sintetizar HMP. El producto de estas cinco reacciones es la formación del aminoimidazol ribósido (AIR), el cual puede ser convertido en imidazol monofosfato por los productos codificados por los genes *pur* o bien, en HMP por los productos de los genes *thi* (síntesis de tiamina). El producto ThiC se requiere junto con la kinasa ThiN para convertir al 5-aminoimidazol ribonucleótido (AIR) en 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina fosfato (HMP-P) (Vander Horn et al., 1993). Los pasos bioquímicos involucrados en la conversión de AIR a HMP no han sido totalmente caracterizados, aunque se ha propuesto una vía parcial.

En la cepa CFN030, la transcripción del operón *fixNOQP* no se encuentra afectada, pues es igual a la de la cepa silvestre; sin embargo, a diferencia de la cepa silvestre, en cultivos estacionarios se detecta una señal del citocromo *cbb3*, por lo que es posible pensar que esta cepa presente una alteración en la biogénesis de los citocromos tipo c (es decir, un incremento en este proceso) de los cuales 2 forman parte de la oxidasa simbiótica. Esta cepa también presenta una expresión alta constitutiva del gene *thiC*, al igual que la cepa CFN037.

El que ambas mutantes expresen al gene *thiC* de manera alta constitutiva sugiere la posibilidad de que la tiamina, directa o indirectamente, tenga un papel en la expresión de la oxidasa simbiótica.

En la cepa CFN037 se puede especular que la inserción del Tn5 es la causante de la transcripción alta constitutiva del gene *thiC*, dado que el Tn5 se insertó 121 pb hacia arriba del codón de inicio o ATG del ORF de ThiC, y se ha documentado que en algunas inserciones con Tn5 existe transcripción que se origina dentro del transposón y se dirige hacia afuera (en este caso transcribiendo al gene *thiC*) (Clark et al., 1994). De hecho, hacia el 5' del sitio de inserción (nucleótido 201 de la secuencia reportada en esta tesis) y

dentro del Tn5, se encuentra la secuencia 5' TTCCGT-17 nucleótidos-TATAAG 3', la cual podría funcionar como un promotor del tipo -35,-10, que dirija la transcripción hacia afuera del Tn5 y en dirección del gene *thiC*. Esto supondría una síntesis constitutiva de la tiamina y quizás una mayor actividad de las enzimas que la utilizan como cofactor. ↓

En el caso de la cepa CFN030, la transcripción alta constitutiva del gene *thiC* pudiera deberse a que se afectó algún gene regulador de la expresión de *thiC* en particular o que tenga un efecto pleiotrópico y dentro de los genes afectados se encuentre el gene *thiC*. En este caso se puede afirmar que el Tn5 no se insertó en el gene *fnr* de *R. etli*, pues la cepa CFN030 es capaz de crecer en nitrato como aceptor de electrones (M. Soberón, datos no publicados). También se puede descartar que haya afectado a los genes *fixL*, *fixJ* o *fixK* pues la regulación del operón *fixNOQP* no se encuentra alterada en esta mutante, además de que estos genes se encuentran alojados en el plásmido simbiótico, y como se mencionó anteriormente, la inserción del Tn5 en la cepa CFN030 se encuentra alojado en el cromosoma.

Para saber con exactitud cual es el gene mutado en la cepa CFN030, se tendrá que clonar el fragmento que contiene al Tn5 y obtener la secuencia nucleotídica de esa región. Esta secuencia se compararía con las existentes en los bancos internacionales de genes y de esta manera se trataría de identificar.

De los resultados de la transcripción del gene *thiC* en la cepa silvestre, se observa que este gene se expresa en cultivos estacionarios y no se expresa en cultivos en crecimiento exponencial. Esto es muy sugerente de que su expresión se regule por oxígeno, aunque esto habrá que documentarlo experimentalmente.

En caso de que se regule por oxígeno, ¿porqué se regula así? No lo sabemos, pues la tiamina es un cofactor de varias enzimas, algunas de ellas como la piruvato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa que están involucradas en el ciclo de Krebs, el cual es muy importante para la generación de energía, tanto en cultivos exponenciales como en cultivos estacionarios, dado el caracter de aerobio estricto de los rhizobia. De aquí se desprende que probablemente exista otra vía que le permite a la bacteria sintetizar tiamina en cultivos en crecimiento exponencial. Si el oxígeno es el efector de la expresión de *thiC*, no se sabe como es que ejerce su efecto negativo. La nitrogenasa para expresarse y ser funcional requiere condiciones microaeróbicas. Si la expresión del gene *thiC* se requiere en simbiosis, entonces tiene sentido que *thiC* se regule por O<sub>2</sub> de igual manera que la nitrogenasa. Es probable que la tiamina se requiera para tener un

ciclo de Krebs activo y funcionando a alta velocidad para donar electrones a la cadena respiratoria.

La tiamina pudiera afectar la expresión de los citocromos de varias maneras:

1) incrementando, como ya se dijo, el flujo metabólico a través del ciclo de Krebs, y, para capturar los electrones provenientes de él, se aumentaría la expresión de la cadena respiratoria presente en los bacteroides como un mecanismo compensatorio.

2) otro mecanismo es que la tiamina, directa o indirectamente, incremente la biogénesis de los citocromos tipo c. Esta sugerencia se ve apoyada por la observación de que la cepa curada del plásmido b (y que por lo tanto no lleva al gene *thiC*) en cultivos estacionarios, no contiene citocromos tipo c.

3) y último mecanismo, en *R. meliloti* la expresión del operón *fixNOQP* se dá en respuesta a la disponibilidad de  $O_2$ , a través de la cascada regulatoria compuesta por las proteínas FixL, FixJ y FixK. Los productos FixL y FixJ son miembros de la familia de dos componentes involucrados en regular la expresión genética en respuesta a cambios ambientales. En este sistema FixL es una proteína membranal que en respuesta a bajas tensiones de  $O_2$  fosforila al producto de FixJ, activando su capacidad de promover la transcripción del gene *fixK*. El producto FixK, a su vez, es un activador transcripcional que es homólogo a los activadores transcripcionales Fnr y Crp. La proteína FixK, a diferencia de la proteína Fnr, no cuenta con el dominio ubicado en el amino terminal que presenta las cisteínas que se cree unen al ión Fe y que está involucrado en sensor  $O_2$ . Es por esta razón que se desconoce cual es la naturaleza del efector (si es que hay uno) que se presume interactúa con FixK. En el contexto de esta tesis, se podría sugerir que ese efector pudiera ser la tiamina, o bien, que la tiamina al ser cofactor de varias enzimas, tenga que ver con la producción de un metabolito que sería el efector de FixK.

Así, la tiamina o un metabolito generado por su participación en el metabolismo, podría ser una nueva señal simbiótica.

En el laboratorio del Dr. Mario Soberón se está trabajando en la caracterización de otra mutante llamada CFN035, la cual fué aislada por su capacidad incrementada de oxidar al colorante TMPD (fenotipo  $TMPD^{++}$ ), con el fin de identificar otras mutantes de *R. etli* alteradas en la expresión del citocromo  $aa_3$ . Esta mutante mostró un crecimiento reducido en medio mínimo. Al obtener la secuencia nucleotídica de esta región, se observó que

es homóloga al gene *purF* (M. Soberón, datos no publicados). Este gene codifica para la enzima amidofosforibosil transferasa, y cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) para formar 5-fosforibosil-1-amina (PRA). A las 36 hrs. de cultivo en medio YS, reprime menos la expresión del citocromo *aa<sub>3</sub>* que la cepa silvestre, y tiene una expresión aumentada de los citocromos tipo c, reflejada en una relación mayor entre las concentraciones de los citocromos tipo c y b: CE3 c/b=1.16; CFN035 c/b:1.44. De hecho la relación c/b de la CFN035 a 36 hrs. es similar a la encontrada en la cepa silvestre a 12 hrs (M. Soberón, datos no publicados). También, se ha observado que la cepa CFN035 presenta una mayor concentración de glutamato intracelular que la cepa silvestre en cultivos estacionarios (13.68 vs. 4.65). Esto lleva a pensar que el glutamato pudiera ser también una señal metabólica que afecta la expresión de los citocromos (M. Soberón, comunicación personal). Queda por conocer si es que existe una relación entre la tiamina y la síntesis de glutamato. Pudiera ser que el efecto de la tiamina se deba a que aumenta las pozas intracelulares de glutamato, aunque esto es sólo una hipótesis que requiere comprobación experimental.

Estos resultados (la transcripción constitutiva del gene *thiC* en las mutantes CFN037 y CFN030 y la acumulación de glutamato en la mutante CFN035) sugieren fuertemente que además del O<sub>2</sub>, existen otras señales metabólicas que afectan la expresión de los citocromos en *R. etli*.

Otra posibilidad para explicar el efecto de la mutación presente en la cepa CFN037 sobre la expresión de los citocromos es que debajo del gene *thiC* exista otro gene cuyo producto tenga que ver con la expresión de estas enzimas. Para probar esto es necesario analizar esta región con más detalle.

