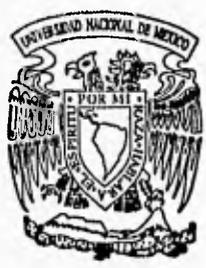


17
2y^o



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
C. I. F. N.

"AMPLIFICACION DE LOS GENES
REGULADORES *syrM-nodD3-syrA* DE
Rhizobium meliloti cepa Rm 41."

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
Q U E P R E S E N T A
DANIEL BALLEZA MEJIA



México, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION RECODAR

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Amplificación de los genes regulatorios *syrM-nodD3-syrA* de *Rhizobium meliloti* cepa Rm41"

realizado por Daniel Balleza Mejía

con número de cuenta 8718041-7 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Rafael Palacios de la Lama
Propietario Dra. Georgina Hernández Delgado
Propietario M. en C. Víctor M. Valdés López
Suplente Dr. Jesús Manuel León Cázares
Suplente Dr. Rodrigo A. Cárdenas y Espinosa

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN
DE BIOLÓGICOS

A mis padres **Daniel y Guadalupe**.
Gracias por sus años de dedicación para conmigo
pero sobre todo gracias por su amor incondicional...

A mis hermanos **Alicia y Humberto**.
Gracias por los incontables momentos de alegría
y por el gran cariño que siempre nos mantendrá unidos...

A mis abuelitos **Enrique y Yolanda**.
Por el cariño especial que siempre hemos tenido
y que nada cambiará...

A mis abuelitos **Alejandro e Isabel**.
Por su cariño...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Palacios de la Lama y la Dra. Georgina Hernández Delgado por las facilidades para la realización de este trabajo y la revisión del manuscrito.

Al Dr. Patrick Mavingui M. y a la M. Margarita Flores López por su ayuda en la realización de las técnicas utilizadas.

A Virginia Quinto, Rosa M^a. Ocampo y M^a. de los Angeles Moreno por su valiosa y desinteresada ayuda dentro del laboratorio.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO por permitirme ser parte de ella...

"Cuando se piensa en el inmenso cambio
recorrido por la evolución,
quizás desde hace millones de años,
en la prodigiosa riqueza de las estructuras que ha creado
y la milagrosa eficacia de las cualidades de los seres vivos,
desde la 'bacteria' hasta el 'hombre',
cabe dudar que todo esto pueda ser el producto de una enorme lotería,
tirando al azar números entre los que una selección ciega ha designado
extraños ganadores..."

J. Monod

INDICE DE CONTENIDO

Resúmen/Abstracts	6
I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. El sistema dinitrogenasa	9
I.2. El establecimiento de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -Leguminosa	14
I.3. Importancia ecológica de la simbiosis	21
I.4. El genoma de <i>Rhizobium meliloti</i>	25
I.5. La proteína NodD, un regulador positivo	28
I.6. Los genes reguladores <i>symM</i> y <i>nodD3</i> de <i>Rhizobium meliloti</i>	30
II. ANTECEDENTES	35
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	44
III.1. Esquema de Trabajo	46
IV. OBJETIVOS	47
IV.1. Manipulación molecular del genoma de <i>Rhizobium meliloti</i> 41.....	47
V. MATERIALES Y MÉTODOS	47
V.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	47
V.2. Cepas bacterianas y plásmidos.....	50
V.3. Purificación de plásmidos	50
V.4. Transformación de cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	53
V.5. Restricción de ADN plasmídico	53
V.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	54
V.7. Defosforilación de fragmentos de ADN	55
V.8. Ligación de moléculas de ADN con extremos adherentes	55
V.9. Conservación de cepas bacterianas	56
V.10. Transconjugación o cruza triparental. Cointegración del vector por recombinación homóloga	56
V.11. Purificación de ADN genómico de <i>R. meliloti</i>	57
V.12. Geles tipo Southern: Transferencia de ADN digerido a membranas de nylon. Hibridización con sondas génicas específicas	58

V.13. Electroforesis de megaplásmidos de <i>R. meliloti</i> .	
Geles tipo Eckhardt	60
V.14. Selección de cepas de <i>R. meliloti</i> con amplificaciones <i>in situ</i>	61
V.15. Análisis densitométrico de las regiones amplificadas	62
VI. RESULTADOS	62
VI.1. Purificación del vector de clonación (pSUP205) y de los fragmentos de ADN con los genes <i>syrM-nadD3-syrA</i> de <i>R. meliloti</i> 41	62
VI.2. Construcción del plásmido integrativo pSMD3-Tc	65
VI.3. Integración de la molécula de ADN no duplicativa pSMD3-Tc en el pSym- α de <i>R. meliloti</i> 41	76
VI.4. Selección y Naturaleza de los Fenómenos de Amplificación	83
VI.5. Análisis densitométrico de las amplificaciones obtenidas	85
VI.6. Inestabilidad de la zona amplificada	92
VII. DISCUSIÓN	94
VII.1. Algunas aplicaciones de la amplificación genética	98
VII.2. Perspectivas a futuro	99
VIII. CONCLUSIONES	100
LITERATURA CITADA	102

Resumen

Se reporta la amplificación de una secuencia definida de ADN de *Rhizobium meliloti* cepa Rm 41 después de exponer las bacterias a elevadas concentraciones del antibiótico tetraciclina. La estrategia experimental consistió en la transconjugación entre *E. coli* y *R. meliloti* con un plásmido integrativo (pSMD3-Tc), incapaz de duplicarse en *Rhizobium* y que porta los genes reguladores *syrM-nodD3-syrA* de esta especie. La selección de cepas transconjugantes que resistieron 5 µg de tetraciclina por ml, tenían integrado el plásmido en el megaplásmido simbiótico pSym-α, en el sitio de homología, mediante un mecanismo tipo Campbell. La selección de cepas con amplificaciones se consiguió creciendo a las bacterias en medios de cultivo con elevadas concentraciones de tetraciclina. Se utilizó la técnica de hibridización tipo Southern con sondas génicas específicas, además de un análisis densitométrico. Estimamos un escaso nivel de amplificación de la región que pudiera explicarse por algún mecanismo alternativo de resistencia a tetraciclina. No se conocen estas razones.

Abstracts

We report on the amplification in *Rhizobium meliloti* strain Rm 41 of a defined DNA sequence after exposure of the bacteria to increasing levels of antibiotic tetracycline. The experimental system consisted of transconjugation between *E. coli* and *R. meliloti* with an integrating plasmid (pSMD3-Tc) unable to replicate in the host and carrying the *syrM-nodD3-syrA* regulatory genes derived from *R. meliloti* Rm 41. Selection of transconjugants resistant to 5 µg of tetracycline per ml resulted in the isolation of strains with the plasmid integrated into the megaplasmid (pSym-α) at the site of homology, by a Campbell type mechanism. Amplification was achieved by growing the bacteria in increasing concentrations of tetracycline. By Southern blotting, hybridization with specific probes and densitometry, we estimated a small level of amplification on this region. The lower level of amplification of the genes may be due to another mechanism of resistance to tetracycline. The reasons for this are not clear at present.

I. INTRODUCCIÓN.

El Nitrógeno es uno de los principales elementos constituyentes de los seres vivos, lo encontramos formando parte de una gran variedad de moléculas como ácidos nucleicos, proteínas, porfirinas, hormonas, etc. Es un elemento esencial para el desarrollo de toda célula. Sin embargo, aunque constituye alrededor del 75% en peso y el 78.09% en volumen de la atmósfera (Whitten, K.W. y Gailey, K.D. 1988), su estado molecular lo hace un gas poco reactivo debido a la elevada energía de enlace de la molécula $N\equiv N$ (946kJ/mol). Desde que la vida surgió en la Tierra algunos de los primeros sistemas celulares han desarrollado mecanismos moleculares capaces de aprovechar este elemento indispensable. Es probable que esta capacidad se desarrollara a principios del Eón Precámbrico entre las primeras células procariotas en un ambiente donde el nitrógeno fijado era escaso (Schopf, J.W. 1978). Actualmente casi el total de organismos superiores (plantas, animales y hongos), son incapaces de tomarlo directamente de la atmósfera, sólo ciertos microorganismos, entre los que se cuentan una gran diversidad de bacterias son capaces de reducirlo a amonio (NH_3), el cual es utilizado como precursor de las biomoléculas nitrogenadas. Al proceso de reducción del nitrógeno a amonio se le conoce como **Fijación de Nitrógeno** y este compuesto es un precursor de las moléculas nitrogenadas.

Algunas bacterias pueden fijar nitrógeno en vida libre en el suelo o en el agua; otras necesitan establecer una simbiosis con una planta. Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre son muy numerosos y variados. Algunos miembros del grupo taxonómico Azotobacteriaceae fijan nitrógeno aeróbicamente sobre hojas y raíces; Bacillariaceae: *Clostridium* sobre heces de rumiantes y *Desulfotomaculum* en el rúmen; Enterobacteriaceae: floras intestinales, superficies foliares y nódulos; Spirillaceae: *Spirillum lipifecum*, aeróbio obligado que vive sobre raíces de ciertas gramíneas (Begon, M. et al. 1990). Sin embargo algunas especies establecen ciertas interacciones interespecíficas; se trata de asociaciones mutualistas entre pares de especies con beneficios mutuos: los individuos de una población crecen, sobreviven y se reproducen mejor cuando están como mutualistas y en el caso de la simbiosis planta-*Rhizobium* (del griego ρηζος = raíz) se manifiesta más aún la naturaleza de los mutualismos debido a que ambas especies obtienen recursos alimenticios y las bacterias encuentran protección y un ambiente idóneo para su desarrollo completo hasta bacteroides. Se sabe que la fijación de N_2 es un proceso que realizan cianobacterias fotosintéticas, bacterias fotosintéticas, bacterias microaeróbicas, anaeróbicas facultativas, anaerobias, aerobias, arqueobacterias,

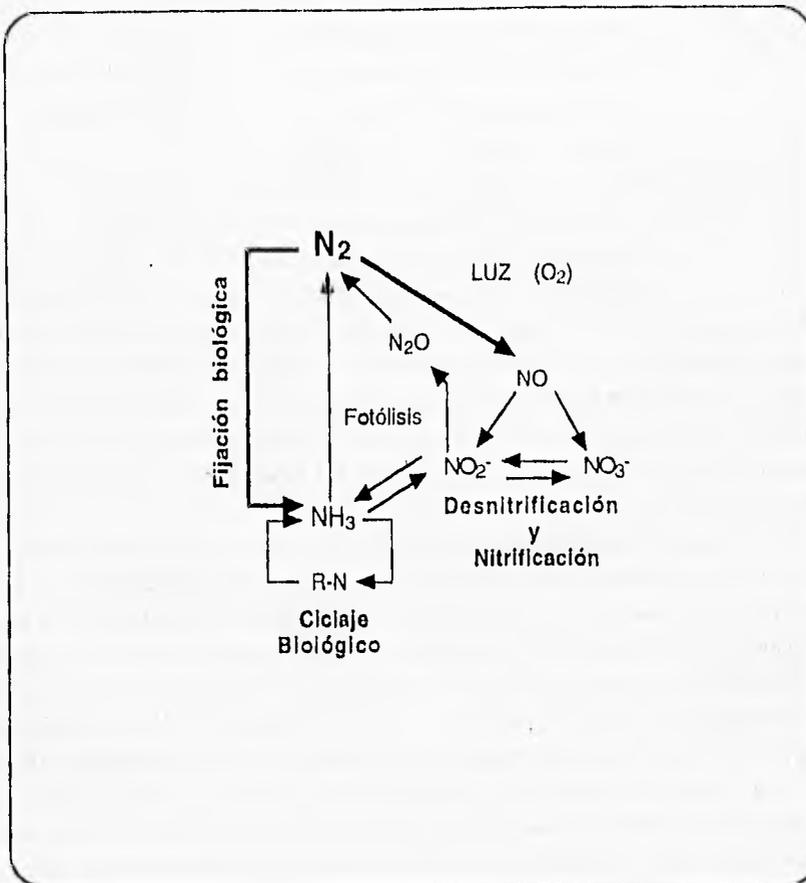


Figura 1. Representación esquemática de las porciones bióticas y abióticas del ciclo del Nitrógeno. Tomado de Mancinelli, R.L. (1992).

actinomicetes en asociación con plantas no leguminosas (*Frankia* en *Alnus*, *Myrica* y mirto), bacterias radiculares (rhizobia) en simbiosis con plantas leguminosas y bacterias microaeróbicas en una relación asociativa referida como 'fijación asociativa' (Burris, R.H. 1991).

El ciclo del nitrógeno es el resultado neto del metabolismo nitrogenado de ciertos microorganismos. El ciclo comprende cinco reacciones separadas de transformación del nitrógeno. Estas transformaciones son reacciones de óxido-reducción que incluyen cambios en el estado de valencia de este elemento (Mancinelli, R.L. 1992). Las cinco reacciones de transformación del nitrógeno son las siguientes: (1) Fijación de Nitrógeno, conversión de N_2 en formas reducidas, generalmente NH_3 ; (2) Asimilación, conversión de NH_3 en compuestos orgánicos nitrogenados y biomasa; (3) Amonificación, donde los compuestos orgánicos nitrogenados son transformados enzimáticamente en NH_3 o NH_4^+ ; (4) Nitrificación, oxidación de NH_4^+ a nitrito [NO_2^-] y nitrato [NO_3^-]; Denitrificación, reducción de NO_3^- en óxido nitroso [N_2O] o N_2 , con NO_2^- y óxido nítrico [NO] como intermediarios (figura 1).

I.1. El sistema dinitrogenasa.

La fijación biológica del nitrógeno requiere de la ruptura del triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno y su sustitución con átomos de hidrógeno, para producir amoníaco en condiciones de presión y temperatura ambiente:



La reacción entre el N_2 y el H_2 para formar NH_3 es exergónica y por lo tanto sucede espontáneamente. Sin embargo, la reacción se encuentra restringida cinéticamente por la elevada energía de activación asociada con la estabilidad de la molécula de N_2 (Hill, S. 1992). Se ha calculado que la energía necesaria para librar esta barrera es de 2.57gC/gN₂ fijado (Phillips, D.A. 1980). Un complejo multienzimático es el encargado de catalizar esta reacción. La Nitrogenasa, responsable de la fijación biológica del dinitrógeno es un sistema enzimático fascinante que consiste de dos metaloproteínas distintas fáciles de separar: Una proteína tetramérica [$\alpha_2\beta_2$], la dinitrogenasa, también conocida como proteína I ó proteína MoFe que tiene dos centros prostéticos, uno de

ferromolibdeno que es el sitio activo de la misma y un agrupamiento atómico denominado 'P-cluster' (Kim, J. y Rees, D.C. 1992). Cada molécula tiene dos átomos de Mo en el cofactor MoFe, un complejo de composición aproximada MoFe_7S_8 [homocitrato] (figura 2). La proteína MoFe es un polipéptido de masa molecular de 220 a 240 kDa, que une y reduce el N_2O sustratos parecidos (v.gr.: N_2O , CN^- , CH_3NC , $\text{H}_2\text{N-CN}$, C_2H_2 , etc.). La dinitrogenasa reductasa es una proteína dimérica [γ_2] de masa molecular aproximada de 64 kDa, referida en ocasiones como proteína II o proteína Fe con un 'P-cluster' 4Fe:4S (figura 3) que está unido covalentemente a las dos subunidades y cuyo papel principal es el de transferir electrones, uno a la vez, hacia la dinitrogenasa. La estructura de este complejo ha llevado al químico R. Holm de la Universidad de Harvard a asegurar que se trata de "la estructura protéica de la década". En 1990 Rees y sus colaboradores develaron un modelo de la proteína Fe: una estructura parecida a una mariposa con dos subunidades idénticas como alas y un 'cluster' Fe_4S_4 como cabeza; se le ha llamado la 'mariposa de hierro' (figura 4) (Simon, A. 1992). Los átomos de Fe y S se encuentran en los vértices de un cubo y forman una estructura cúbica, parecida a las ferredoxinas.