En este trabajo se ha mostrado que el elemento Tn5-*mob* se insertó en el plásmido b de la cepa CFN037. El plásmido b es el único que en adición al plásmido simbiótico (plásmido d, portador de los genes *nod*, *nif* y *fix*) es indispensable para la formación de nódulos en las raíces del frijol (Brom et al., 1992). Se sabe que en este plásmido se encuentran secuencias involucradas en la síntesis de lipopolisacáridos (Cava et al., 1989; Noel et al., 1992). Además, se sugiere la participación de secuencias presentes en el plásmido b en condiciones de vida libre por el hecho de que una cepa curada del plásmido b tiene una velocidad de crecimiento reducida al crecerla en medio mínimo ó en medio PY (Brom et al., 1992). Quizás una de tales secuencias es la reportada en este trabajo que tiene homología con el gene *thiC* de *E. coli*.



En *Rhizobium meliloti* (cepa SU47) existen dos megaplásmidos: pRmeSU47a, el cual lleva genes requeridos para la nodulación y la fijación de nitrógeno y el pRmeSU47b, el cual lleva genes involucrados en la síntesis de exo y lipopolisacáridos, transporte de ácidos dicarboxílicos, utilización de lactosa, fijación simbiótica de nitrógeno y dos loci que tienen que ver con la síntesis de tiamina (Charles y Finan, 1991). Es importante hacer notar que en *R. etli* y en *R. meliloti* existen genes implicados en la síntesis de tiamina en plásmidos diferentes al simbiótico, dado que los genes involucrados en la simbiosis tienden a estar localizados en megaplásmidos. La observación de que genes biosintéticos de tiamina se encuentren en plásmidos tanto en *R. etli*, en *R. meliloti* y en *Erwinia herbicola* y *Erwinia uredovora* (Gantotti y Beer, 1982; Thirty, 1984) es interesante. Todas son bacterias que viven en el suelo y la organización genómica de tener genes biosintéticos en plásmidos puede tener alguna razón evolutiva o funcional, aunque no se conoce la relación evolutiva entre estos diferentes plásmidos.

También se ha detectado la presencia del gene *thiC* usando una sonda intra-*thiC* en cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (en el mismo plásmido donde se localizan los genes de síntesis de lipopolisacáridos) y en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (A. García de los Santos, comunicación personal).

Los datos obtenidos nos permiten sugerir la participación de diferentes genes y la existencia de otras señales metabólicas además del O<sub>2</sub> (como por ejemplo la tiamina) en la regulación de la expresión de las citocromo oxidasas de *R. etli* y la proposición de nuevas estrategias para la selección de mutantes de *Rhizobium* con una efectividad simbiótica incrementada. Entre estas estrategias podemos citar el aislamiento de mutantes resistentes a azida de sodio y la clonación de la región que contiene al gene *thiC* de tal modo que sea transcrita a partir de un promotor fuerte y constitutivo y su posterior introducción a otras cepas de *Rhizobium* con el objetivo de aumentar su actividad de fijación de nitrógeno.

VII. FIGURAS.

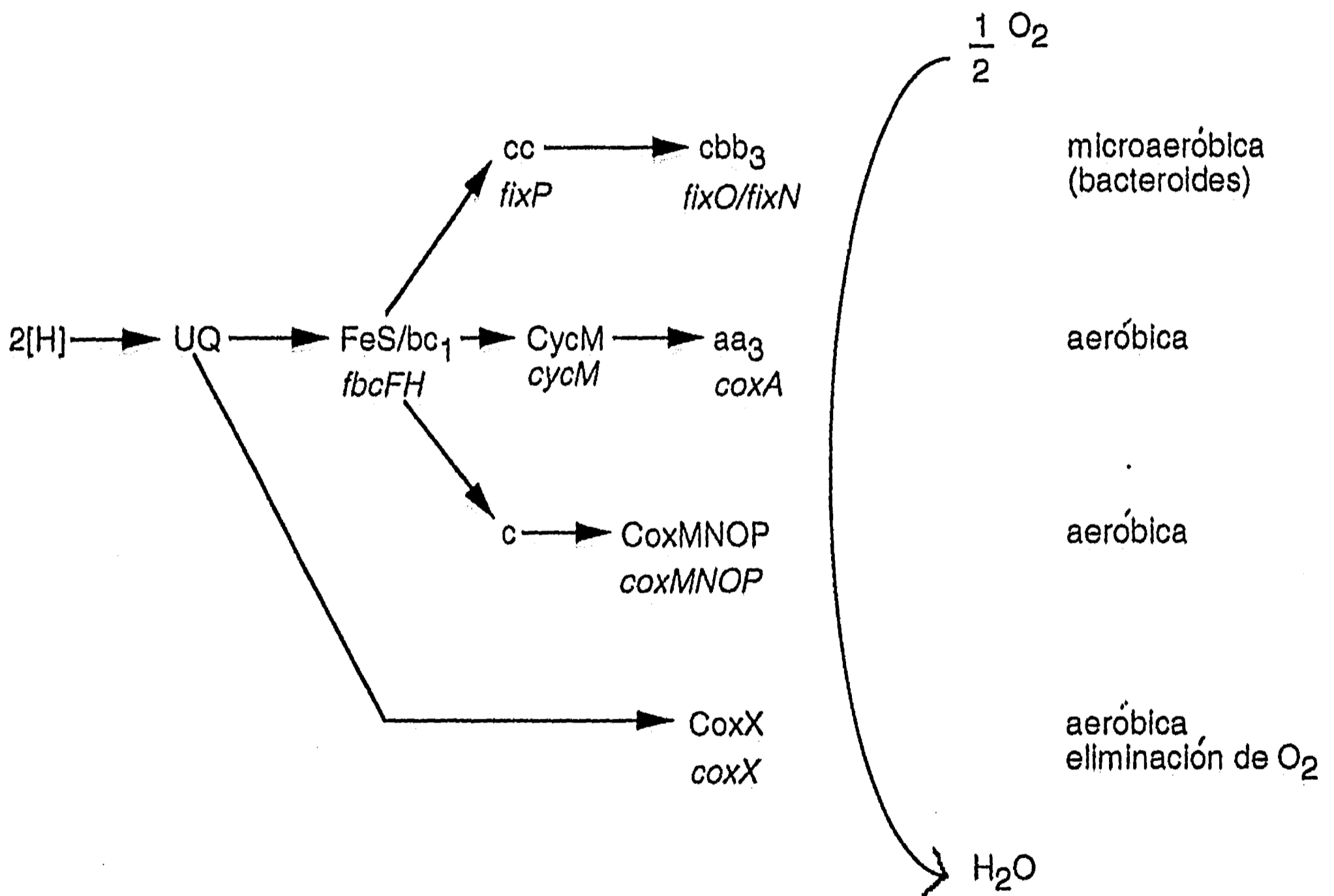


Figura 1. Modelo de la cadena respiratoria ramificada de *Bradyrhizobium japonicum*.  
 Mutaciones en los genes *fbcFH*, *fixP*, *fixO* y *fixN* producen un fenotipo Fix<sup>-</sup>.  
 UQ = ubiquinol

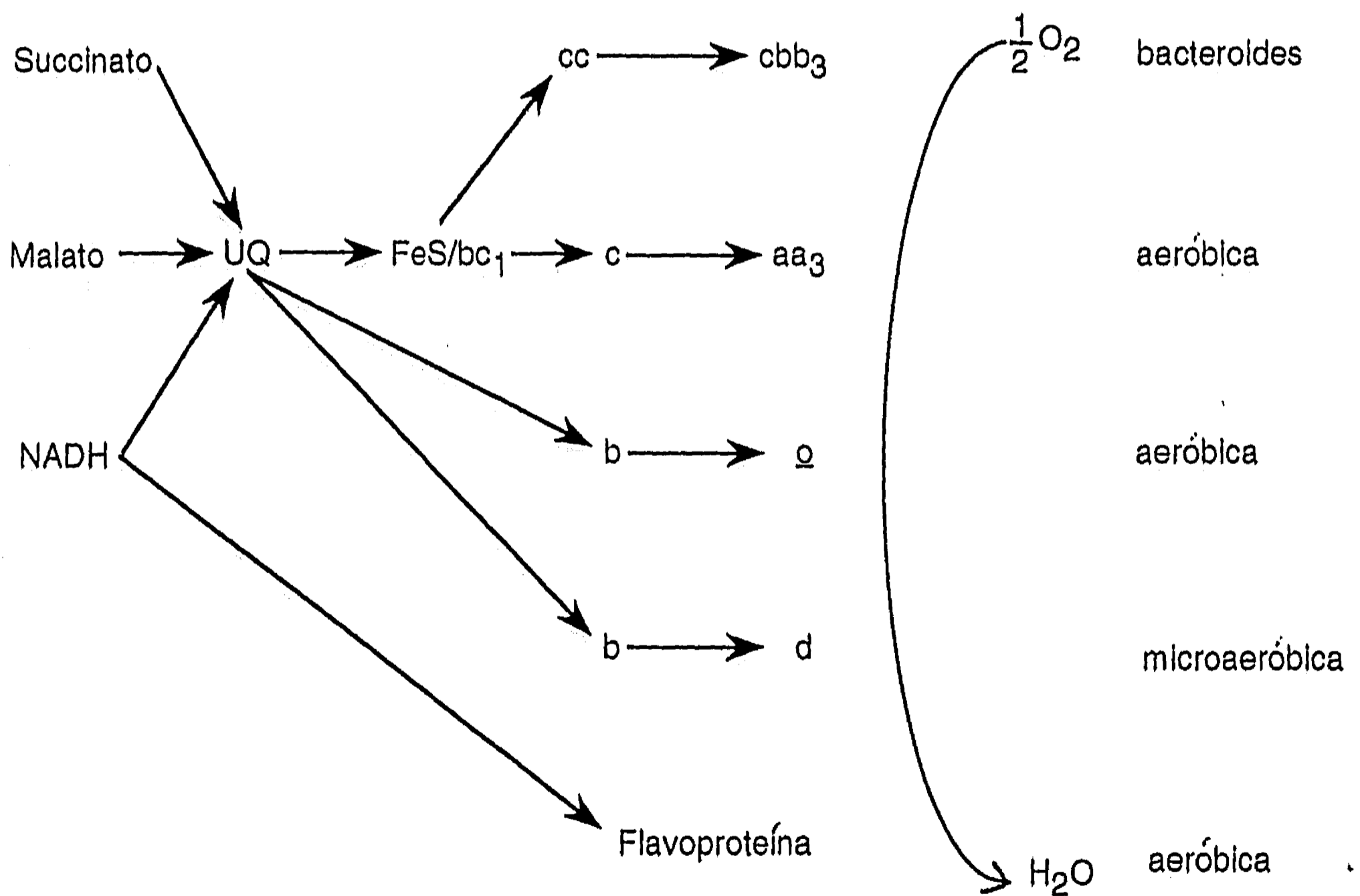


Figura 2. Cadenas respiratorias presentes en *Rhizobium etli*.  
UQ = ubiquinol.

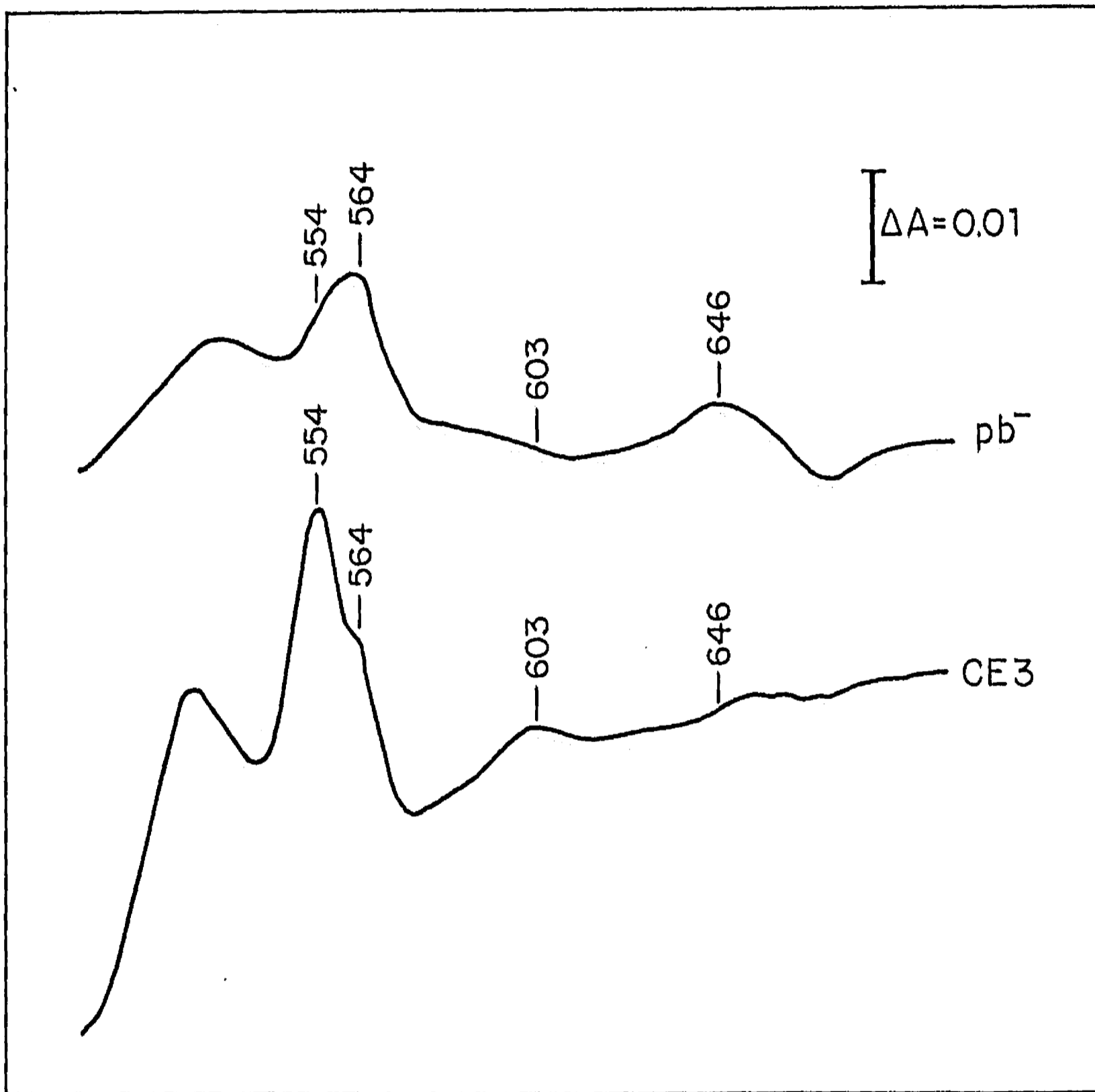


Figura 3. Espectros diferenciales (reducido con ditlonita menos oxidado con persulfato de amonio) de células completas provenientes de cultivos de 36 hrs. CE3 (cepa silvestre) y  $pb^-$  (cepa curada del p lásmido b).