El Mg-ATP (Magnesio adenosín 5'-trifosfato) es esencial para la actividad catalítica de la nitrogenasa y por lo tanto existen sistemas que lo regeneran durante su actividad. La dinitrogenasa reductasa es reducida por la ferredoxina o flavodoxina y así es capaz de unir Mg-ATP y bajar su potencial de 100 mV a -400 mV. La nueva conformación protéica muestra el sitio de unión del Mg-ATP como una especie de punto pivote entre las dos alas de la mariposa. La reducción inicial de los primeros $2e^-$ es endotérmica por un factor de 49 kcal/mol pero la reacción total es exotérmica por aproximadamente 63 kcal/mol (Orme-Johnson, W.H. 1992). A este potencial, puede transferir los electrones hacia la dinitrogenasa. Esta transferencia está acompañada por la hidrólisis de Mg-ATP a Mg-ADP + Pi pero éste puede formar nuevamente ATP debido a que el ADP es inhibitorio de la reacción. Por cada dos moléculas de Mg-ATP hidrolizadas se transfiere un electrón. Es necesario que este ciclo se repita por lo menos hasta acumular $8e^-$ y así la dinitrogenasa pueda reducir una molécula de N_2 (figura 5). La reacción requiere de un mínimo de 16 Mg-ATP en condiciones ideales, aunque se sabe que en condiciones fisiológicas se invierten entre 20 a 30 Mg-ATP (Burris, R.H. 1991).

Como la enzima es fuertemente inhibida por el O_2 , es necesario que los organismos fijadores de nitrógeno tengan un sistema efectivo de protección a este elemento. Algunas cianobacterias cuentan con una estructura bien diferenciada: el heterocisto, un tipo celular de paredes gruesas que impiden la difusión de O_2 y otros

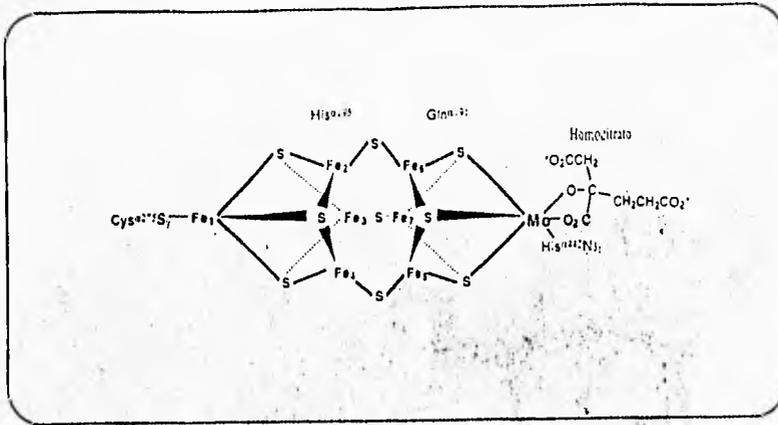


Figura 2. Representación esquemática del modelo cofactor Mo-Fe de la dinitrogenasa. Tomado de Kim y Rees, (1992).

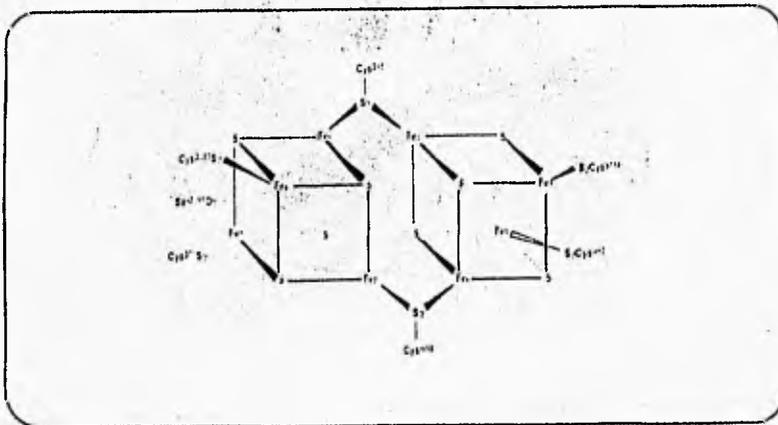


Figura 3. Representación esquemática del modelo "P-cluster" de la dinitrogenasa. Tomado de Kim y Rees, (1992).

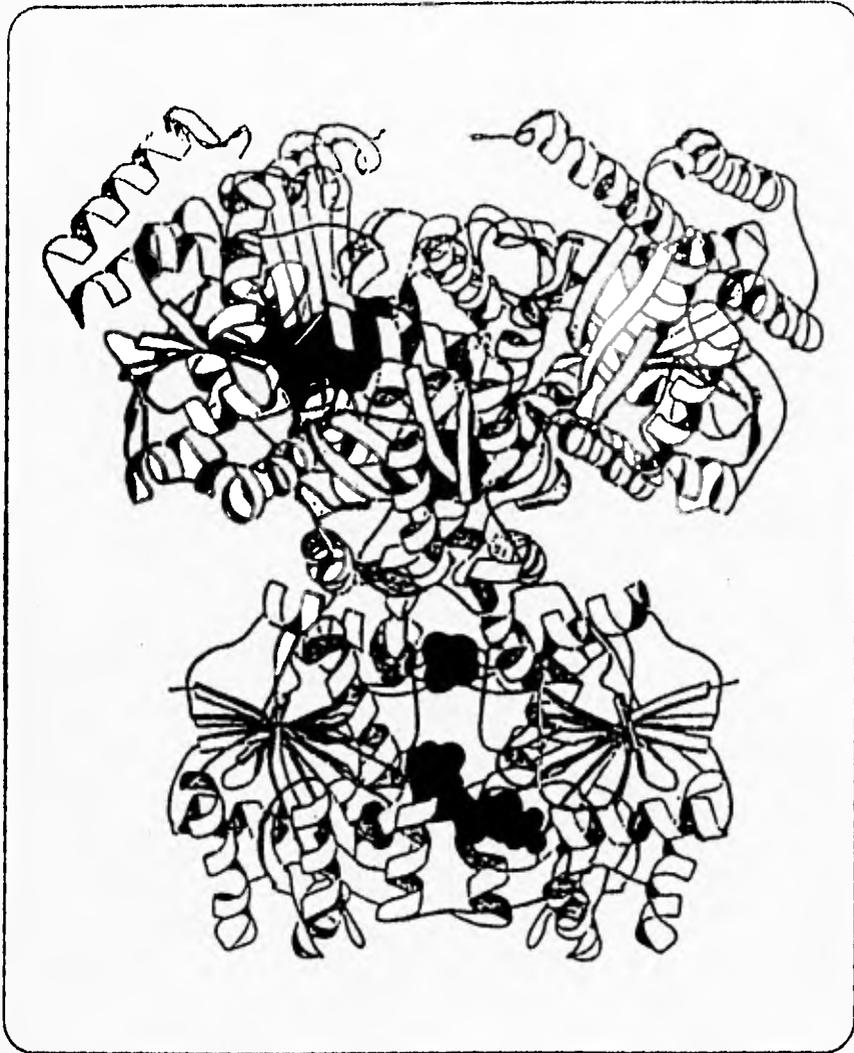


Figura 4. 'Mariposa de hierro'. Diagrama estructural de un modelo generado por computadora para representar el complejo entre la proteína-Fe (*abajo*) y la proteína-MoFe (*arriba*) de la dinitrogenasa. Los grupos prostéticos se muestran en negro.
Tomado de Howard, J.B. y Rees, D.C. (1994).

gases, donde se realiza la catálisis. En *Rhizobium* la nitrogenasa no puede funcionar *in vivo* más que en presencia de una pequeña concentración de O₂. *In vitro* sólo funciona en ausencia total de este gas. En los nódulos, la presión de O₂ es muy baja: 0.005 a 0.01 mmHg, si se eleva, la nitrogenasa es inhibida (Dommergues, Y. et.al. 1990). La leghemoglobina (Lb) tiene dos funciones principales en este contexto: une O₂ y facilita la difusión de éste hacia el bacteroide para la síntesis de ATP, además de que el complejo Lb-O₂ permite que la concentración neta de oxígeno libre sea extremadamente baja como para no poder inhibir significativamente la actividad de la nitrogenasa o reprimir su síntesis. Una oxidasa rizobial podría ser la responsable de capturar el O₂. La leghemoglobina es aparentemente un verdadero producto simbiótico que es sintetizado por ambas partes: las proteínas de globina están codificadas por genes del vegetal mientras que el grupo hemo es sintetizado por el bacteroide (Dilworth, M. y Glenn, A. 1984). El origen evolutivo de la leghemoglobina permanece en discusión.

1.2. El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa.

Las bacterias que establecen simbiosis con plantas son muy diversas. Bacterias Gram-negativas del suelo, géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (rhizobia en conjunto) establecen asociaciones especie-específicas con plantas del grupo de las leguminosas que culminan con el desarrollo de una estructura citológicamente bien diferenciada, el nódulo radicular, donde se lleva a cabo el proceso de fijación del N₂. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es quizás la asociación microbio-planta mejor conocida, debido a la importancia que tiene para la agricultura. Más del 90% de los géneros dentro de la familia Papilionidae, los cuales contemplan muchas especies de cultivo intenso, se sabe que establecen la simbiosis, mientras que el 33% de los géneros de la familia Caesalpinioideae y un 83% de los pertenecientes a la familia Mimosoideae lo hacen (Gibson, A.H. 1990). Se ha estimado que la fijación biológica de N₂ varía entre 100 y 175 millones de toneladas al año. De esta cantidad, aproximadamente un 50% deriva de las relaciones con leguminosas y un 10% con no leguminosas. El resto del N₂ deriva de procarlitas de vida libre, algunos de los cuales pueden establecer asociaciones con plantas pero no necesariamente simbióticas (Gibson, A.H. 1990).

En términos generales existen siete etapas en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Klijne, J.W. 1992): quimioatracción, activación de los genes *nod* bacterianos, producción de señales químicas rizobiales y polisacáridos de superficie, adherencia, respuestas del hospedero a la infección (división de células corticales, curvatura de pelos radiculares e iniciación del tubo de infección), crecimiento del tubo

infectivo y liberación endocítica. Cuando las células bacterianas se establecen en el primordio nodular, se diferencian a bacteroides los cuales están cubiertos por una membrana peribacterial derivada del plasmalema vegetal, incapaces de retornar al estado bacterial preinfectivo y constituyen verdaderos orgánulos celulares en las raíces vegetales. En la figura 6 se ilustra la liberación de las bacterias en una célula cortical y cómo cada bacteria se rodea por membrana vegetal para su diferenciación a bacteroides. En los nódulos de tipo indeterminado, tales como la interacción *Rhizobium*-alfalfa, se pueden distinguir varias zonas histológicas bien diferenciadas entre sí. La zona apical corresponde al meristemo nodular libre de bacterias y enseguida una zona prefijadora (infectiva) donde son abundantes los tubos infectivos. Las bacterias liberadas, diferenciadas a bacteroides, constituyen la zona fijadora de N₂ del nódulo y finalmente se observa una zona de senescencia (figura 7). Desde el punto de vista bioquímico se tienen que resolver los siguientes problemas (Dillworth, M. y Glenn, A. 1984):

- i) De difusión por la entrada de O₂, nutrientes inorgánicos y compuestos carbonados, además de la salida de nitrógeno fijado (NH₃).
- ii) De control del potencial de membrana en el flujo de materiales entre la planta y el bacteroide.
- iii) De la dependencia del bacteroide para el suministro de nutrientes a partir del metabolismo vegetal.
- iv) De la orientación inversa de la membrana peribacteroide con respecto a la membrana vegetal.

La fijación de nitrógeno en leguminosas se realiza en el interior de las células vegetales -corticales- que ocupan la parte central del nódulo (Brewin, N.J., et.al. 1992). En un esquema ilustrado en la figura 8 se ilustra cómo los compuestos derivados de la fotosíntesis (carbohidratos) llegan hasta los bacteroides y son fuente de energía, de electrones y compuestos orgánicos necesarios para la incorporación del NH₃ formado. La leghemoglobina se encuentra en la solución que rodea al bacteroide y permite así la difusión del O₂ desde el exterior en cantidad suficiente para que se lleven a cabo reacciones oxidantes y se controla la presión de este gas para que no resulte inhibitorio de la actividad enzimática (Azcón-G. C. et.al. 1983). El NH₃ es transferido hacia el citoplasma y es incorporado a la glutamina gracias a la actividad de la glutamino sintetasa y exportado así al resto de la planta por el xilema en forma de glutamina ó asparagina -en alfalfa- y como urédidos en frijól (Hernández, C. comunicación personal) que se utiliza en la síntesis de aminoácidos y compuestos relacionados. Sin embargo, otras moléculas pueden ser precursores en la biosíntesis de aminoácidos, dependiendo de la asociación.