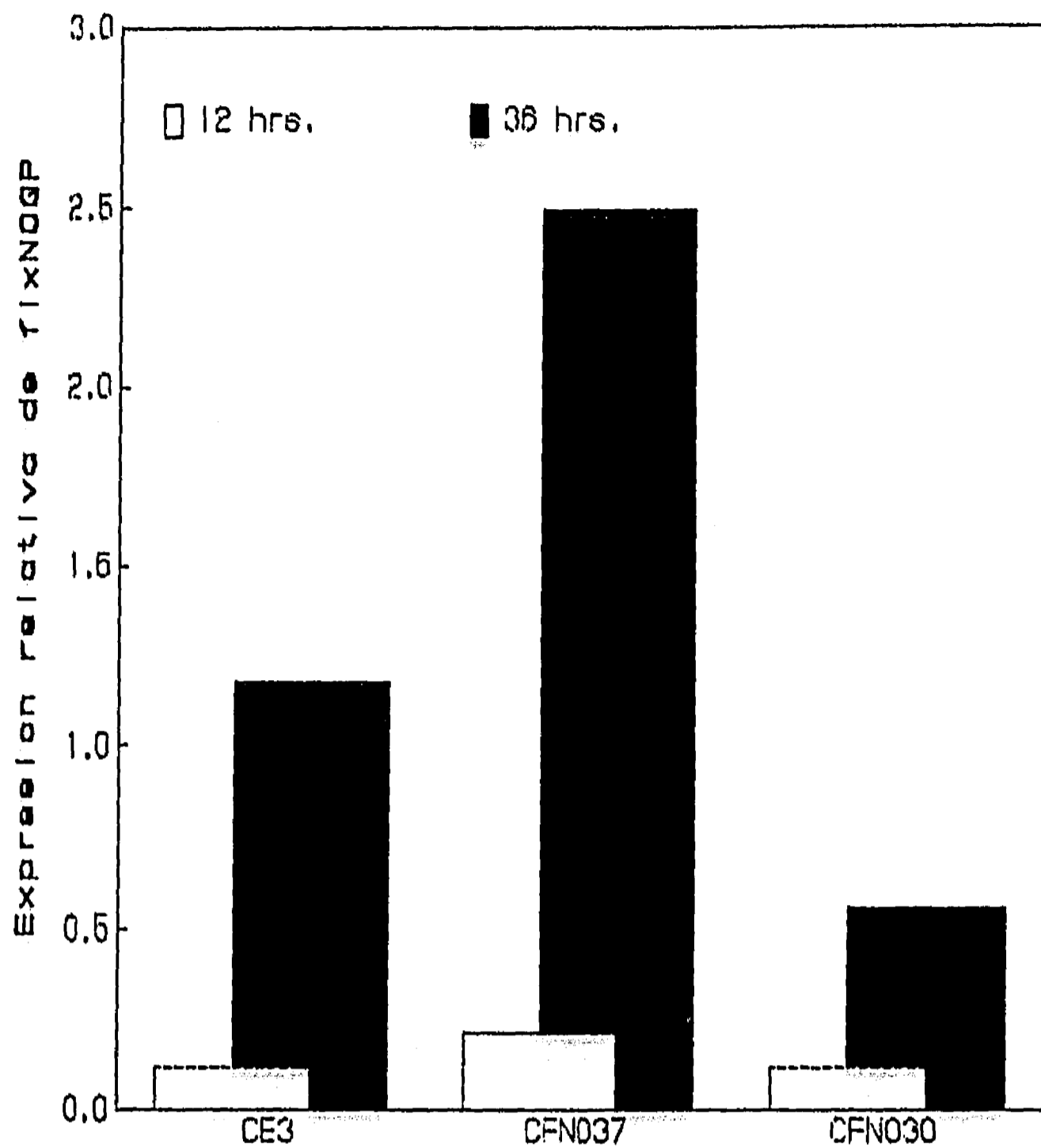


Figura 4. Expresión relativa de los genes *fixNOQP* en las cepas CE3, CFN037 y CFN030. Los niveles de expresión se cuantificaron por densitometría de los autoradlogramas de las hibridaciones en slot-blot de ARN's obtenidos de cultivos en medio YS de 12 y 36 horas. El valor obtenido con la sonda intragénica de *fixP* fue normalizado con el correspondiente valor de la hibridación con una sonda del gene de ARN ribosomal 16S.

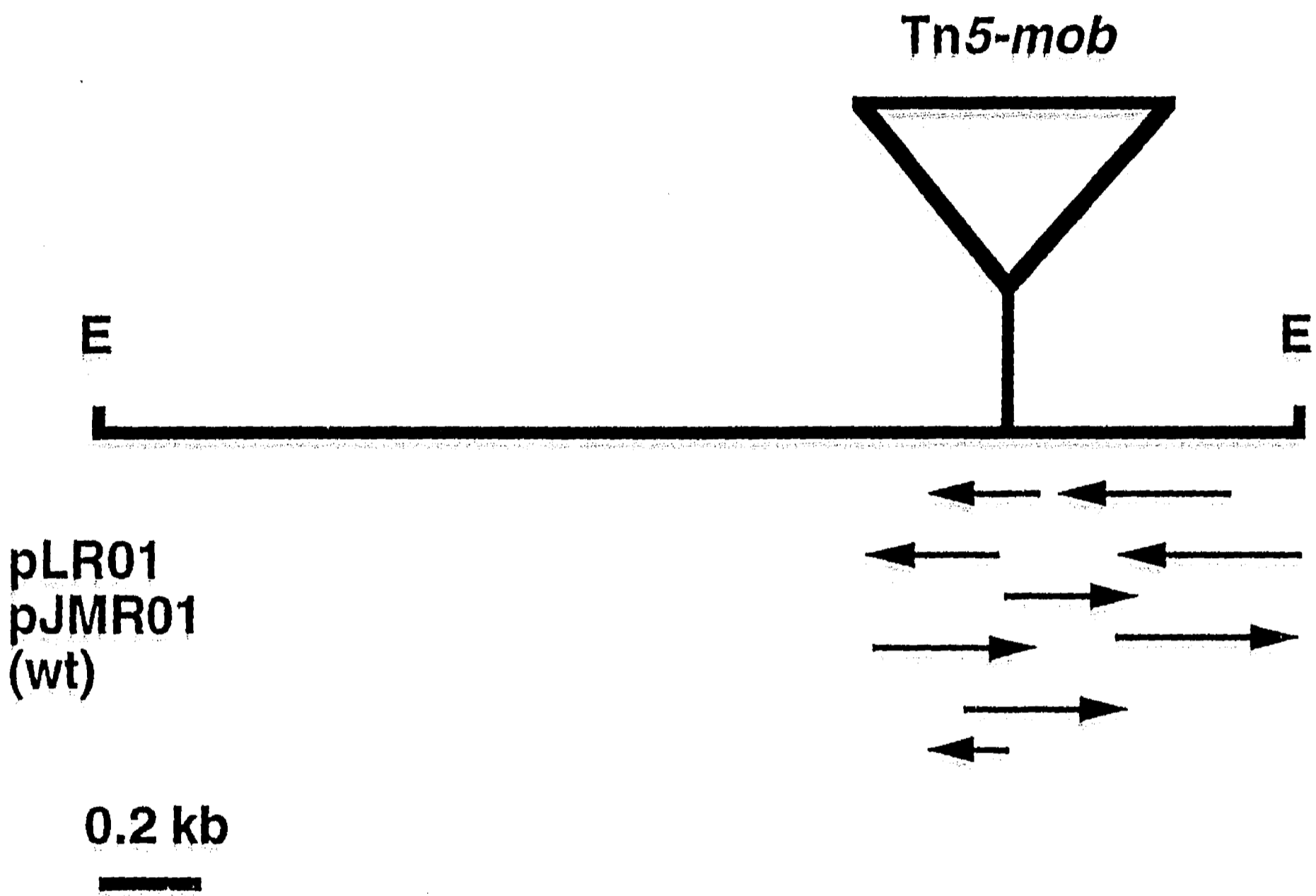


Figura 5. Mapa físico de los plásmidos pLR01 y pJMR01 . El plásmido pLR01 contiene al fragmento *EcoRI* mutado en la cepa CFN037 de *R. etli* .El plásmido pJMR01 contiene al fragmento "wild-type". Las flechas de abajo representan la estrategia de secuencia.  
E= *EcoRI*.

ACCCTGCTGCCCAAACCGATCGGGCGACTAGCAGCGACAGCCACTGCCTTG 50  
 GAACGCAAAAGGGCTTCTTGACACAAGCGCCGCTCCGGTCTTTGATGGCG 100  
 ACCATTCACCAGGGGTGCCCGGCAAGGGGCTGAGATTCTGCTGAACAATA 150  
 CGCTTTGCCTGTTGTGGCGCGTGACCCGTTGAACCTGATCCAGTTCATAC 200  
 ↓  
 TGGCGTAGGGACGGTGCGGACCTGCGGCTGTTGGGCGGATTTTCGCTTTG 250  
 TCGCGCAAGGCTCTTTTCATCATTCCAACACTGGAAGTGGGTCTCCAAAC 300  
 GTCAAACCTTGGAGCCTCATCCATGAATATTGTCGCGCCCCAGCTTACTC 350  
   M N I V A P Q L T P  
 CCGTCGTCACCACCGGCTCGCTTCCGGCCTCGACCAAGATCGTAAAACCC 400  
   V V T T G S L P A S T K I V K P  
 GGAACCCTCTATCCGGACCTGCGCGTGCCGATGCGCGAAATCAGCCTTCA 450  
 G T L Y P D L R V P M R E I S L H  
 CCCGACCTCCGGCGAGCCGCGGTAACGGTCTATGATTCCTCCGGCCCTT 500  
   P T S G E P P V T V Y D S S G P Y  
 ATACCGATCCGGCCCATGTGATCTCCATCGACGCCGGGCTGCCACGTTTG 550  
   T D P A H V I S I D A G L P R L  
 CGCGAGAGCTGGATCAAGGCCCGCGGTGATGTCGAATCCTATGACGGCCG 600  
 R E S W I K A R G D V E S Y D G R  
 CATCGTCAAACCTGAAGACAATGGTTTTGCCACCGGCGAGCGGCTGACGC 650  
   I V K P E D N G F A T G E R L T P  
 CGGAATTTCCCGTTTCGCAACACGCCGCTGAAAGCAAAAGCCGGCCGTGCC 700  
   E F P V R N T P L K A K A G R A  
 GTCACCCAGCTCGCCTATGCGCGGGCAGGCATCGTCACGCCGGAATGGA 750  
 V T Q L A Y A R A G I V T P E M E  
 GTTCATCGCAATTCGCGAAAACCTCGGCCGACAGGCAGCGAAGGAGGCAC 800  
   F I A I R E N L G R Q A A K E A L  
 TCGCGCGCGACGGCGAGAGCTTCGGCGCGCATGTTCCGGATTTTCGTGACG 850  
   A R D G E S F G A H V P D F V T  
   EcoRI  
 CCCGAATTC 859  
 P E F

Figura 6. Secuencia nucleotídica de la región aledaña a la inserción Tn5-*mob* en la cepa CFN037. Se muestra la secuencia de aminoácidos del ORF encontrado en esta región. El sitio exacto de la inserción del transposón se indica por una flecha. Un sitio potencial de unión a ribosoma que se encuentra inmediatamente hacia el 5' del codón de inicio se muestra subrayado.

```

Re .....MNIVAPQLTPVVTTGSLPASTKIVKPGTLYPDLRVPMREI 40
      . |.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:
Ec MSATKLTRREQRARAQHFIDTLEGTAFPNSKRIYITGT.HPGVRVPMREI 49

Re SLHPT.....SGEPPVTVYDSSGPYTDPAHVISIDAGLPRLRES 79
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ec QLSPTLIGGSKEQPQYEENEAI PVYDTSGPYGDPQIAINVQOGLAKLRQP 99

Re WIKARGDVESYDGRIVKPEDNGFATGERLTPEFPVRNTPLKAKAGRAVTQ 129
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ec WIDARGDTEELTVRSSDYTKARLADDGLDELRFSGVLT PKRAKAGRRVTQ 149

Re LAYARAGIVTPEMEFIAIRENLGRQAAKEALARD...GESFGAHVPDFVT 176
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ec LHYARQGIITPEMEFIAIRENMGRERIRSEVLRHQHFGMSFGAHLPENIT 199

Re PEF 179
  : | |
Ec AEF 202

```

Figura 7. Similitud entre el ORF encontrado hacia el 3' del elemento Tn5-mob de la cepa CFN037 de *R. etli* (Re) y el extremo amino terminal del producto ThiC de *E. coli* (Ec). Los números a la derecha se refieren a posiciones de aminoácidos contando a partir del extremo amino terminal de ambas proteínas. El carácter (|) se puso entre símbolos que son iguales; (:) y (.) se puso entre símbolos cuyo valor de comparación es >0.5 y >0.1, respectivamente.



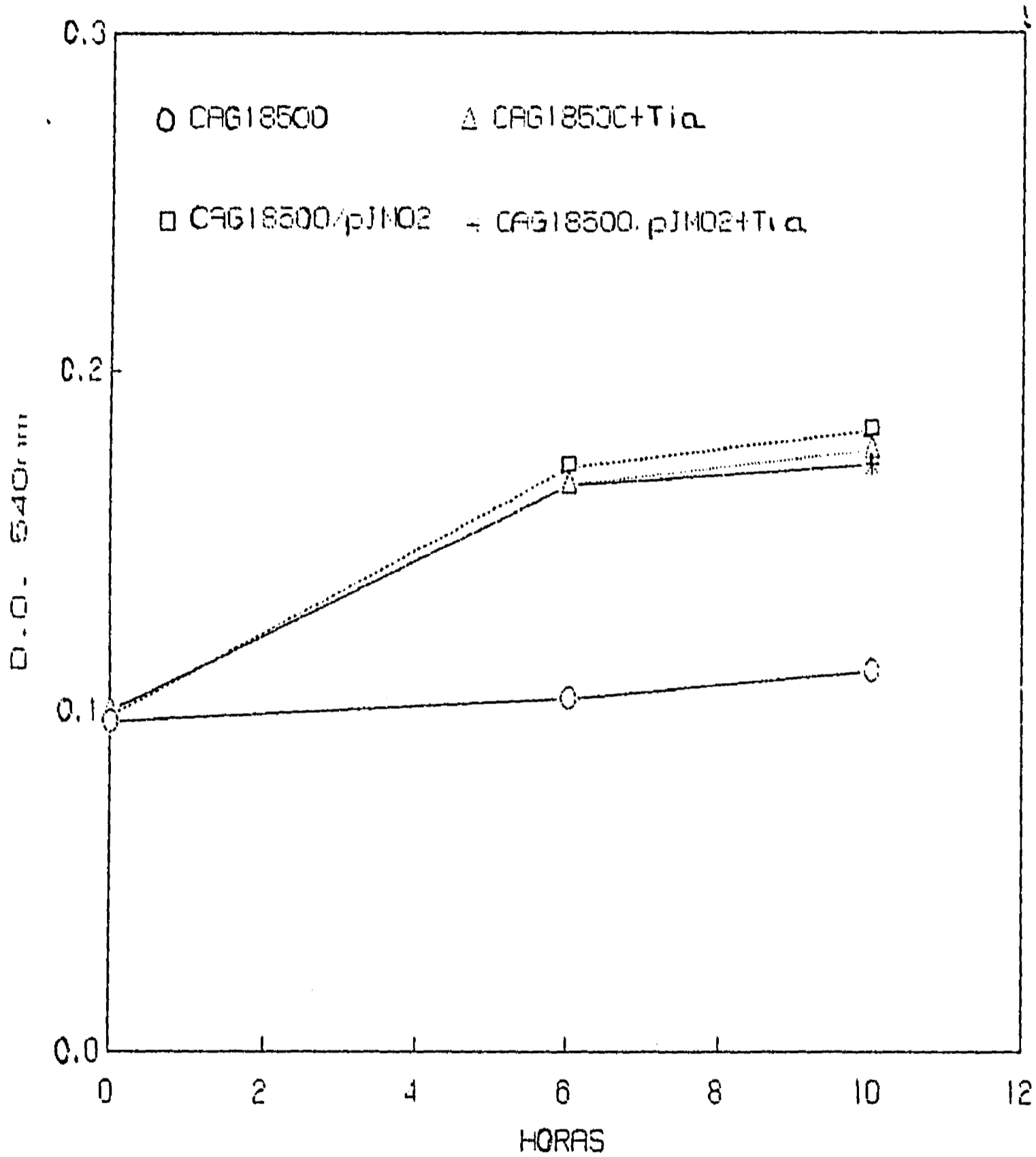


Figura 8. Complementación de la auxotrofia por tiamina de la cepa CAG18500 (*thiC39::Tn10*) de *E. coli* por la introducción del plásmido pJM02. Tia= tiamina.

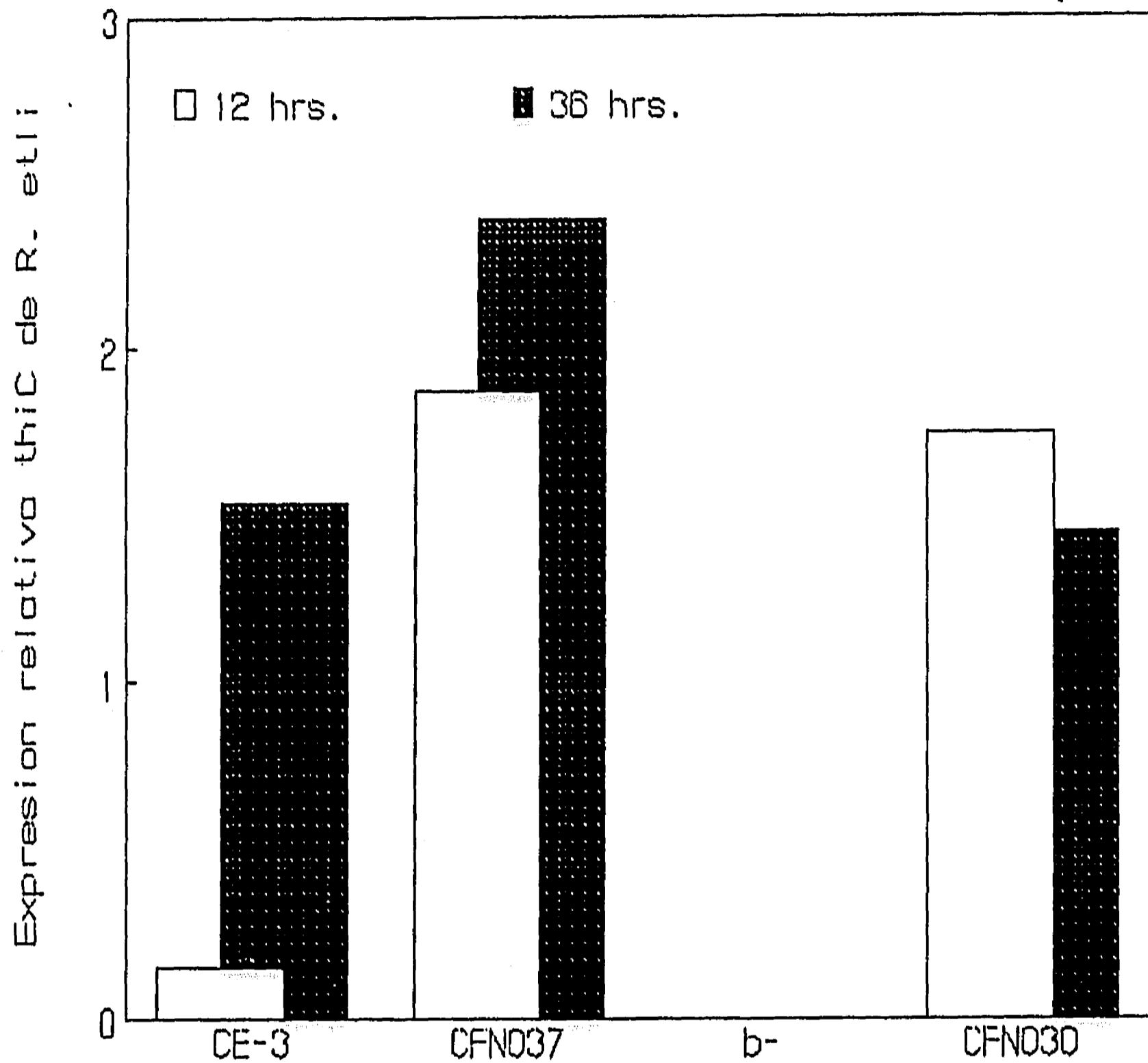


Figura 9. Niveles relativos de expresión del gen *thiC* en las cepas CE3, CFN037, CFN030 y CFNX183 (curada del plásmido b). El método de cuantificación es el descrito en la figura 4, usando como sonda un fragmento intragénico *thiC* de *R. etli* y del ARN ribosomal 16S de *E. coli*