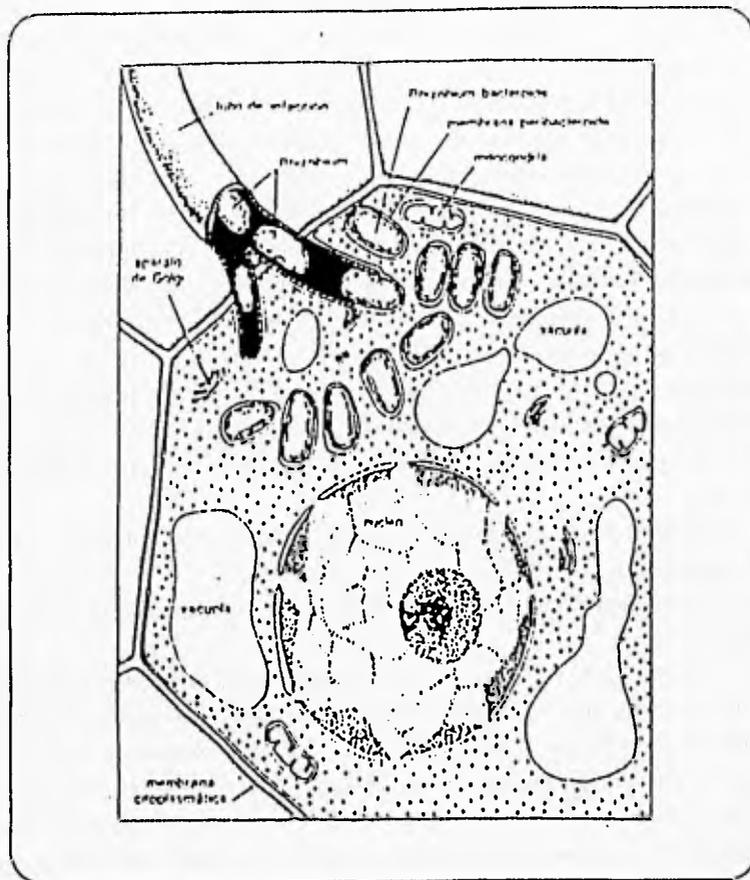


Figura 6. Penetración del tubo infectivo en una célula cortical. Los tubos infectivos liberan a las bacterias en el interior de las células vegetales y entonces se recubren de membrana celular, y se diferencian en bacteroides, así adquieren la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Tomado de Dommergues, Y. et.al. (1990).

A



B

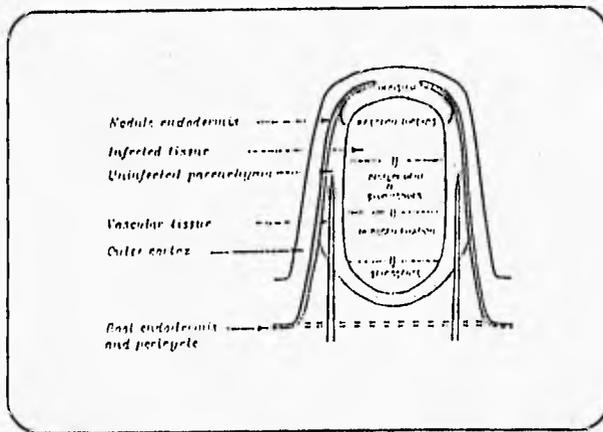
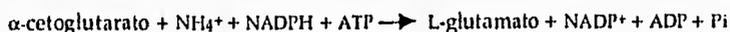


Figura 7. Estructura de un nódulo de tipo indeterminado. En (A), nódulos de *Medicago sativa* inducidos por *Rhizobium meliloti* (Cortesía Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno). En (B), diagrama de una sección longitudinal de nódulo tipo indeterminado. La parte apical del nódulo es un meristemo donde son abundantes los tubos infectivos (*infection threads*), debajo de esta región se encuentra una zona donde se liberan las bacterias y se van diferenciando a bacteroides (*development of symbiosomes*). La siguiente región incluye al tejido nodular maduro, donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (*nitrogen fixation*) y donde la presión de O_2 es muy baja. Finalmente se observa una zona de senescencia (*senescence*) en la que la fijación de nitrógeno es baja.

Tomado de Brewin, N.J. et.al. (1992).

En general, los aminoácidos glutamato y glutamina son la puerta de entrada para la asimilación del nitrógeno reducido. Finalmente, todos los aminoácidos derivan de intermediarios de la glicólisis, ciclo de Krebs y la vía de las pentosas, aunque sólo las bacterias y las plantas son capaces de sintetizarlos todos. En bacterias, el glutamato es sintetizado por acción de la glutamato sintetasa que cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs, con la glutamina como donador del grupo amino en una reacción que requiere NADPH + H⁺ (Lehninger, A.L. et.al. 1993). La reacción neta de estas dos enzimas en bacterias es la siguiente:



El establecimiento de las asociaciones *Rhizobium*-leguminosa es muy específica y se da entre bacterias y leguminosas de especies particulares. Dentro de este marco, se pueden distinguir a las bacterias de amplio espectro de hospederos, las cuales nodulan a varias especies vegetales y las bacterias de espectro reducido, cuya infección está restringida a una sola especie vegetal o a unas cuantas (Tabla I). *Rhizobium meliloti* es una especie microsimbionte de espectro corto que sólo se ha demostrado que establece simbiosis con especies del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella* (Dénarié, J. et.al. 1992). La expresión específica de genes bacterianos y vegetales ocurre durante el desarrollo del nódulo. Las proteínas vegetales que son específicamente sintetizadas durante la formación y función del nódulo radicular son llamadas nodulinas. Los genes de nodulinas se han definido operacionalmente como genes tempranos y genes tardíos de acuerdo con el momento en que son expresados durante el desarrollo del nódulo. Se sabe que las nodulinas 'tempranas' participan en el proceso infectivo y el desarrollo de la estructura del nódulo. Muchas de estas proteínas son ricas en residuos de prolina y podrían ser componentes de la pared celular. La inducción de la diferenciación de la célula vegetal y la expresión de estos genes parecen estar bajo control bacterial (Nap, J.P. y Bisseling, T. 1990). Por su parte, las nodulinas 'tardías' colaboran al buen funcionamiento del nódulo radicular al establecer las condiciones fisiológicas requeridas para la fijación del nitrógeno, la asimilación de NH₃ y su transporte. A este grupo de proteínas pertenecen las leghemoglobinas, la uricasa y las subunidades de la sacarosa-sintasa y la glutamino-sintasa (Nap, J.P. y Bisseling, T. 1990). Antes de que la raíz sea nodulada no se evidencian estas proteínas; sin embargo, cuando la planta es infectada aparecen un buen número de estas proteínas, específicas del nódulo (Rocha, M. y De las Peñas, A. 1990).

La planta hospedera libera compuestos señales de tipo flavonoide o fenólico

TABLA I

ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE *Rhizobium*

<u>Especie</u>	<u>Hospedero vegetal</u>
<i>Rhizobium meliloti</i>	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), <i>Melilotus albus</i> <i>Trigonella</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i>	Chúcharo (<i>Pisum sativum</i>), haba (<i>Vicia sativa</i>)
biovar. <i>viciae</i>	Tréboles (<i>Trifolium</i> spp.)
biovar. <i>trifolii</i>	<i>Phaseolus</i> spp.
biovar. <i>phaseoli</i>	Frijol de soya (<i>Glycine max</i>)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Sesbania</i> (nódulos radiculares y en tallos)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Amplio espectro de hospederos: <i>Vigna</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Glycine</i> , <i>Lablab</i> ...
<i>Rhizobium</i> spp. NGR234	

Tomado de Fisher y Long. *Nature* 357: 655-660.

con modificaciones en el esqueleto de carbonos o en los grupos laterales (Tabla II) y su efecto inductor en la bacteria es estimular la expresión coordinada de los genes requeridos para establecer la nodulación, los genes *nod* (figura 9). Estos genes *nod*, una vez expresados, controlan la síntesis de ciertas enzimas que participan en la producción de los factores Nod: lipoquitooligosacáridos substituidos derivados de la N-acetil-D-glucosamina (figura 10), con diferencias estructurales hospedero-específicas que provocan en la planta diferentes respuestas a nivel radicular. En *R. meliloti* se han descrito tri, tetra y pentaquitooligosacáridos con una cadena acilada en el extremo no reductor y un grupo sulfato en el extremo reductor de la molécula (Demont, N. et.al. 1994; Roche, P. et.al. 1991). Estos factores Nod determinan así el espectro de hospederos que una especie bacteriana dada pueda infectar (Fisher, R.F. y Long, S.R. 1992). La especie *R. meliloti* produce toda una variedad de factores Nod y los que se describieron primero reciben el nombre de NodRm-IV(S) -inicialmente llamado NodRm1-, un factor que causa reacciones relacionadas con la nodulación en las raíces de la alfalfa: curvatura y deformación de los pelos radiculares, división de células corticales (Lerouge, P. et.al. 1990; Nap, J.P. y Bisseling, T. 1990) e incluso depolarización del potencial transmembranal del pelo radicular de la alfalfa (Ehrhardt, D.W. et.al., 1992). El factor de nodulación NodRm-IV(S) [N-acil-tri-N-acetil- β -1,4-D-glucosamina] es un tetrámero de la N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -1,4 entre cada residuo y una sustitución N-acilada C₁₆:2D^{2,9} en el extremo no reductor, con una sustitución sulfatada en el C₆ del azúcar reductor (M_r= 1102) (Dénairé, J. et.al. 1992; Fisher, R.F. y Long, S.R. 1992; Schultze, M. et.al. 1994). La especie *R. meliloti* produce al menos seis tipos de factores Nod diferentes (van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995) entre los cuales hay una pequeña proporción (hasta del 10%) sin el grupo sulfato característico (Schultze, M. et.al. 1994). Las respuestas de las plantas por la acción de los factores Nod es evidente a nivel celular pero también existe evidencia molecular de sus efectos. A concentraciones de 10⁻¹¹ a 10⁻¹³ M, los factores Nod provocan la transcripción de los genes vegetales de nodulinas tempranas (genes *ENOD*) que codifican para proteínas que actúan en las primeras etapas de la nodulación (Truchet, G. et.al. 1993).

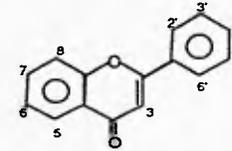
1.3. Importancia ecológica de la simbiosis.

Como ya se dijo, el nitrógeno es un elemento esencial dentro del mundo vivo por ser un componente de los aminoácidos, los ácidos nucleicos y otras moléculas nitrogenadas. De esta manera, los organismos lo necesitan para su desarrollo y metabolismo. A través de la fijación biológica, llega a la Tierra cuatro veces más

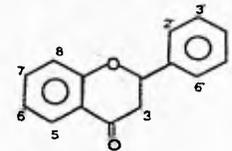
TABLA II

Estructura y actividad de los inductores vegetales, en conjunción con las proteínas NodD de *R. meliloti* y su efecto en la expresión de los genes *nod*.

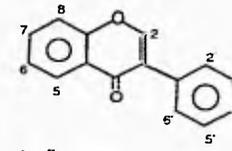
COMPUESTOS	Posición de la sustitución						Actividad de la proteína NodD <i>R. meliloti</i>			
	3	4	5	7	3'	4'	5'	NodD1	NodD2	NodD3
Flavonas										
Luteolina		OH	OH	OH	OH			++	-	+
Apigenina		OH	OH					+	-	
—			OH	OH	OH			++	-	
Crysoeriol		OH	OH	OCH ₃	OH			++	-	
—				OH	OH			-	-	
—				OH		OH		+	?	
Crysin		OH	OH					-	-	
Galangina								-	-	
Flavonoles										
Miricetina	OH	OH	OH	OH	OH	OH		-	-	
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH			-	-	
Kaempferol	OH	OH	OH		OH			-	-	
Flavanonas										
Eriodictiol		OH	OH	OH	OH			+	-	
Naringenina		OH	OH		OH			-	-	
Hesperetina		OH	OH	OH	OCH ₃			-	-	
Isoflavonas										
Genisteina		OH	OH		OH			-	-	
Daidzeina			OH		OH			-	-	
Chalconas										
4,4'-Dihidroxi-2'-metoxichalcona		OH				OH		++	++	



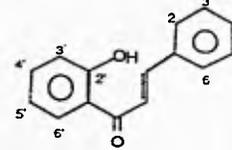
flavonas y flavonoles



flavanonas



isoflavonas



chalconas

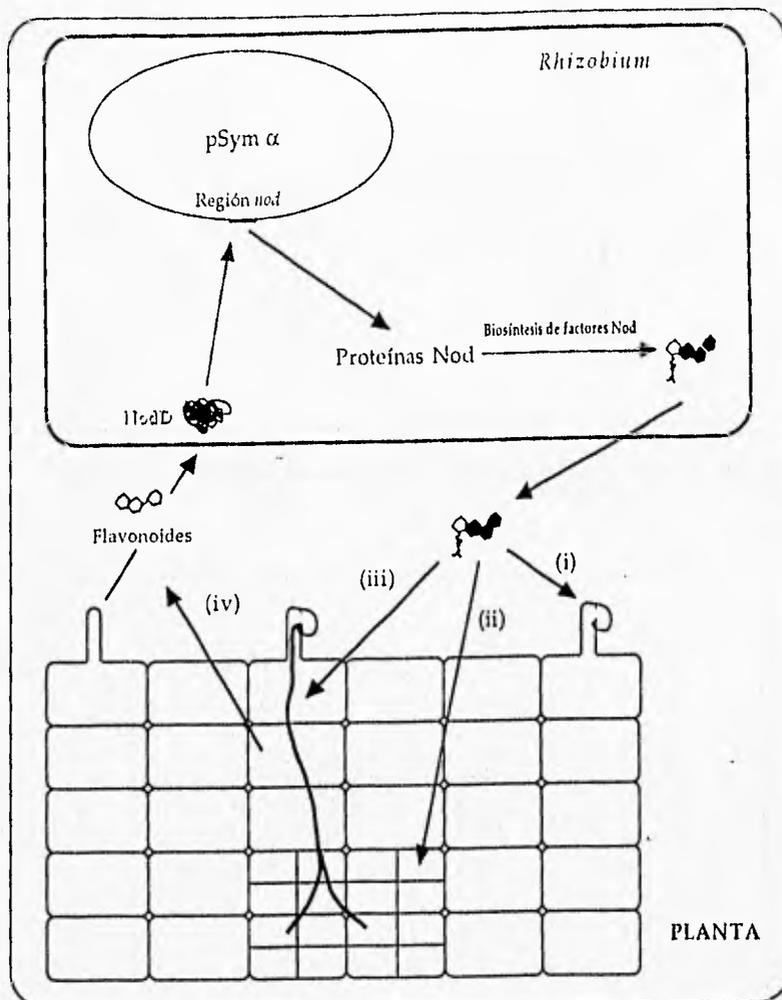


Figura 9. Representación esquemática de la interacción *Rhizobium*-planta. La planta libera compuestos flavonoides desde la raíz, los cuales funcionan como inductores vía la asociación con proteínas NodD, que regulan la transcripción de los genes *nod*. Los productos de los genes *nod* participan en la biosíntesis y secreción de los factores Nod. Estos factores son capaces de iniciar la formación del nódulo y provocan en el hospedero varios tipos de respuestas: (i) deformación de pelos radiculares; (ii) división de células corticales; (iii) pueden participar en ciertas etapas de la formación del tubo infectivo e incluso (iv) pueden incrementar la producción de compuestos flavonoides.

Modificado de van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. (1995).