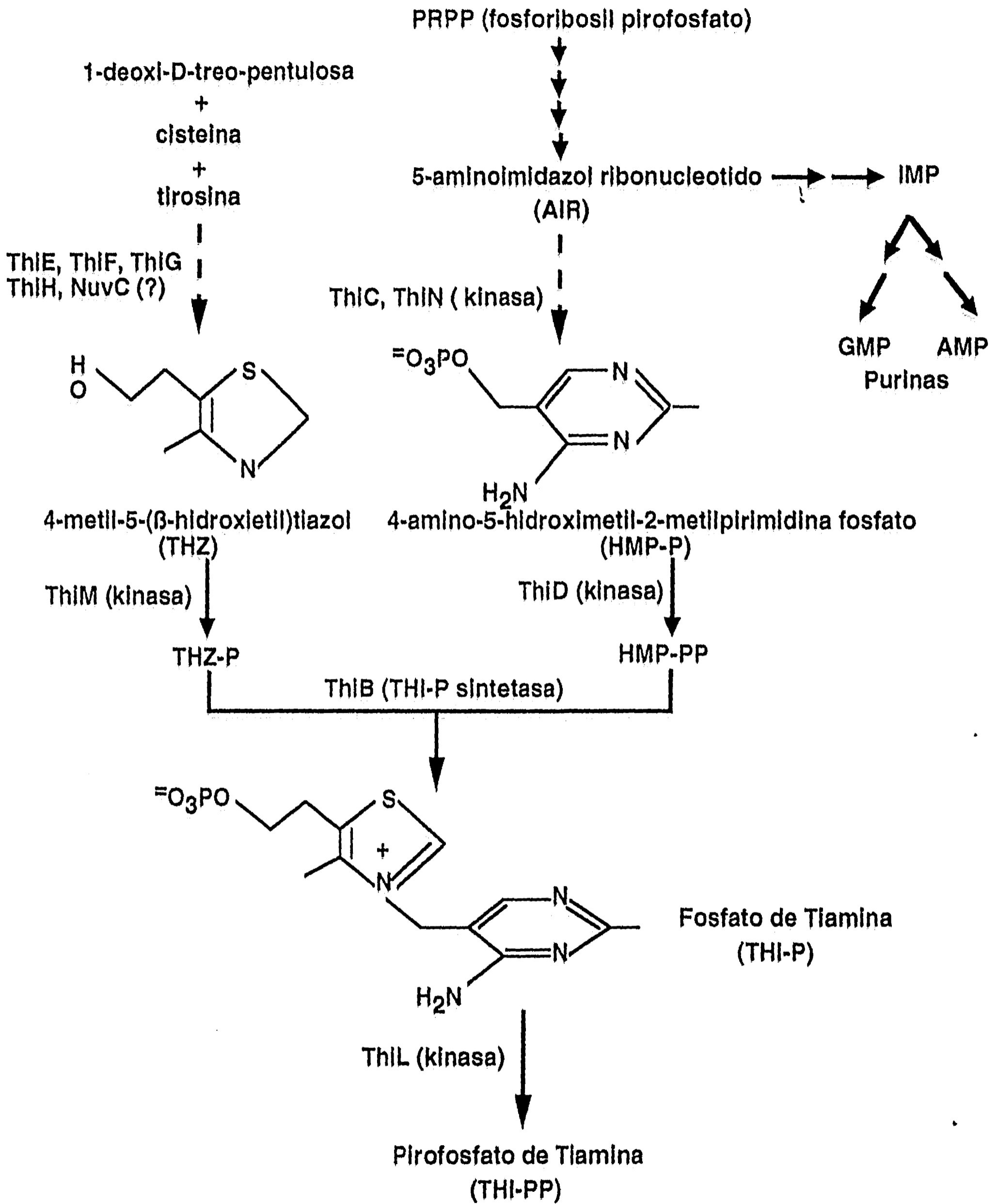


Figura 10. Vía de la biosíntesis de pirofosfato de Tiamina en *E. coli* y su relación con la biosíntesis de purinas.

## VIII.- TABLAS

TABLA 1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepa o plásmido	Característica relevante	Fuente o referencia
<i>Rhizobium etli</i>		
CE3	Cepa silvestre, Sm <sup>r</sup> .	Noel et al. 1984.
CFN037	Mutante de la CE3, TMPD <sup>++</sup> , Tn5-mob	Soberón et al. 1990.
CFN030	Mutante de la CE3, Az <sup>r</sup> , Tn5-mob.	Este trabajo.
CFNX183	Cepa curada del plásmido b, derivada de la CE3.	Brom et al. 1992.
<i>Escherichia coli</i>		
CAG18500	<i>thiC39::Tn10</i>	Singer et al. 1989.
DH5	Ap <sup>r</sup> , -complementación de <i>lacZ</i> , F <sup>-</sup> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> .	Stratagene.
<b>Plásmidos</b>		
pGEM	Ap <sup>r</sup> , vector de clonación.	Promega.
pSK	Ap <sup>r</sup> , vector de clonación.	Stratagene.

pRK290	Tc <sup>r</sup> , Tra <sup>r</sup> , amplio espectro.	Ditta et al. 1980.
pLAFR1	pRK290:: <i>cos</i>	Friedman et al. 1982
pLR01	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pGEM que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> con el Tn5-mob de la cepa CFN037.	Este trabajo.
pJMR01	Ap <sup>r</sup> , pSK que contiene el fragmento wild-type <i>EcoRI</i> de 2.7 kb.	Este trabajo.
pJMR02	Ap <sup>r</sup> , pSK que contiene un fragmento <i>Bam</i> HI de 9 kb. que incluye al fragmento <i>Eco</i> RI de 2.7 kb.	Este trabajo.
pJMR1045	Cósmidos en pLAFR1 contienen_	Este trabajo.
pJMR1121	do el fragmento <i>Eco</i> RI de 2.7 kb.	
pJMR1149		
pJMR1188		
pKK3535	Ap <sup>r</sup> , contiene a los genes ribosomales 5S, 16S y 23S.	Brosius et al. 1981.
pMSfix1	Ap <sup>r</sup> , pSPTBM20 que contiene un fragmento de 3.5 kb. con el operón <i>fixNOQP</i> de <i>B. japonicum</i> .	M. Soberón, no publicado.
pMSfix2	Ap <sup>r</sup> , pSK conteniendo un fragmento <i>Bam</i> HI de 0.8 kb con el gene <i>fixP</i> de <i>R. etli</i> .	M. Soberón, no publicado.

## IX.- BIBLIOGRAFIA.

Anthamatten, D. y Hennecke, H. 1991. The regulatory status of the *fixL*- and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 225: 38-48.

Anthamatten, D., Scherb, B. y Hennecke, H. 1992. Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene showing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* genes. *J. Gen. Microbiol.* 174: 2111-2120.

Appleby, C.A. 1984. Leghaemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. of Plant Physiol.* 35:443-478.

Appleby, C.A. y Bergersen, F.J. 1958. Cytochromes of *Rhizobium*. *Nature* 182:1174.

Appleby, C.A. et al. 1991. *FEMS Microbiol. Lett.* 83: 137-144.

Babcock, G.T. y Wikström, M. 1992. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356: 301-309.

Barak, R., Nur, I., Okon, Y. y Henis, Y. 1982. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bact.* 152: 643-649.

Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, E. 1991a. Cytochrome d expression and regulation pattern in free living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 115: 114-119.

Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, J.E. 1991b. An alternative non-cytochrome containing branch in the respiratory system of free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 155: 428-435.

Batut, J., Daveran-Mingot, M.L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M. y Kahn, D. 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* 8: 1279-1286.

Bergersen, F.J. 1984. Oxygen and the physiology of diazotrophic organisms. En: *Advances on Nitrogen Fixation Research* C. Veeger y W.E. Newton (eds.), pp. 171-180. Nijhoff, Junk and Pudoc, The Hague and Wageningen, The Netherlands.

Birkenhead, K., Manian, S.S. y O'Gara, F. 1988. Dicarboxylic acid transport in *Bradyrhizobium japonicum*: use of *Rhizobium meliloti dct* gene(s) to enhance nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 170: 184-189.

Boistard, P., Batut, J., David, M., Fourment, J., Garnerone, A.M., Kahn, D., de Philip, P., Reyrat, J.M. y Waelkens, F. 1991. Regulation of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. En H. Hennecke y D.P.S. Verma, eds. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Vol.I, pp. 195-202, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Bott, M., Bolliger, M. y Hennecke, H. 1990. Genetic analysis of the cytochrome *c*-aa<sub>3</sub> branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. *Mol. Microbiol.* 4: 2147-2157.