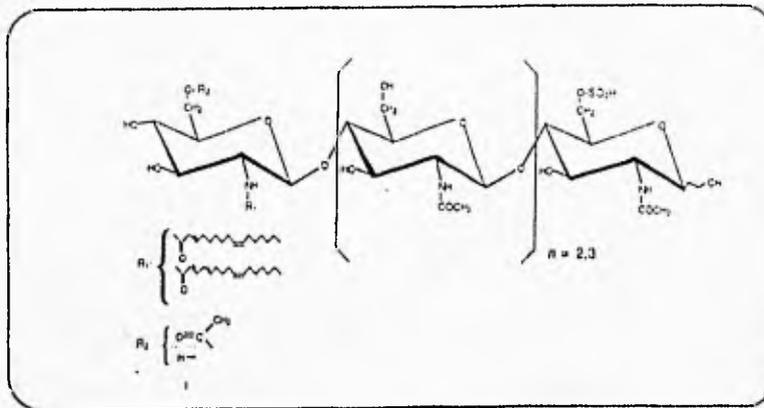


Figura 10. Estructura de los principales factores de Nodulación aislados de *Rhizobium meliloti* Tomado de Shultze, M. et.al. (1994).

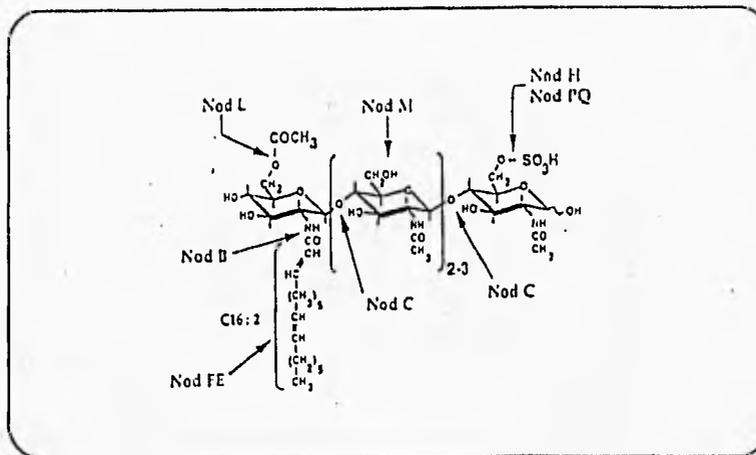


Figura 11. Papel de los genes *nod* en la biosíntesis de los factores Nod de *R. meliloti*. Las proteínas Nod muestran homología con (o actividad de) las siguientes enzimas: NodB, quitina-oligosacárido deacetilasa; NodC, quitina-sintasa; NodE, β -cetoacilsintasa; NodF, proteína acarreadora de acilos; NodH, sulfotransferasa; NodL, acetiltransferasa; NodM, glucosamina sintasa; NodPQ, ATP sulfúrilasa y APS quinasa. NodA participa en la acilación del factor Nod; NodJ podría participar en la secreción del factor Nod y NodN en la eficiencia de la producción. Tomado de Dénairé, J. y Cullimore, J. (1993).

nitrógeno en comparación con la cantidad de nitrógeno aportada por los fertilizantes químicos (Azcón-G., C. 1983). Estos compuestos, además de su elevado costo, constituyen fuentes de contaminación de los ecosistemas. Aproximadamente un 20% del nitrógeno fijado biológicamente deriva de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa gracias a la energía que aporta la fotosíntesis (Elkan, G.H. 1992). Este hecho hace de la fijación biológica del nitrógeno un proceso de abastecimiento continuo de nitrógeno reducido dentro de la biósfera.

El fenómeno de la fijación biológica del nitrógeno constituye una poderosa fuente de nitrógeno asimilable para los seres vivos. Además de su importancia como componente estructural de los organismos, algunas reacciones de transformación del nitrógeno son de gran importancia a nivel de cada individuo, debido a que ciertas reacciones están acopladas con la producción de energía celular como lo es la producción de ATP (Mancinelli, R.L. 1992).

Las leguminosas contribuyen en gran medida a la ingestión proteica de los herbívoros y después de la muerte de estas plantas, se incrementa el nivel de nitrógeno del suelo a una escala muy local. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa impulsa el ciclo del nitrógeno y otros tantos más dentro de las comunidades donde se establecen (Begon, M. et.al. 1990).

1.4. El genoma de *Rhizobium meliloti*.

El genoma de *Rhizobium meliloti* es complejo y está constituido al menos en tres duplicones de elevado peso molecular: el megaplásmido simbiótico *pSym- α* (1 340 kb), el megaplásmido simbiótico *pSym- β* (1 700 kb) y el cromosoma de 3540 kb (Honeycutt, R.J. et.al. 1993). Un megaplásmido puede llegar a medir hasta 0.48 ± 0.019 μ m, equivalentes a una masa molecular de $1\ 000 \times 10^6$ (Burkardt, B. y Burkardt, H.J., 1984). Los genes que participan en la formación del nódulo y la fijación del nitrógeno se hayan en los megaplásmidos (Martínez, E. et.al. 1990). El *pSym- α* contiene los genes de nodulación, biosíntesis de la nitrogenasa y fijación del nitrógeno: *nod*, *nol*, *nif* y *fix*, mientras que en el *pSym- β* se encuentran -entre otros- genes relacionados en la producción de exopolisacáridos y el metabolismo del carbono: genes *exo*, *dct*, *muc*, *lac*, etc. (Sanjuan, J. et.al. 1992). Los genes *nod* de *R. meliloti* determinan la infección, nodulación y especificidad al hospedero. Dentro de los genes *nod* se puede hacer la distinción de genes comunes (*nod* comunes) y los hospedero-específicos (antiguamente conocidos como *hsn*). Los genes *nodABC* pertenecen al primer grupo y se conservan funcionales en

todos los rhizobia, son genes esenciales para la deformación de pelos radiculares, la infección bacteriana, la inducción de la mitosis en el córtex de la raíz y la formación del nódulo (Schlaman, H.R.M. et.al. 1992). Se ha demostrado que estos tres genes (*nodABC*) codifican para tres proteínas diferentes de 196, 217 y 402 residuos de aminoácidos respectivamente (Török, I. et.al. 1984). *nodA*, *nodB* y *nodC* codifican para proteínas que sintetizan el esqueleto de carbono del factor de nodulación y por su presencia en todas las especies rhizobiales se les considera *nod*-comunes. Los genes *nodIJ* codifican para proteínas que tienen homología con proteínas de secreción de polisacáridos capsulares y podrían estar relacionados en la secreción de los factores de nodulación (Vázquez, M. et.al. 1993), sin embargo su presencia no ha sido revelada plenamente en *R. meliloti* como parte del mismo operón.

El segundo grupo, los genes hospedero-específicos, determinan el espectro de hospederos que una especie bacteriana dada pueda nodular. Son los determinantes principales de la especificidad en la infección y la nodulación. Para *R. meliloti* estos genes se encuentran en diferentes operones (Maillet, F. et.al. 1990). Seis genes de nodulación específicos para *R. meliloti* conforman una sola unidad de transcripción de unas 7 kilobases: *nodM*, *nodFGHI* y *nodN*. Los genes *nodM* y *nodN* son necesarios para provocar la deformación de los pelos radiculares (*hair-deformation* o Had). La proteína Nod M tiene homología con las amidotransferasas y más aún con la D-glucosaminosintetasa codificada por el gen *glnS* de *Escherichia coli*, se propone que el producto funcional de este gen es una proteína necesaria para la síntesis de las subunidades oligosacáridas de los factores Nod (Baev, N. et.al. 1991). Otro grupo de genes específicos para *R. meliloti* conforman el operón *nodFEG* de aproximadamente 3.1kb (Maillet, F. et.al. 1990). Los genes *nodFE* participan en la síntesis de la cadena acilada de 16 carbonos (C₁₆), dentro de la estructura del factor de nodulación de *R. meliloti* (NodRm) y también participan en la formación de dobles enlaces carboxil-conjugados a lo largo de la cadena C₁₆; especifican así proteínas que intervienen en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados C₁₆ (Demont, N. et.al. 1993). Las proteínas NodF y NodE tienen homología con la proteína acarreadora de grupos acilo y con la β-cetoacil sintetasa de la sintetasa de ácido graso respectivamente, ambas proteínas propuestas en la síntesis de la cadena lipídica de factores Nod (Fisher, R.F. y Long, S.R. 1992). En cuanto al gene *nodG* se ha demostrado su homología con la ribitol deshidrogenasa, una reductasa de *Klebsiella aerogenes* (Debellé, F. y Sharma, S.B. 1986) y la proteína NodG podría participar en la modificación de la cadena lateral del ácido graso del factor Nod.

Los genes *nodH* y *nodPQ* se encuentran en *R. meliloti* pero también en *R.*

tropici (Mavingui, P. comunicación personal) y se ha demostrado su participación en la 6-O-sulfatación del extremo reductor de la molécula de glucosamina del NodRm (Roche, P. et.al. 1991). La proteína codificada por el gen *nodP* (NodP) es una ATP sulfurilasa mientras que NodQ es una APS quinasa, enzimas que catalizan la conversión de ATP y SO_4^{2-} en su forma 3'-fosfoadenosina,5'-fosfosulfato (PAPS), un intermediario en la síntesis de la cisteína. En *R. meliloti*, PAPS es también precursor de los factores Nod sulfatados que causan respuestas simbióticas en hospederos específicos tales como la alfalfa (Schwedock, J.S. y Long, S.R. 1992). Las proteínas NodP y NodQ juntas forman un complejo donador de grupos sulfato activados (PAPS) para el NodRm. Otra copia de los genes *nodPQ* en el *pSym-β* tiene función equivalente a la del *pSym-α*, un nuevo locus definido como *saa* (*sulfur amino acid*) parece tener actividad para ATP sulfurilasa y APS quinasa (Schwedock, J.S. y Long, S.R. 1992). La proteína NodH es rica en residuos de prolina (8.5%) y tiene cuatro residuos consecutivos de este aminoácido, encerrados en una región rica en residuos de serina, esta estructura es particularmente rara entre proteínas de organismos procariotas (Debellé, F. y Sharma, S.B. 1986). Existe cierta homología entre NodH y algunas sulfotransferasas: Schultze et.al. (1995) reportan para NodH actividad sulfotransferasa *in vitro* y concluyen que los factores Nod son sulfatados después de la síntesis de la estructura primaria del NodRm; se propone que NodH puede transferir específicamente un grupo sulfurilo a partir de un donador de sulfatos activado al C₆ del extremo reductor del tetra o pentámero lipooligosacárido precursor del factor de nodulación (Roche, P. et.al. 1991).

De esta manera los genes *nodFEG* así como los *nodH* y *nodPQ* intervienen en la definición del espectro de hospederos de *R. meliloti*. Finalmente, otro gen denominado *nodL* también es hospedero-específico y muestra homología con ciertas acetiltransferasas. Se sugiere que NodL participa en la O-acetilación del NodRm (Baev, N. y Kondorosi, A. 1992). Recientemente, se ha reportado que *R. meliloti* puede producir factores de nodulación O-acetilados (Ac-NodRm-1) y esta modificación O-acetilada puede deberse a la acción de NodL (Baev, N. y Kondorosi, A. 1992). En *R. meliloti*, el operón asociado con la 'nod-box' n5 (ver abajo) incluye también dos genes recientemente descubiertos: *noeA* y *noeB*, cuya función podría ser el codificar para metiltransferasas, sin embargo las mutaciones en tales genes no alteran la estructura del factor de nodulación (Ardourel, et. al. 1995).

Los productos protéicos de los genes *nod* son las enzimas que sintetizan así los factores Nod (figura 11). Hasta ahora más de treinta genes de nodulación han sido identificados en diferentes rhizobia, los cuales son inducidos por las proteínas NodD

asociadas con flavonoides y compuestos relacionados que son secretados por las raíces de plantas leguminosas hospederas.

En *R. meliloti*, han sido identificados 18 genes *nod* flavonoide-inducibles que estan organizados en cinco unidades transcripcionales localizadas en el extremo 3' de las secuencias regulatorias 'nod-box' (Kondorosi, A. 1992). Las 'nod-box' comprenden secuencias de 47 pb y esta región conservada contiene subsecuencias de 7, 5 y 25 pb. En *R. meliloti* existen 6 copias de 'nod-box' que se encuentran en una zona de 135kb dentro de la región *nod/nif* del megaplásmido simbiótico *pSym-α* (Rostas, K. et.al. 1986). Todas las copias estan asociadas con unidades de transcripción inducibles y forman el regulón *nod*. Las unidades de transcripción que integran el regulón *nod* comprenden los genes *nodABCIJ*, *nodFEG*, *nodH* y *nodL* que son precedidos por *nod-box* n1, n2, n3 y n5 respectivamente, además de *nodMN/nolFGHI* que son precedidas por la *nod-box* n4 (Baev, N. et.al. 1991). Recientemente se han descubierto tres nuevos genes, *nolQ1*, *nolQ2* y *nolS* que estan precedidos por la n6 (Plazanet, C. et.al. 1995). El conjunto de estas unidades de transcripción se encuentran en una zona de aproximadamente 100 kb dentro del megaplásmido *pSym-α* (figura 12).

1.5. La proteína NodD, un regulador positivo.

Todas las especies rizobiales estudiadas hasta ahora contienen una o varias copias -familias multigénicas- de los llamados genes *nodD*. En *R. meliloti* se han reportado al menos cuatro de estos genes; estos se han designado *nodD1*, *nodD2*, *nodD3* y *syRM* (Györgypal, Z. et.al. 1988; Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989; Honma, M.A. et.al., 1990). El producto de estos genes es un activador transcripcional de los otros genes *nod*. Los análisis de homología entre estas proteínas han revelado que NodD es un miembro de la familia LysR de reguladores de la transcripción (Schlaman, H.R.M. et.al. 1992). Muchos actúan como activadores aunque hay otros que son represores. Sus propiedades son las siguientes:

- (i) Son proteínas de tamaño medio -32 a 36 kDa-.
- (ii) Presentan un motivo 'hélice-vuelta-hélice' (H-T-H) en su extremo amino terminal que se une al ADN. Esta parte es la más conservada entre las proteínas.
- (iii) La homología se pierde en el extremo carboxilo terminal.
- (iv) Estan sujetas frecuentemente a autoregulación negativa.
- (v) Su transcripción es divergente con respecto a los genes que controlan.
- (vi) Las características de unión a sitios blancos en el ADN *in vitro* generalmente no cambian por ausencia o presencia de inductores vegetales.