Bott, M., Ritz, D. y Hennecke, H. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum* *cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. *J. Bacteriol.* 173: 6766-6772.

Bott, M., Preisig, O. y Hennecke, H. 1992. Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 158: 335-343.

Brom, S., García de los Santos, A., Stepkosky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D. and Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174: 5183-5189.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. y Noller, H.F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148: 107-127.

Brown, G.M. y Williamson, J.M. 1987. Biosynthesis of folic acid, riboflavin, thiamine and pantothenic acid, p.521-538. En F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umberger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.

Buse, G., Hensel, S. y Fee, J.A. 1989. Evidence for cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome *c*-subunit II fused protein in the cytochrome '*c*<sub>1</sub>aa<sub>3</sub>' of *Thermus thermophilus*. How old is cytochrome oxidase? *Eur. J. Biochem.* 181: 261-268.

Cava, J.R., Elias, P.M., Turowsli, D.A. y Noel, K.D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic region encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171:8-15.

Clark, A.J., Satin, L. y Chu, C.C. 1994. Transcription of the *Escherichia coli* *recE* gene from a promoter in Tn5 and IS50. *J. Bacteriol.* 176: 7024-7031.

Colonna-Romano, S., Arnold, W., Schlüter, A., Boistard, P., Pühler, A. y Priefer, U.B. 1990. An Fnr-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* *fixK*. *Mol. Gen. Genet.* 223: 138-147.

Cotter, P.A., Chepuri, V., Gennis, R.B. y Gunsalus, R.P. 1990. Cytochrome o (*cyoABCDE*) and d (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* 172: 6333-6338.

Charles, T.C. y Finan, T.M. 1991. Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated in vivo. *Genetics* 127:5-20.

Chepuri, V., Lemieux, L., Au, D.C. y Gennis, R.B. 1990. The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the *aa3*-type family of cytochrome *c* oxidases. *J. Biol. Chem.* 265: 11185-11192.

Daniel, R.M. y Appleby, C.A. 1972. Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *Rhizobium japonicum*: effects on cytochrome P450, other haemoproteins, nitrate and nitrite reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 275: 347-354.

David, M., Daveran, M-L., Batut, J., Dediev, A., Domergue, O., Ghal, J., Hertig, C., Boistard, P. y Kahn, D. 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54: 671-683.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351.

Evans, H.J., Harker, A.R., Papen, H., Russel, S.A., Hanus, F.J. y Zuber, M. 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in *Rhizobia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 335-361.

Ferguson, S.J. 1988. En Anthony C., ed. *Bacterial Energy Transduction*, pp 151-182, Academic Press, London.

Friedman, A.N., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J. y Ausubel, F.M. 1982. Construction of a broad host range cosmid vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18: 289-296.

Frustaci, J.M., Sangwan, I. and O'Brian, M.R. 1991. Aerobic growth and respiration of a delta-aminolevulinic acid synthase (*hema*) mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 173: 1145-1150.

Gabel, C. y Maier, R.J. 1990. Nucleotide sequence of the *coxA* gene encoding subunit I of cytochrome *aa3* of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res.* 18: 6143.

Gallon, J.R. 1992. Tansley review No. 44. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. *New Phytol.* 122: 571-609.

Gantotti, B.V. y Beer, S.V. 1982. Plasmid-borne determinants of pigmentation and thiamine prototrophy in *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 151: 1627-1629.

García, E. 1992. Tesis de Licenciatura, UNAM. Papel del citocromo *aa3* en la fijación simbiótica de nitrógeno: análisis de una mutante *aa3* de *Rhizobium phaseoli*.

Gennis, R.B. 1991. Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome *c* reductases and cytochrome *c* oxidases. *Biochem. Biophys. Acta* 1058: 21-24.



de Gier, J.-W.L., Lubben, M., Reijnders, W.N.M., Tipker, C.A., Slotboom, D.-J., van Spanning, R.J.M., Stouthamer, A.H. y van der Oost, J. 1994. The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. Mol. Microbiol. 13: 183-196.

Gilles-Gonzalez, M.A., Ditta, G.S. y Helinski, D.R. 1991. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. Nature (London) 350: 170-172.

Gray, K.A., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter y Daldal, F. 1994. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a Cu<sub>A</sub> center. Biochemistry 33: 3120-3127.

Guerinot, M.L. y Chelm, B.K. 1986. Bacterial delta-aminolevulinic acid synthase activity is not essential for leghemoglobin formation in soybean/*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1837-1841.

Harris, S.L. y Silvester, W.B. 1992. Oxygen controls the development of *Frankia* vesicles in continuous culture. New Phytol. 121: 43-48.

Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 319-344.

Hill, S. 1988. How is nitrogenase regulated by oxygen. FEMS Microbiol. Rev. 34: 111-130.

Hill, S., Viollet, S., Smith, A.T. y Anthony, C. 1990. Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N<sub>2</sub> fixation and microaerobiosis. J. Bacteriol. 172: 2071-2078.

Hoffman, P.S., Morgan, T.V. y DerVartanian, D. 1979. Respiratory-chain characteristics of mutants of *Azotobacter vinelandii* negative to tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase. Eur. J. Biochem. 100: 19-27.

Iuchi, S., Cameron, D.C. y Lin, E.C.C. 1989. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171: 868-873.

Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H.-A., Gennis, R.B. y Lin, E.C.C. 1990. Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the *arc* regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and *lac* fusions of *cyo* and *cyd*. J. Bacteriol. 172: 6020-6025.

Jensen, B.B. y Cox, R.P. 1983. Effect of oxygen concentration on dark nitrogen fixation and respiration in cyanobacteria. Arch. of Microbiol. 135: 287-292.

Kahn, D., Batut, J., Daveran, M.L. y Fourment, J. 1993. Structure and regulation of the *fixNOQP* operon from *Rhizobium meliloti*. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.), New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.

Kaminski, P.A., Mandon, K., Arigoni, F., Desnoues, N. y Elmerich, C. 1991. Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*:

identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. Mol. Microbiol. 5: 1983-1991.

Keefe, R.G. y Maier, R.J. 1993. Purification and characterization of an O<sub>2</sub>-utilizing cytochrome c oxidase complex from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid membranes. Biochim. Biophys. Acta 1183: 91-104.

Keister, D.L. y Marsh, S.S. 1990. Hemoproteins of *Bradyrhizobium japonicum* cultured cells and bacteroids. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2736-2741.

Kelly, M.J.S., Poole, R.K., Yates, M.G. y Kennedy, C. 1990. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome bd terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome d complex are unable to fix nitrogen in air. J. Bacteriol. 172: 6010-6019.

Kitts, C.L. y Ludwig, R.A. 1994. *Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases. J. Bacteriol. 176: 886-895.

Kretovich, W.L., Romanov, V.I. y Korolyov, A.U. 1973. *Rhizobium leguminosarum* cytochromes (*Vicia faba*). Plant Soil 39: 614-634.

Layzell, D.B., Diaz del Castillo, L., Hunt, S., Kuzma, M., van Cauwenberghe, O. y Oresnik, I. 1993. The regulation of oxygen and its role in regulating nodule metabolism. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.

Lilly, D.M.J. 1991. When the CAP fits bent DNA. Nature (London) 354: 359-360.

Maier, R.J. y Brill, W.J. 1978. Mutant strains of *Rhizobium japonicum* with increased ability to fix nitrogen for soybean. Science 201: 448-450.

Maier, R.J., Moshiri, F., Keefe, R.G. y Gabel, C. 1990. Molecular analysis of terminal oxidases in electron-transport pathways of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azotobacter vinelandii*. En Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives, pp 301-308, Editores: P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton eds. Chapman and Hall, New York.

Mandon, K., Kaminsky, P.A. y Elmerich, C. 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. J. Bacteriol. 176: 2560-2568.

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

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

Membrillo Hernández, J. 1991. Tesis de Licenciatura, UNAM. Regulación de la expresión de las oxidasas terminales o y aa<sub>3</sub> en *Rhizobium phaseoli*: aislamiento de una mutante respiratoria con mayor fijación de nitrógeno.

Minagawa, J., Mogi, T., Gennis, R.B. y Anraku, Y. 1992. Identification of heme and copper ligands in subunit I of the cytochrome bo complex in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 267: 2096-2104.

Moore, G.R. y Pettigrew, G.W. 1990. Cytochromes c: evolutionary, structural and physicochemical aspects. Springer-Verlag, Berlin.

Murry, M.A., Horne, A.J. y Benemann, J.R. 1984. Physiological studies of oxygen protective mechanisms in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. App. and Env. Microbiol. 47: 449-454.

Murry, M.A., Fontaine, M.S. y Tjepkema, J.D. 1984. Oxygen protection of nitrogenase in *Frankia* sp. HFPA13. Arch. of Microbiol. 139:162-166.

Murry, M.A., Zhang, Z. y Torrey, J.G. 1985. Effect of O<sub>2</sub> on vesicle formation, acetylene reduction and O<sub>2</sub>-uptake kinetics in *Frankia* sp. HFPCc13 isolated from *Casuarina cunninghamiana*. Canadian J. of Microbiol. 31: 804-809.