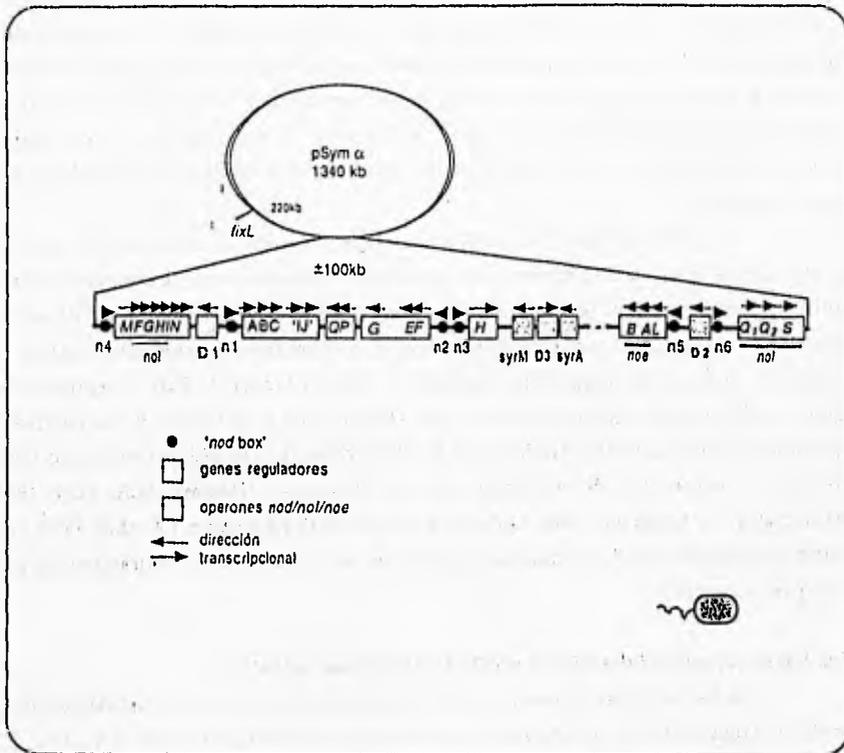


Figura 12. Organización de los genes de nodulación (*nod*) en *R. meliloti*. Modificado de Török, I. et.al. (1984); Debellé, F. y Sharma, S.B. (1986); Rostas, K. et.al. (1986); Horima, M.A., et.al. (1990); Baev, N., et.al. (1991); Kondorosi, E., et.al. (1991a); Rushing, B.G., et.al. (1991); Baev, N. y Kondorosi, A. (1992); Fisher, R.F. y Long, S.R. (1992); Schlaman, H.R.M., et.al. (1992) Cren, M., et.al. (1995) y Plazenet, C. et.al (1995).

(vii) Cambian su conformación cuando se unen a inductores vegetales.

(viii) Contienen un motivo en sus sitios de unión al ADN denominado motivo Lys-R.

Estas características tienen varios significados: por una parte, se trata de proteínas que se unen al ADN con función regulatoria, para ello se fijan por su extremo NH₃-terminal. El inductor flavonoide vegetal se une por el extremo COOH-terminal y así induce un cambio conformacional que habilita al complejo y permite que la ARN-polimerasa inicie la transcripción. Cuando las bacterias se diferencian al estado bacteroide, la expresión de los genes *nod* inducibles se detiene a la par de los genes *nodD* (Schlaman, H.R.M. et.al. 1992). Algunos modelos pretenden explicar que NodD es una proteína de membrana que se une a los flavonoides y se activa *in situ*, induciendo un cambio conformacional que le permite translocar el complejo hasta las 'nod-box', donde se une como tetrámero.

Las proteínas NodD tienen diferentes especificidades a los inductores vegetales y esta es una clave para la infección de las plantas hospederas que determinada especie rizobial puede nodular. Se ha estudiado el efecto de diferentes compuestos flavonoides tales como la luteolina, apigenina, crisoeriol y 4,4'-dihidroxi 2'-metoxichalcona en la expresión de los genes reguladores *nodD* de *R. meliloti* (Tabla II). Para la expresión del gene *nodD3* existen algunos reportes que afirman que la luteolina y los exudados vegetales pueden inducirlo (Maillet, F. et.al. 1990; Dusha, I. et.al. 1989) mientras que otros autores no encuentran inducibilidad con este compuesto (Honma, M.A. et.al. 1990; Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989; Rushing, B.G. et.al. 1991 y Swanson, J.A. et.al. 1993). Los genes regulatorios *nodD1* y *nodD2* se expresan de manera constante, contrariamente a lo que pasa con *nodD3*.

1.6. Los genes reguladores *syrM* y *nodD3* de *Rhizobium meliloti*.

Se ha propuesto un modelo para la regulación de los genes de nodulación de *R. meliloti* (figura 13): La activación de los operones *nodABC(I)*, *nodH* y *nodFEG-PQ* depende de la presencia de diferentes inductores vegetales. Estos inductores vegetales provocan un cambio conformacional a las proteínas NodD que les permite favorecer la transcripción de los operones *nod*. Los productos de los genes *nodD1*, *nodD2* y *nodD3* tienen diferente especificidad por los compuestos inductores vegetales (Tabla II). El gen *nodD1* regula positivamente *nodD3* y directamente los operones *nodABC(I)*, *nodH* y *nodFEG-PQ*; el gen *nodD2* regula positivamente *syrM*, los genes *nod* comunes y los *nod* específicos. El gen *nodD3* es regulado por *SyrM* (Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989), por *NodD1* y por su propio producto génico -NodD3- (Maillet, F. et.al. 1990), aunque también

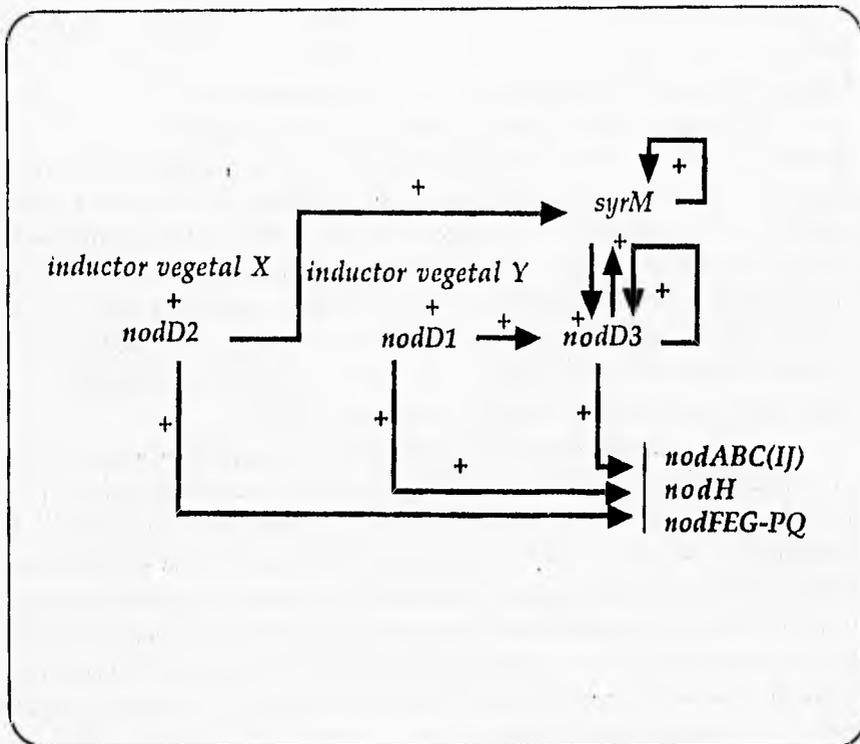


Figura 13. Modelo para la regulación de los genes de nodulación de *R. meliloti*. Modificado de Maillet, F. et.al. (1990) y Kondorosi, E. et.al. (1991a).

es inducido por luteolina y el nivel de nitrógeno combinado (Dusha, I. et.al. 1989). El producto de *syrM* puede incrementar la expresión de los genes *nod* en asociación con *nodD3*; al parecer, los genes *syrM-nodD3* pueden activar los operones *nodABC(II)*, *nodH* y *nodFEG-PQ* en ausencia de inducción vegetal (Maillet, F. et.al. 1990).

La síntesis de los factores Nod en *R. meliloti* está finamente regulada. El gen cromosomal *nolR* codifica la proteína NolR que regula negativamente el genoma simbiótico de la bacteria. NolR regula la activación de los genes *nodD1* y *nodABC* uniéndose a una región operadora adyacente a la 'nod-box' 1 (Kondorosi, E. et.al. 1989; Kondorosi, E. et.al. 1991b) y también controla la expresión de *nodD2* y *nodM*, pero no regula directamente la expresión de los genes controlados por las *nod-box* n2, n3 y n5, genes que son específicos para esta especie. Sólo aquellos genes que participan en la síntesis del esqueleto carbonado de los factores Nod (*nod-comunes*), están sujetos a regulación negativa directa por parte de la proteína NolR (Cren, M. et.al. 1995). El efecto regulatorio de los genes *nodD* y *syrM*, junto con *nolR* y el nivel de nitrógeno combinado integran un circuito regulatorio complejo. Dénarié, J. et.al. (1992) proponen que las proteínas NodD1, NodD2 y NodD3 responden a diferentes compuestos vegetales y se pueden asociar entre sí para activar los operones *nod*, vía 'nod-box' (figura 14). La proteína SyrM puede activar la expresión de *nodD3* e indirectamente puede activar los genes *exo* (pSym-β) vía *syrA* (Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989).

En ausencia de inductor, las proteínas NodD (constantemente expresadas) en su conformación transcripcionalmente inactiva se unen a las secuencias 'nod-box' pero son incapaces de favorecer la unión de la ARN polimerasa y/o la iniciación de la transcripción (Kondorosi, A. 1992). En la cepa Rm 41 el represor NolR se une al sitio operador de los promotores *nod*, *nodD* inducibles y la transcripción de *nodD* disminuye. Cuando la planta libera sus compuestos inductores, estos atraviesan la membrana externa bacteriana y se acumulan en la membrana interna. En este momento, el dominio de unión al flavonoide vegetal (extremo carboxilo terminal) de las proteínas NodD interactúan con los flavonoides y si el compuesto vegetal adecuado es reconocido por la proteína NodD sucede un cambio conformacional en esta proteína que le permite unirse a la ARN polimerasa y compite con el represor. Este evento permite la inducción de los operones *nod* inducibles (Kondorosi, A. 1992).

Se ha estudiado el efecto de mutaciones por inserción en los genes *syrM* y *nodD3*. Las inserciones con Tn5 en *syrM* tienen poco efecto en la regulación de *nodC*, a la vez de que se evidencia un fenotipo de colonias no mucoides; por otra parte, tres diferentes inserciones con Tn5 en *nodD3* incrementan la inducción de *nodC* por

luteolina pero se observan colonias mucoides (Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989). Las mutaciones en *nodD1* y *nodD3* de *R. meliloti* 1021 resultan en la inhibición del fenotipo de nodulación en alfalfa pero las mutaciones en *nodD2* sólo influyen ligeramente en la formación del nódulo (Dusha, I. et.al. 1989). El fenotipo de las colonias mucoides observado en cepas *syrM+* y *syrA+* se debe a que estos genes regulan positivamente la expresión de los genes *exo*, productores de exopolisacáridos. Al parecer, el locus *syrA* no participa en la activación de los genes *nod*. Se sugiere que *syrM* activa los genes *nod* vía *nodD3* y la producción de exopolisacáridos vía *syrA*. Para la cepa *R. meliloti* 1021 el gen *syrM* no es necesario para la nodulación pero en la cepa *R. meliloti* 41 parece contribuir a la nodulación. En ambas cepas se ha secuenciado este gen y existen diferencias significativas, particularmente en el extremo 5'. La expresión de *syrM* en la cepa 1021 es muy baja pero podría ser expresado a mayores niveles en la cepa 41 para contribuir así a la nodulación de la alfalfa. El gen *syrM* se expresa en altos niveles en nódulos y se piensa que puede participar en el desarrollo tardío del nódulo (Kondorosí, A. 1992). Asimismo, los genes *nod* están bajo control del nitrógeno (NH_4^+) (Dusha, I. et.al. 1989). En presencia de concentraciones elevadas de amonio, la expresión de los genes *nod* inducibles (incluso *nodD3*) permanece baja. Al mismo tiempo, no se ha observado inhibición considerable del gen *nodD1*, lo que sugiere que el efecto del amonio es mediado, al menos parcialmente, vía *nodD3*. Estas observaciones sugieren que *nodD3* puede ser una reiteración de *nodD1* pero que su producto génico -NodD3- tiene un papel especial en la regulación de los otros genes *nod* en respuesta al nitrógeno combinado (Dusha, I. et.al. 1989). La presencia de secuencias pseudo-'*nod*-box' y pseudo-*nodA* en la región no codificante 5' de *nodD3*, apoya la hipótesis de que *nodD3* evolucionó por la duplicación del fragmento *nodD1-nodA* durante la especiación de *R. meliloti* (Yu, G-Q. et.al. 1994).

Además de su papel regulatorio, los genes *nodD3* y *syrM* controlan la síntesis de factores de nodulación N-acilados por ácidos grasos (*w*-1)-hidroxilados (Demont, N. et.al. 1994). Los genes *nodD3* y *syrM* están sujetos a regulación compleja. La regulación de *syrM* incluye su propio producto -SyrM- y la proteínas NodD2 y NodD3. La proteína SyrM puede participar directamente en la activación flavonoide-independiente de los genes *nod* inducibles, mientras que NodD3 al parecer podría activar los operones *nod* en asociación con ciertos compuestos vegetales. Los dos genes constituyen un circuito auto-amplificable. Sin embargo, mientras que NodD1 y NodD2 son activados de manera muy específica por inductores vegetales, estos compuestos tienen en realidad poco efecto en la interacción *syrM-nodD3* (van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995). En células de vida libre, *syrM* y *nodD3* no muestran expresión (Swanson, J.A. et.al. 1993). Sin embargo, cuando

estos están clonados en plásmidos multicopia, se vuelve constante la expresión de los genes *nod* y se observan altos niveles de expresión del operón *nodABC* en ausencia de inductores, quizás por *SyrM* y/o por el complejo con *NodD3* o algún flavonoide (Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989). Ello conduce a la extensión del espectro de hospederos que *R. meliloti* puede nodular, induciendo nodulación en la planta conocida como 'siratro', *Macroptilium atropurpureum*, que fue nodulada por *R. meliloti* cepa AK631 con las características descritas anteriormente (Kondorosi, E. et.al. 1991a). En este sentido, *syrM* puede considerarse como una cuarta copia de los genes *nodD* de *R. meliloti*. Tales observaciones sugieren que uno o ambos genes se encuentran reprimidos en el estado de vida libre de la célula.

La proteína *SyrM* podría formar heterodímeros con las proteínas *NodD* y alterar su conformación y respuesta a varios inductores vegetales. La proteína *SyrM* cuenta con un motivo H-T-H entre los aminoácidos 35 a 77 y con un dominio helicoidal transmembranal de 22 residuos de aminoácidos entre las posiciones 247 y 268, esta parte podría ser la que se integra a la membrana bacteriana. Este complejo tipo de control permitiría la 'modulación' de la expresión de los genes *nod* como respuesta a diferentes condiciones metabólicas y/o ambientales, así como un tipo de adaptación a los genotipos vegetales (Kondorosi, E. et.al. 1991a). En *R. meliloti*, el gen *nodD3* es expresado en la región meristemática y la zona de infección del nódulo, mientras que *syrM* se expresa en el tejido central del nódulo (van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995).

II. ANTECEDENTES.

El reordenamiento de la información genética dentro y entre moléculas de ADN, abarca diversos procesos que se conocen colectivamente como **recombinación genética**. Durante la recombinación homóloga se producen intercambios genéticos entre dos moléculas de ADN cualesquiera (o segmentos de la misma molécula) que comparten una región extensa con secuencias homólogas, es decir similares. Las dos moléculas de ADN interactúan alineando sus secuencias homólogas en algún momento durante la reacción. Por medio de estos procesos se pueden formar intermediarios que pueden ser inestables. El intercambio de información entre dos moléculas helicoidales grandes, requiere frecuentemente un complejo entretelado de las hebras de ADN. La función de los sistemas de recombinación genética es tan variada como sus mecanismos. El

mantenimiento de la diversidad genética, la expresión de ciertos genes y los reordenamientos genéticos programados durante el desarrollo son algunos de los papeles reconocidos de los procesos de recombinación genética. En las bacterias se produce la recombinación homóloga en procesos como la conjugación, fenómeno de apareamiento en el que se transfiere el ADN entre dos células bacterianas o puede tener lugar dentro de la misma célula entre los dos cromosomas homólogos presentes durante la duplicación del ADN (Lehninger, A.L. et.al. 1994).

Existen dos tipos de recombinación homóloga: **eventos recíprocos** (entrecruzamientos) y **conversiones genéticas**. En bacterias, los eventos de conversión están frecuentemente asociados con intercambio recíproco de secuencias de ADN en cada extremo. Una región potencialmente capaz de llevar a cabo conversión genética puede ser un intermediario en un evento de intercambio recíproco, aunque este intermediario no necesariamente se resuelve vía entrecruzamiento. Los entrecruzamientos entre genes repetidos dentro del cromosoma circular bacteriano pueden originar deleciones, duplicaciones o inversiones (Petes, T.D. y Hill, C.W. 1988). Todos los eventos de entrecruzamiento entre porciones duplicadas del cromosoma bacteriano pueden derivar en cromosomas dimericos a menos que tales estructuras se resuelvan como monómeros vía un segundo entrecruzamiento. En general, todos los eventos de recombinación donde participan genes repetidos tanto en eucariotas como en procariotas son conocidos como "**fenómenos de recombinación ectópica**" (Petes, T.D. y Hill, C.W. 1988).

En *E. coli*, la recombinación homóloga puede ser dependiente del gen *recA* pero también puede ser independiente de él. El tipo de mecanismo que opera en cada caso depende al menos de dos factores: la distancia que separa las regiones homólogas y el tamaño de la homología (Bi, X. y Liu, L.F. 1994). En *E. coli*, la recombinación entre duplicaciones repetidas en orientación directa de hasta 300 pb de homología no muestran dependencia de *recA* pero al incrementarse el tamaño de las regiones homólogas se observa una dependencia cada vez mayor de *recA* (Bi, X. y Liu, L.F. 1994). Al parecer, conforme la distancia entre las secuencias repetidas se incrementa, se inhibe la recombinación independiente de *recA* y al contrario, cuanto más estrechas se encuentran las secuencias repetidas, se inhibe la recombinación dependiente de *recA* (Bi, X. y Liu, L.F. 1994).

Cuando un plásmido cuenta con secuencias homólogas se puede integrar vía recombinación homóloga por un mecanismo tipo Campbell (figura 15). Este mecanismo establece al vector entre las dos copias homólogas directamente repetidas que facilitaron la integración. Este tipo de estructura inherentemente es susceptible a ser amplificada

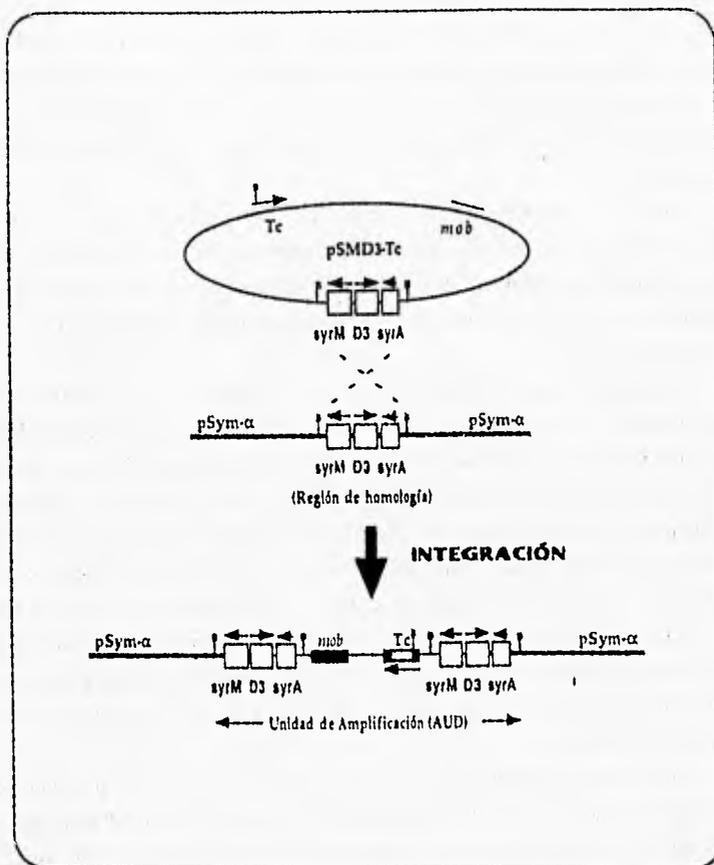


Figura 15. Integración tipo Campbell del plásmido pSMD3-Tc dentro del megaplásmido simbiótico pSym- α de *R. meliloti* 41. Los genes *syrM-mobD3-syrA* integran un fragmento BamHI-BamHI (B·B) en este megaplásmido y constituyen puntos para recombinación homóloga que derivan en la formación de una Unidad de ADN Amplificable que es susceptible a posteriores rearrreglos (amplificaciones, deleciones, etc.). No se muestra a escala.

(Anderson, R.P. y Roth, J.R. 1977). Esta unidad [secuencia-vector-secuencia] a sido llamada originalmente AUD (*Amplifiable Unit of DNA*) por Fishman y Hershberger (1983).

Se han propuesto dos posibles mecanismos de amplificación como resultado de la recombinación homóloga de secuencias repetidas: entrecruzamiento desigual entre secuencias reiteradas o escisión-reinserción de moléculas circulares. El primero de ellos supone que durante la duplicación del plásmido ocurren fenómenos recombinatorios entre secuencias homólogas de la hebra parental con respecto a la hebra de ADN naciente (figura 16 A, B). El segundo modelo supone una deleción por recombinación homóloga entre tales secuencias y la reinserción del círculo generado en un plásmido sin rearreglo (figura 16 C).

En *E. coli* y levaduras, los intercambios desiguales entre cromosomas hijos o hermanos producen duplicaciones que sirven de puntos para recombinación y formación de rearreglos genómicos (Stark, G.R. y Wahl, G.M. 1984). Cuando una secuencia de ADN es amplificada se generan nuevos sitios de restricción que permiten analizar la magnitud de la amplificación.

Algunos estudios previos indican que el genoma de *Rhizobium* contiene grandes cantidades de secuencias de ADN reiterado (Flores, M. et.al. 1987; Girard, M. et.al. 1991; Quinto, C. 1982). Los primeros reportes de operones duplicados son para las dos copias de los genes *nifHDK* de *R. etli* (Quinto, C. 1982). Inclusive, algunos genes simbióticos están repetidos en *R. meliloti*: los genes reguladores *nodD* están representados al menos en tres copias dentro del regulón-*nod* y exhiben un alto grado de homología entre sí [>80%] (Györgypal, Z. et.al, 1988; Honma, M.A. et.al., 1990). La presencia de secuencias de ADN repetido (homólogo) expone puntos potenciales para recombinación genética en el genoma y ello puede significar rearreglos genómicos frecuentes. Reordenamientos genómicos de este tipo han sido descubiertos en *R. etli* (Flores, M. et.al. 1988).

La presencia de elementos repetidos provoca rearreglos que incluyen algunos operones importantes en el establecimiento de la simbiosis y la fijación de nitrógeno. La presencia de elementos reiterados en el genoma de *Rhizobium etli* proporciona puntos de recombinación para fenómenos de amplificación de tal manera que se han descrito regiones discretas de ADN autoamplificable -amplicones- en diferentes regiones del genoma, incluso el cromosoma y varios megaplásmidos (Flores, et.al. 1993). Un amplicón se define como una región de ADN que tiene la potencialidad de ser amplificada. Los elementos clave de esta estructura son las regiones en cada extremo, repetidas y en orientación directa, las cuales participan en fenómenos recombinatorios que se pueden

manifestar como la amplificación de tales secuencias de ADN. Estas estructuras pueden experimentar fenómenos recombinatorios posteriores que incrementan el nivel de amplificación aunque también pueden inducir deleciones (Palacios, R. et.al. 1993). Tales rearrreglos alteran la presencia y el número de copias de ciertas regiones relevantes en la simbiosis y nos muestran al genoma de *Rhizobium* como unidad dinámica.

Los amplicones tienen el potencial de ser amplificados o deletados como unidad. En el pSym de *R. etli* se han descrito cuatro amplicones en la región *nod-nif* que miden de 90 a 175 kb y se encuentran sobrelapados (Romero, D. et.al. 1995). Se ha propuesto que la presencia de amplicones es una característica estructural del genoma de *Rhizobium* (Flores, M. et.al. 1993). Aparentemente, la base molecular de la amplificación natural del ADN en *Rhizobium* es la recombinación homóloga entre estas secuencias es necesaria debido a que sólo se ha detectado en presencia del gen *recA* funcional (Romero, D. et.al. 1995). Algunos genes de *R. etli* importantes en la simbiosis (operon *nifHDK*) están localizados en regiones que experimentan dichos rearrreglos.

El papel de la amplificación genética puede manifestarse como cierta ventaja adaptativa ante diversas condiciones ambientales que precisan de la sobreexpresión de genes determinados. Las amplificaciones de secuencias repetidas organizadas en orientación directa (AUD) en genomas de organismos procariotas, pueden ser una respuesta adaptativa del organismo frente a condiciones ambientales donde es necesaria la sobreexpresión de algunos genes (Flores, M. et.al. 1993). En el caso de *Rhizobium* estos fenómenos podrían resultar estratégicos en las primeras etapas del proceso infectivo, pues algunas secuencias amplificadas podrían hacer que ciertas cepas estuvieran más adaptadas para nodulación. El nivel de amplificación que la bacteria podría tolerar depende de la naturaleza de las secuencias que participen y de las condiciones del entorno. La estructura dinámica del genoma de *Rhizobium* podría incrementar su plasticidad adaptativa. La capacidad de amplificar genes es un mecanismo adaptativo que puede resultar en la sobreexpresión de ciertos genes y la producción de grandes cantidades de macromoléculas necesarias para la adaptación celular (Etcheverry, M.T. 1985).

Por ejemplo, un cósmido -pRmJT5- que porta los genes de nodulación *nodFEG*, *nodH*, *syrM*, *nodD3* y *syrA* en multicopia produjo en *R. meliloti* un fenotipo de colonias mucoides que seguramente corresponden a la actividad de los genes *syrM* y *syrA* que regulan la expresión de los genes que participan en la producción de exopolisacáridos capsulares -genes *exo-* (Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989).

La amplificación genética puede ser inducida experimentalmente. El fenómeno de amplificación *in situ* consiste en un incremento en el número de copias de ciertas

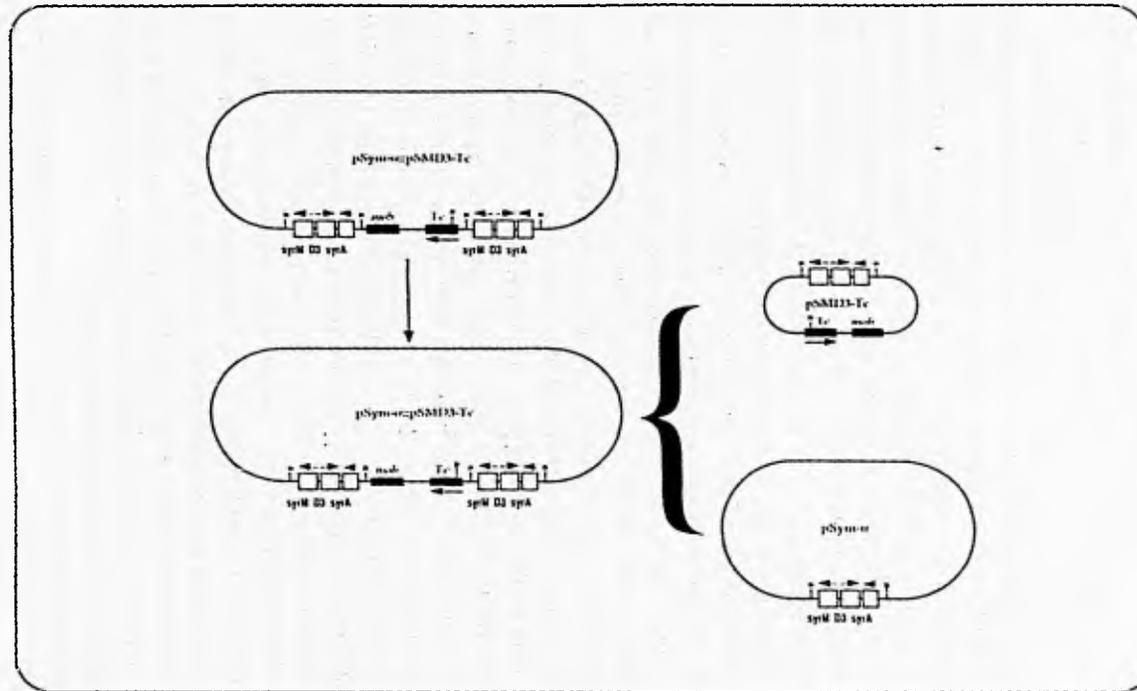
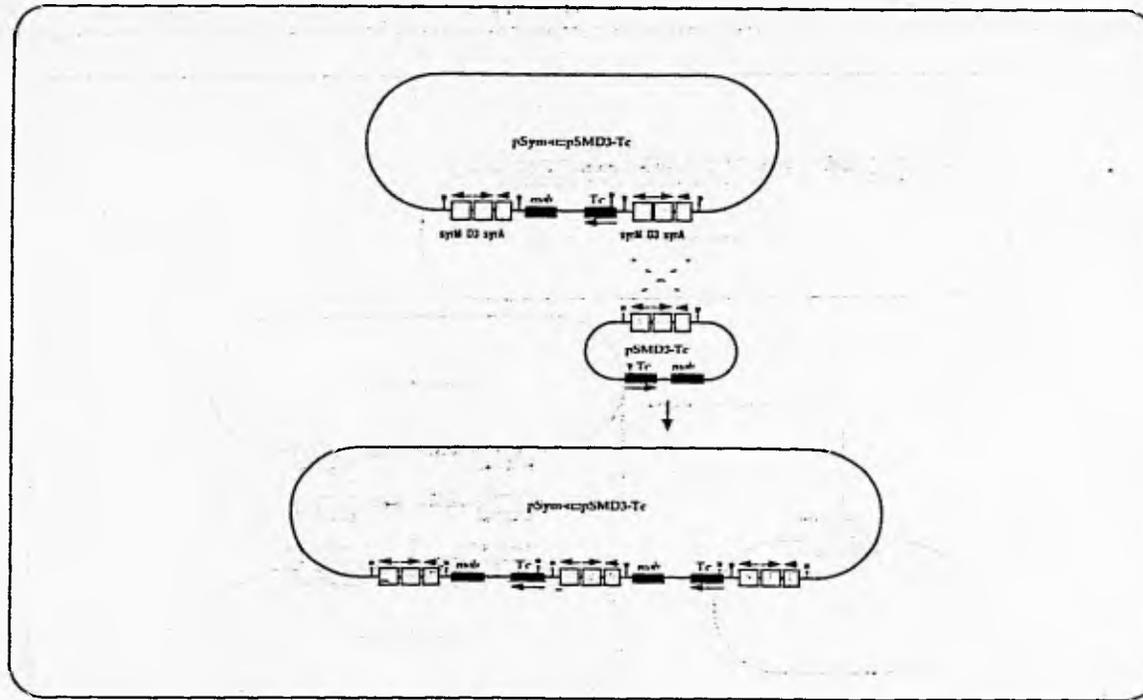


Figura 16. Modelos para la generación de plásmidos con deleciones ó ampliaciones de la región *sytM-nodD3-sytA* del megaplásmido simbiótico pSym- α de *R. meliloti* 41.