Nautiyal, C., van Berkum, P., Sadowsky, M.J. y Keister, D.L. 1989. Cytochrome mutants of *Bradyrhizobium* induced by transposon Tn5. Plant Physiol. 90: 553-559.

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

Noel, K.D. 1992. Rhizobial polysaccharides required in symbiosis with legumes, p.342-357. En D.P.S. Verma (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla, USA.

O'Brian, M., Kirshbom, P.M. y Maier, R.J. 1987. Tn5-induced cytochrome mutants of *Bradyrhizobium japonicum*: effects of the mutations on cells grown symbiotically and in culture. J. Bacteriol. 169: 1089-1094.

O'Brian, M.R. and Maier, R.J. 1987. Isolation of a cytochrome aaz<sub>3</sub> gene from *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 3219-3223.

O'Brian, M.R. and Maier, R.J. 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbiosis. Biochim. Biophys. Acta 974: 229-246.

Paerl, H.W. y Prufert, L.E. 1987. Oxygen-poor microzones as potential sites of microbial N<sub>2</sub> fixation in nitrogen-depleted aerobic marine waters. Applied and Environ. Microbiol. 53: 1078-1087.

Paerl, H.W. y Carlton, R.G. 1988. Control of nitrogen fixation by oxygen depletion in surface associated microzones. Nature (London) 332: 260-262.

Plazinski, J. 1981. Tn5-inherited mutant strain of *Rhizobium meliloti* with a highly increased ability to fix nitrogen for lucerne. Microbiol. Lett. 18: 137-142.

Ponce, M.R. y Micol, J.L. 1992. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 20: 623.

Poole, R.K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases: a structurally and functional diverse group of electron transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 726: 205-243.

Poole, R.K. 1988. En Anthony C, ed. *Bacterial Energy Transduction*, pp 231-291, Academic Press, London.

Preisig, O., Anthamatten, D. y Hennecke, H. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3309-3313.

Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R.B. y Wikström, M. 1991. Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30: 3936-3942.

Qureshi, M.H., Yumoto, I., Fujiwara, T., Fukumori, Y. y Yamanaka, T. 1990. A novel co-type cytochrome c oxidase from a facultative alkalophilic *Bacillus*: purification and some molecular and enzymatic features. *J. Biochem. (Tokio)* 107: 480-485.

Ranaweera, S.S. y Nicholas, D.J.D. 1985. Cytochromes c-550 and c-552 as electron donors for nitrate and nitrite reductases in membrane fractions of *Rhizobium japonicum* CC705. *Biochem. Int.* 10: 415-423.

Rees, D.C., Kim, J., Georgiadis, M., Chan, M.K., Komiya, H., Woo, D., Chirino, A.J., Schlessman, J. y Hsu, B.T. 1993. Structures and functions of the nitrogenase proteins. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.

Reiner, O. y Okon, Y. 1986. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. of Microbiol.* 32: 829-834.

Ritz, D., Bott, M. y Hennecke, H. 1993. Formation of several bacterial c-type cytochromes requires a novel membrane-anchored protein that faces the periplasm. *Mol. Microbiol.* 9: 729-740.

Ronson, C.W., Bosworth, A., Genova, M., Gudbransen, S., Hankinson, T., Kwiatkowski, R., Ratcliffe, H., Robie, C., Sweeney, W., Williams, M. y Zablutowicz, R. 1990. Field release of genetically-engineered *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum*. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, pp 397-403, Editores: P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton eds. Chapman and Hall, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Santana, M., Kunst, F., Hullo, M.F., Rapoport, G., Danchin, A. y Glaser, P. 1992. Molecular cloning, sequencing, and physiological characterization of the *qox* operon from *Bacillus subtilis* encoding the aa<sub>3</sub>-600 quinol oxidase. *J. Biol. Chem.* 267: 10225-10231.

Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* 23: 331-366.

Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lubben, M. y van der Oost, J. 1991. The happy family of cytochrome oxidases. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 608-612.

Schlüter, A., Patschkowski, Weidner, S., Uden, G., Hynes, M.F. y Priefer, U. 1993. Functional and regulatory characteristics of FnrN, an oxygen-responsive transcriptional activator in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.

Shapleigh, J.P., Hosler, J.P., Tecklenburg, M.M., Kim, Y., Babcock, G.T., Gennis, R.B. y Ferguson, S. 1992. Definition of the catalytic site of cytochrome c oxidase: specific ligands of heme a and the heme a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4786-4790.

Shine, J. and Dalgarno, L. 1975. Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature (London)* 254: 34-38.

Shukla, R.S., Singh, C.B. y Dubey, J.N. 1989. Induced genetic variability in *Rhizobium leguminosarum* for nitrogen fixation in *Vicia faba* L. *Theor. Appl. Genet.* 78: 433-435.

Singer, M., Baker, T.A., Schnitzler, G., Deischel, M., Goel, M., Dove, W., Jaacks, K.J., Grossman, A.D., Erickson, J.W. y Gross, C.A. 1989. Collection of strains containing genetically linked alternative antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 53: 1-24.

Smith, A., Hill, S. y Anthony, C. 1990. The purification, characterization and role of the d-type cytochrome oxidase of *Klebsiella pneumoniae* during nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 171-180.

Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K. y Escamilla, E. 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171: 465-472.

Soberón, M., Membrillo-Hernández, Aguilar, G.R. y Sánchez, F. 1990. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa<sub>3</sub>. *J. Bacteriol.* 171: 465-472.

Soberón, M., Aguilar, G.R. and Sánchez, F. 1993. *Rhizobium phaseoli* cytochrome c-deficient mutant induces empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L. *Mol. Microbiol.* 8: 159-166.

Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Tak, T., Goosen-DeRoo, L., Pees, E., Van Brussel, A.A.N. y Lugtenberg, B.J.J. 1989. Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid *nodD* product. *J. Bacteriol.* 171: 4045-4053.

Spiro, S. y Guest, J.R. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences.* 16: 310-314.

Stock, J.B., Stock, A.M. y Mottonen, J.M. 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature (London)* 344: 395-400.

Tabche, M.L. 1995. Tesis de Maestría, UNAM. Identificación de genes involucrados en la expresión de citocromos tipo c y la oxidasa terminal  $a_2a_3$  de *Rhizobium etli*.

Thirty, G. 1984. Plasmids of the epiphytic bacterium *Erwinia uredovora*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1623-1631.

Thöny, B., Kaluza, K. y Hennecke, H. 1985. Structural and functional homology between the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the nitrogenase MoFe protein as revealed by sequencing the *Rhizobium japonicum nifK* gene. *Mol. Gen. Genetics* 198: 441-448.

Thöny-Meyer, L., Ritz, D. y Hennecke, H. 1989. An unusual gene cluster for the cytochrome  $bc_1$  complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell* 57: 683-697.

Thöny-Meyer, L., James, P. y Hennecke, H. 1991. From one gene to two proteins: the biogenesis of cytochrome b and  $c_1$  from *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5001-5005.

Thöny-Meyer, L., Ritz, D. y Hennecke, H. 1994. Cytochrome c biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. *Mol. Microbiol.* 12: 1-9.

Tjepkema, J.D., Schwintzer, C.R. y Benson, D.R. 1986. Physiology of actinorhizal nodules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 209-232.

Trumpower, B.L. 1990. Cytochrome  $bc_1$  complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* 54: 101-129.

Tully, R.E., Sadowsky, M.S. y Keister, D.L. 1991. Characterization of cytochromes c550 and c555 from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, mutagenesis, and sequencing of the c55 gene (*cycC*). *J. Bacteriol.* 173: 7887-7895.

Tully, R.E. y Keister, D.L. 1993. Cloning and mutagenesis of a cytochrome P-450 gene from *Bradyrhizobium japonicum*. En R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton (eds.). *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.393-398.

Vander Horn, P.B., Backstrom, A.D., Stewart, V. y Begley, T.P. 1993. Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (*thiCEFGH*) in *Escherichia coli* K-12. *J. of Bacteriology* 175: 982-992.

von Wachenfeldt, C. y Hederstedt, L. 1990. *Bacillus subtilis* 13-kilodalton cytochrome c-550 encoded by *cca* consists of a membrane-anchor and a heme domain. *J. Biol. Chem.* 265: 13939-13948.

Waelkens, F., Foglia, A., Morel, J.B., Fourment, J., Batut, J. y Boistard, P. 1992. Molecular genetic analysis of the *Rhizobium meliloti fixK* promoter: identification of sequences involved in positive and negative regulation. *Mol. Microbiol.* 6: 1447-1456.

Williams, P.M. 1981. The isolation of effective and ineffective mutants of cowpea *Rhizobium*. Plant Soil 60: 349-356.

Wolk, C.P. 1982. Heterocysts. En: The Biology of Cyanobacteria (Editores: N.G. Carr y B.A. Whitton), pp. 359-386. Blackwell, Oxford., Reino Unido.