A. Se muestra un fenómeno de recombinación homóloga intramolecular entre las dos regiones *sytM-nodD3-sytA* que da como resultado la deleción del pSMD3-Tc y la regeneración del pSym- α .

B

14

Figura 16 B. El pSMD3-Tc se reintegra en un megaplásmido duplicado (*pSym-α::pSMD3-Tc*) en la región *symD3-symA* por recombinación homóloga y se genera un *pSym-α* amplificado (la región *symD3-symA* se amplifica) que puede volver al estado duplicado por delección del pSMD3-Tc o múltiplos de este.

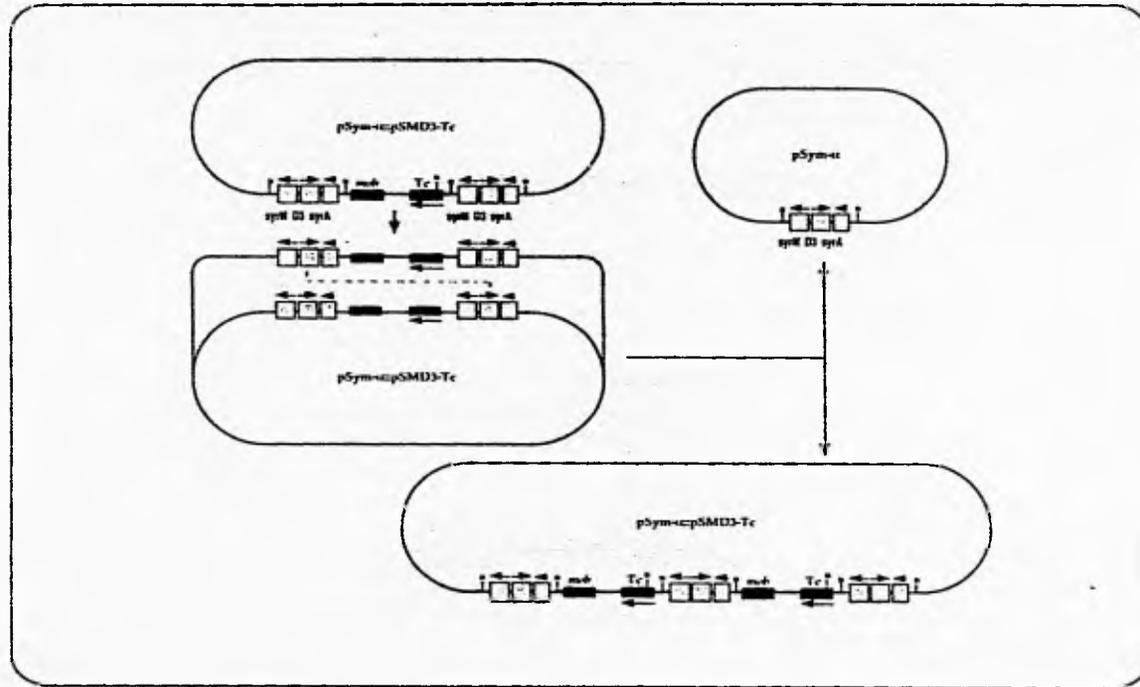


Figura 16 C. Se muestra un evento de entrecruzamiento desigual (*unequal crossover*) entre las dos secuencias homólogas *syrM-nodD3-syrA* durante la duplicación parcial del *pSym-α*, generando por una parte un *pSym-α* 'silvestre' y por otro lado un *pSym-α* amplificado.

Modificado de un modelo propuesto para ampliaciones naturales entre los dos operones *nifHDK* del *pSymCFN42* de *R. etli* (Romero, D. et al. 1991).

secuencias y particularmente de ciertos genes; estos rearrreglos ocurren por la presencia de secuencias repetidas en ambos extremos de la unidad a ser amplificada. Como herramienta genética molecular para inducir amplificaciones *in situ* se han diseñado elementos genéticos del tipo de plásmidos "integrativos".

Los plásmidos integrativos presentan un cierto número de características (Dowds, B.C.A. et.al. 1988): (1) poseen un origen de duplicación que es ajeno a la maquinaria duplicativa del hospedero al que se van a integrar; (2) tienen secuencias homólogas a las que se presentan en el hospedero de integración; (3) portan un marcador genético para selección de cointegración en el hospedero blanco que puede ser la resistencia a algún antibiótico; (4) pueden duplicarse en un hospedero alternativo, frecuentemente *E. coli* y (5) pueden tener un marcador genético selectivo para la propagación del plásmido en el hospedero alternativo. Si un plásmido cumple con estas características puede ser utilizado para transformar la célula hospedera y permite seleccionar transformantes antibiótico-resistentes que surjan por cointegración de la región homóloga dentro del genoma hospedero vía recombinación homóloga intermolecular por un mecanismo tipo Campbell.

En algunos casos se ha probado experimentalmente que el número de copias de AUD puede ser manipulada por variación de la concentración del antibiótico de selección (Young, M. 1984). En algunos casos las secuencias amplificadas juegan un papel directo en la hiperproducción de una molécula en particular. Se ha comprobado el papel de la amplificación genética en la sobreproducción del inhibidor de la α -amilasa de *Streptomyces tendae* (Young, M. y Hranueli, D. 1988). El uso de plásmidos integrativos en bacterias "hospederas" permite la selección de cepas con integración del vector en su genoma y por lo tanto, la formación de una duplicación de secuencias homólogas en orientación repetida directa (*tandem*) vía el mecanismo tipo Campbell. Varios estudios han demostrado que la existencia previa de esta clase de duplicaciones es la primera etapa para obtener cepas con amplificaciones posteriores al seleccionar cepas en medios con diferentes concentraciones de antibióticos (Anderson, R.P. y Roth, J.R. 1977, Albertini, A.M. y Galizzi, A. 1985, Peterson, B.C. y Rownd, R.H. 1985).

Las amplificaciones pueden ser deletéreas para las células, sin embargo algunas suelen resultar ventajosas. Pueden contribuir a una expresión potenciada de ciertos genes específicos. Cuando las bacterias crecen en medios con una fuente de carbono que es metabolizado pobremente, las células con duplicaciones o amplificaciones de genes catabólicos, utilizan más eficientemente este recurso (Stark, G.R. y Wahl, G.M. 1984). Debido a que las amplificaciones no causan pérdida de función génica y son un fenómeno

reversible en procariotas, probablemente juegan un papel importante en la adaptabilidad de las bacterias ante condiciones cambiantes del entorno ambiental. De la misma manera, el metabolismo bacteriano puede afectar los niveles de amplificación génica en algunas situaciones y los rearreglos de ADN pueden significar contraselección en el caso de que sean coamplificados genes que codifiquen proteínas deletéreas en gran cantidad. Las secuencias amplificadas frecuentemente causan un decremento en la tasa de crecimiento de la bacteria y la frecuencia de amplificación también es función de la estabilidad de las unidades amplificadas. El papel de la amplificación génica en la evolución seguramente es determinante en la expansión del genoma y puede ser el origen de las familias multigénicas en organismos eucariotas (Young, M. y Hranueli, D. 1988). En algunos casos las secuencias amplificadas van acompañadas de algún carácter fenotípico claramente reconocible como puede ser la resistencia a un antibiótico, la capacidad de utilizar cierto(s) sustrato(s) y/o cambio en la morfología de las colonias (Young, M. y Hranueli, D. 1988). Sin embargo estos efectos no pueden ser atribuidos exclusivamente a la amplificación *per se*.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Para algunos microorganismos (*Bacillus*, *Streptomyces*) se han desarrollado plásmidos de integración como poderosas herramientas de análisis genético en procariotas que permiten estudiar entre otros fenómenos los efectos de la amplificación *in situ* (Dowds, B.C.A. et.al. 1988; Young, M. y Hranueli, D. 1988). En *R. elli* se han diseñado vectores para amplificar los genes *nifHDK* (Romero, D. et.al. sin publicar).

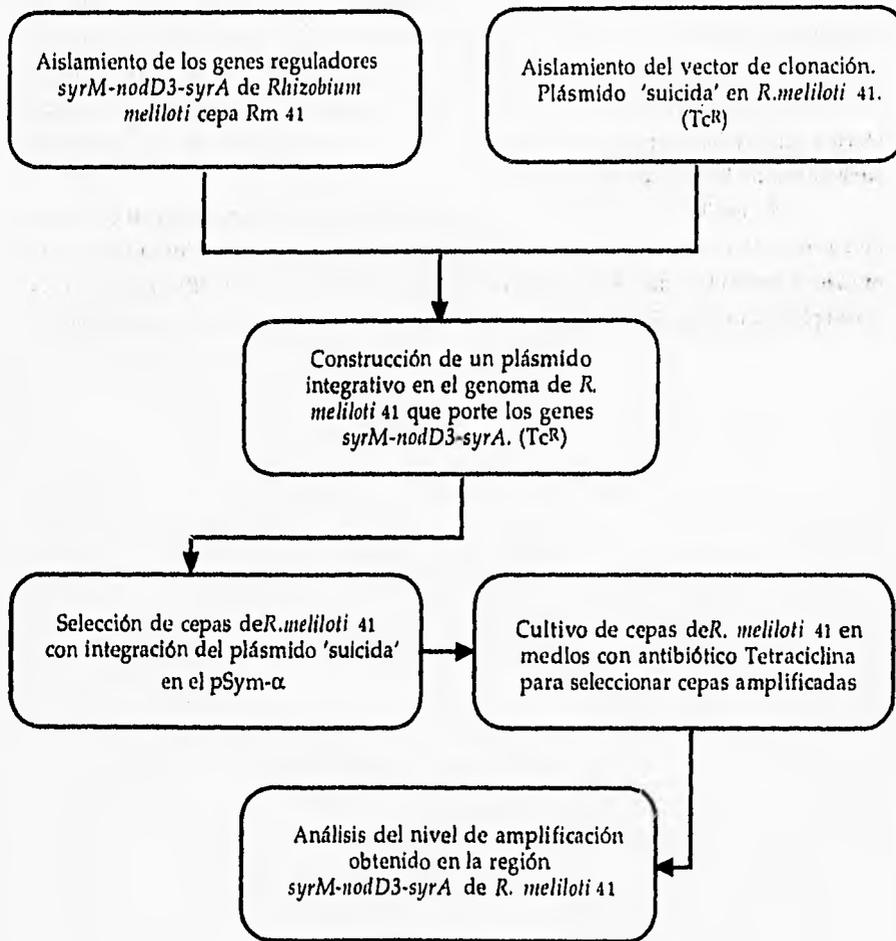
En el presente trabajo se manipuló el genoma de *R. meliloti* 41 (megaplásmido simbiótico pSym- α) mediante el diseño de una Unidad de ADN Amplificable (AUD) *in situ* con los genes regulatorios *syrM-nodD3-syrA* (figura 15). Este tipo de construcción resultó en la duplicación de los genes *syrM-nodD3-syrA* como parte estructural del megaplásmido pSym- α y que por homología constituyeron puntos de recombinación genética para seleccionar fenómenos de amplificación mediante el cultivo de estas cepas en medios de cultivo con Tetraciclina. Este antibiótico es letal para *Rhizobium meliloti* pero al cointegrar el vector integrativo con un gene de resistencia a Tc (Tc^R) las cepas son Tc^R y posteriormente cultivandolas en medios con concentraciones mayores de Tc se seleccionaron cepas con varias copias del gene Tc^R. Como consecuencia, los genes *syrM-*

nodD3-syrA se coamplificaron *in situ* y así son una parte integral del megaplásmido pSym- α a un mayor número de copias (figura 16).

La estrategia general para la amplificación de los genes de interés *syrM-nodD3-syrA* fue clonarlos en un vector de tipo integrativo en *R. meliloti* 41 para amplificarlos y seleccionar cepas en medios de cultivo con el antibiótico Tc. Se utilizó un vector de clonación con las características de ser un plásmido integrativo que cuente con los marcadores de selección Cm^R y Tc^R. Una vez clonados los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* 41 en un plásmido integrativo se integraron al genoma de *R. meliloti* 41 para seleccionar diferentes niveles de amplificación y analizar teóricamente los posibles efectos que pudiesen tener tales rearrreglos en el establecimiento de una asociación simbiótica de fijación de nitrógeno.

R. meliloti 41 es una especie de particular interés agronómico por su capacidad de asociarse simbióticamente con la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y permitir la fijación del nitrógeno molecular atmosférico. De esta manera se piensa(n) discutir el(los) efecto(s) que las amplificaciones *in situ* tendrían en el establecimiento de esta simbiosis en particular.

III.1. Esquema de Trabajo.



IV. OBJETIVOS.

Para el cumplimiento del proyecto se plantearon los siguientes objetivos:

IV.1. Manipulación molecular del genoma de *Rhizobium meliloti* 41.

IV.1.a. Diseñar un plásmido integrativo en el genoma de *R. meliloti* que cuente con los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti*.

IV.1.b. Cointegrar tal plásmido suicida en el genoma de *R. meliloti* vía recombinación homóloga y seleccionar cepas con estas cointegraciones.

IV.1.c. Seleccionar cepas con amplificaciones *in situ* de los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti*.

IV.1.d. Evaluar el nivel de amplificación de estos genes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

V.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento. *Rhizobium meliloti* se crece en medio de cultivo PY (Peptona- extracto de levadura):

Extracto de levadura	3 g.
Peptona de caseína	5 g
H ₂ O	c.b.p. 1 000 ml.

Escherichia coli se crece en medio de cultivo LB (Luria-Bertani):

Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	c.b.p. 1 000 ml.

Para medio sólido, se agregan 15 g de Agar bacteriológico por litro de medio de cultivo.

Todos los medios se esterilizan en autoclave y siempre se trabaja en condiciones de esterilidad. *Rhizobium* se crece a 30°C en medio PY enriquecido con CaCl₂ 0.7M (1µl/ml) y *E. coli* en medio LB a 37°C toda una noche (± 18 horas). Los medios líquidos se inoculan y dejan en agitación de 14 a 18 horas, mientras que los medios

sólidos (en cajas de Petri) se mantienen fijas dentro de la incubadora respectiva. Se necesitan 2 días de cultivo para *E. coli* y 3 para *R. meliloti* en medio sólido.

Cada vez que se utilizaron antibióticos para seleccionar cepas bacterianas en los medios de cultivo mencionados se pusieron en las siguientes concentraciones:

Soluciones stock de antibióticos (Filtrados en membranas millipore 0.22 µm):

Ampicilina (Ap)	50mg/ml	0.5 g en 10 ml de agua.
Acido nalixico (Nal)	10 mg/ml	0.1 g en 10 ml de Na OH 0.1M
Cloramfenicol (Cm)	50 mg/ml	0.5 g en 10 ml de etanol
Espectinomicina (Sp)	50 mg/ml	0.5 g en 10 ml de agua
Kanamicina (Km)	50 mg/ml	0.5 g en 10 ml de agua
Tetraciclina (Tc)	10 mg/ml	0.1 g en 10 ml de metanol

AMPICILINA [D]-1- α -Aminobencilpenicilina]

Ap

Sal de Sodio. γ -Irradiada.

Modo de acción: Inhibe la síntesis de pared celular (intercalación con peptidoglicanos).
Bactericida sólo en células en crecimiento.

Modo de resistencia: Ruptura del anillo β -lactámico por la β -lactamasa (gene *bla*).

Solución stock: 50 mg/ml en agua destilada.

ACIDO NALIDÍXICO [Acido 1-Etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridínico-3-carboxílico]

Nal

Sal de Sodio. γ -Irradiada.

Modo de acción: Inhibición de la síntesis de ADN (inhibidor de girasa). Bacteriostático.

Modo de resistencia: Mutaciones en la ADN girasa.

Solución stock: 20 mg/ml en agua destilada.

CLORANFENICOL [D]-1-treo-2-Dicloroacetamido 1-(p -nitrofenil)-1,3-propanediol]

Cm

γ -irradiado.

Modo de acción: Inhibición de la traducción a nivel subunidad ribosomal 50S en la actividad peptidil transferasa (inhibición del alargamiento). Bacteriostático.

Modo de resistencia: Acetilación por la cloranfenicol-acetiltransferasa (gen *cat*).

Solución stock: 50 mg/ml de metanol.

ESPECTINOMICINA

Sp

Dihidrocloruro. γ -irradiada.

Modo de acción: Inhibe síntesis de proteínas interfiriere con la translocación del peptidil-tRNA. Bacteriostático.

Modo de resistencia: Mutación en *rpsE* (gen para la proteína ribosomal 5S). Evita la unión de la espectinomicina. **Solución stock:** 100 mg/ml de agua destilada.

20°C) para después centrifugar a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Cada pastilla se resuspende en 20µl de TE 10:1 con RNAsa 200mg/ml pH 8 y así se guardan a -20°C.

SOLUCION I

Tris 1M pH 8 2.5 ml
EDTA 0.25M pH 8 4.0 ml
Dextrosa 0.9 g

Aforar con H₂O destilada estéril a 100 ml.
Filtrar y guardar a 4°C.

SOLUCION II

SDS en H₂O al10% 0.5 ml
NaOH 10N 100 ml
H₂O estéril 4.4 ml

NOTA: Esta solución debe prepararse el mismo día que se va a emplear.

SOLUCION III

Acetato de potasio 29.4 g
Acido Acético 11.5 ml

Aforar con H₂O destilada estéril a 100 ml

Nota: Disolver el acetato de potasio en 70 ml de H₂O y agregar el ácido acético. Aforar a 100 ml y filtrar.

Tris 10 mM, pH 8 / EDTA 1 mM (TE 10/1)

Tris 1M, pH 8 10 ml
EDTA 0.25 M 4 ml
H₂O estéril c.b.p. 1 lt

RNAsa 10mg/ml

RNAsa 100 mg
CH₃-COONa 3M 333 µl
EDTA 0.25 M 1.32 µl
H₂O estéril c.b.p. 10 ml

Mezclar suavemente, hervir durante 10 minutos y guardar en alícuotas a -20°C.

RNAsa A [de páncreas de bovino]

Cat. No. 109 169 - 100 mg

Liofilizada.

Definición de Unidad: Actividad enzimática que produce un decremento en la absorbencia de A₀ hasta A₁, en un período de 1 minuto bajo condiciones de ensayo.

Actividad específica: ± 50 U/mg (25°C; RNA como sustrato).

pH óptimo: 7.0 - 7.5

Estabilidad: 12 meses.

Almacenamiento: 4°C (seca).

BOEHRINGER MANNHEIM. Biochemica.

KANAMICINA [de *Streptomyces kanamyceticus*]

Km

Sal monosulfato. γ -irradiada.

Modo de acción: Unión a la subunidad 70S ribosomal; inhibe translocación; provoca corrimiento de codón. Bactericida.

Modo de resistencia: Enzimas aminoglicósido-modificantes (acetil-transferasa, fosfotransferasa, nucleotidiltransferasa) alteran el antibiótico y evitan la interacción con ribosomas.

Solución stock: 50 mg/ml de agua destilada.

TETRACICLINA

Tc

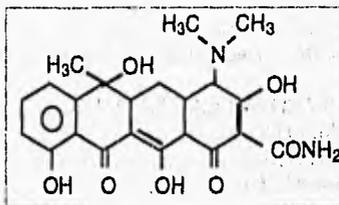
Hidrocloruro. γ -irradiada.

Modo de acción: Inhibe síntesis de proteínas (alargamiento) y evitan la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma. Bacteriostático.

Modo de resistencia: Pérdida de la permeabilidad de pared celular.

Solución stock: 10 mg/ml de agua destilada.

Estructura de la Tetraciclina:



V.2. Cepas bacterianas y plásmidos. Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio y sus características relevantes así como los plásmidos de interés se muestran en la **Tabla III**.

V.3. Purificación de plásmidos. Técnica de Maniatis, T. et.al. (1982): Se inoculan 5 ml de medio de cultivo LB-Tc10 μ g/ml con la cepa deseada y se incuban durante una noche. Las células frescas se centrifugan por 5 minutos a 14 000 rpm para agregar 100 μ l de solución I [Tris 1M pH 8-EDTA 0.25M pH 8-Dextrosa], 200 μ l de solución II [SDS en H₂O al 10%-NaOH 10N] y 150 μ l de la solución III [Acetato de potasio-Ácido Acético], se dejan reposar las muestras 15 minutos en hielo. Posteriormente se centrifuga a 13 500 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se extrae dos veces con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24-24-1) y se lava 3 veces con Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24-1). Para precipitar los ácidos nucleicos se necesita adicionar etanol absoluto

TABLA III

Cepas bacterianas y Plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas Bacterianas/ Plásmidos	Características relevantes	Referencias
<i>R. meliloti</i>		
Rm41	Tipo silvestre, <i>rec+</i> , <i>noIR</i> , Sp ^R	Kondorosi, E. et.al. (1991a)
AK631	Derivada de Rm41, <i>exoB-</i> , portadora del plásmido pNID6	Györgypal, Z. et.al. (1988)
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA1</i> , NaI ^R	Ausubel, F.M. et.al. (1994)
HB101	<i>recA</i> , Sm ^R	Ausubel, F.M. et.al. (1994)
S17.1	<i>tra</i> , Sm ^R , Sp ^R	Simon, R. et.al. (1983)
Plásmidos		
pNID6	<i>syrM</i> y <i>nodD3</i> en el pRK290; <i>ori</i> (RK2), IncP, Tc ^R .	Györgypal, Z. et.al. (1988)
pSUP205	Derivado de pBR325, <i>cos</i> , <i>mob</i> , <i>ori</i> (colE1) Cm ^R , Tc ^R	Simon, R. et.al. (1983)
pRK2013	Auxiliar para movilizar plásmidos; <i>tra</i> (RK2), <i>ori</i> (colE1), Km ^R .	Ditta, G. et.al. (1980)
pIC20R	Polylinker en <i>lacZ</i> , Ap ^R	Marsh, J.L. et.al. (1984)
pSMD3	<i>syrM</i> y <i>nodD3</i> en pSUP205, Cm ^R	Este trabajo
pIC20R-SMD3	<i>syrM</i> y <i>nodD3</i> en pIC20R	Este trabajo
pSMD3-Tc	<i>syrM</i> y <i>nodD3</i> en pSUP205, Tc ^R	Este trabajo

frío (-20°C) para después centrifugar a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Cada pastilla se resuspende en 20µl de TE 10:1 con RNAsa 200mg/ml pH 8 y así se guardan a -20°C.

SOLUCION I

Tris 1M pH 8 2.5 ml
EDTA 0.25M pH 8 4.0 ml
Dextrosa 0.9 g

Aforar con H₂O destilada estéril a 100 ml.
Filtrar y guardar a 4°C.

SOLUCION II

SDS en H₂O al10% 0.5 ml
NaOH 10N100 ml
H₂O estéril 4.4 ml

NOTA: Esta solución debe prepararse el mismo día que se va a emplear.

SOLUCION III

Acetato de potasio 29.4 g
Acido Acético11.5 ml

Aforar con H₂O destilada estéril a 100 ml

Nota: Disolver el acetato de potasio en 70 ml de H₂O y agregar el ácido acético. Aforar a 100 ml y filtrar.

Tris 10 mM, pH 8 / EDTA 1 mM (TE 10/1)

Tris 1M, pH 8 10 ml
EDTA 0.25 M 4 ml
H₂O estéril c.b.p. 1 lt

RNAsa 10mg/ml

RNAsa 100 mg
CH₃-COONa 3M 333 µl
EDTA 0.25 M 1.32 µl
H₂O estéril c.b.p. 10 ml

Mezclar suavemente, hervir durante 10 minutos y guardar en alícuotas a -20°C.

RNAsa A [de páncreas de bovino]

Cat. No. 109 169 - 100 mg

Liofilizada.

Definición de Unidad: Actividad enzimática que produce un decremento en la absorbencia de A₀ hasta A₁, en un período de 1 minuto bajo condiciones de ensayo.

Actividad específica: ± 50 U/mg (25°C; RNA como sustrato).

pH óptimo: 7.0 - 7.5

Estabilidad: 12 meses.

Almacenamiento: 4°C (seca).

BOEHRINGER MANNHEIM. Biochemica.

V.4. Transformación de cepas bacterianas de *Escherichia coli*. Para introducir plásmidos en *E. coli* se utiliza la técnica de transformación por calor. Para contar con células capaces de adquirir los plásmidos de interés se preparan células competentes como sigue: Estas cepas se inocularon en 500 ml de LB suplementado con 2.5 ml de $MgCl_2$ 1M y 2.5 ml de $MgSO_4$ 1M. Se hicieron crecer hasta alcanzar una D.O. $_{600}$ de 0.45 y dejándolas en hielo durante 60 minutos. Después de separar por centrifugación se resuspenden en 125 ml de $MgCl_2$ 0.1M frío y se dejaron en hielo por 30 minutos para resuspender en 125 ml de $CaCl_2$ 0.1M frío y reposar en hielo 30 minutos. Después se resuspenden en 21.25 ml de $CaCl_2$ 0.1M frío e incuban en hielo 30 minutos para agregar 3.75 ml de glicerol frío estéril y mezclar ligeramente. Se incuban durante una hora en hielo y se hacen alicuotas de 200 μ l en tubos Eppendorf que se guardan congelados a $-70^{\circ}C$. Posiblemente el $CaCl_2$ causa la adhesión de los ácidos nucleicos al exterior de la célula debido a alguna modificación física en la pared celular y esto facilita la entrada de moléculas al citosol (Brown, T.A. 1992).

Las células competentes se descongelan 5 minutos en hielo y se agrega el plásmido purificado, diluido en agua 1:10, directamente a las células competentes de *E. coli* para incubar 20 minutos en hielo y aplicar un pulso de calor durante 2 minutos a $42^{\circ}C$ -transformación por choque térmico-. Después de pasar por hielo cada muestra se agregan 800 μ l de medio líquido LB a $37^{\circ}C$ y se incuban una hora a $37^{\circ}C$ en agitación. La selección de las colonias transformantes se hace sobre placas de medio selectivo LB con Tc 10 μ g/ml e incubación a $37^{\circ}C$ y aislado de las colonias separadas para después hacer lisis alcalina y determinar la presencia del plásmido.

V.5. Restricción de ADN plasmídico. Para digerir el ADN con enzimas de restricción, se siguieron las indicaciones del proveedor (Amersham LTD.). De cada muestra purificada de ADN se toma un volumen de 5 μ l y se agregan 1 a 2 μ l de enzima concentrada (50U/ μ l) y amortiguador para enzima a una concentración final 1X; se diluye en agua destilada ultrapura (HPLC) y se lleva la mezcla de restricción hasta un volumen final de 20 μ l. Con esta mezcla de restricción se someten las muestras a pulsos de calor en un horno de microondas durante 10 segundos, se deja reposar entre cada pulso 3 minutos hasta completar 5 ciclos o en su defecto se dejan una hora a $37^{\circ}C$.

Enzimas de restricción utilizadas en este trabajo:

Endonucleasas de Restricción

Definición de Unidad: La actividad enzimática que corta completamente 1 µg de λADN en 1 hr a 37°C bajo condiciones de ensayo.

Bam H1 [de *Bacillus amyloliquefaciens* (H)]

10 000 unidades (10 U/µl)

Amortiguador de almacenamiento: Tris-HCl 10mM, KCl 300 mM, EDTA 1 mM, DTT (Ditioneitol) 1 mM, Tritón X-100 0.01% (v/v), glicerol 50% (v/v); pH 7.4 a 4°C.

Condiciones de incubación: Buffer B a 37°C.

Almacenamiento: -20°C.

Secuencia de reconocimiento: G GATCC
CCTAG G

Eco R1 [de *Escherichia coli* B 55]

1 000 unidades (10 U/µl)

Amortiguador de almacenamiento: Tris-HCl 20mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, BSA 100 µg/ml, glicerol 50% (v/v); pH 7.5 a 4°C.

Condiciones de incubación: Buffer B a 37°C.

Almacenamiento: -20°C.

Secuencia de reconocimiento: C GGCCG
GCCGG C

Hind III [de *Haemophilus influenzae* Rd com-10]

10 000 unidades (10 U/µl)

Amortiguador de almacenamiento: Tris-HCl 10mM, NaCl 250 mM, EDTA 0.1 mM, DTE (Ditioneitol) 1 mM, glicerol 50% (v/v); pH 7.4 a 4°C.

Condiciones de incubación: Buffer B a 37°C.

Almacenamiento: -20°C.

Secuencia de reconocimiento: A AGCTT
TTCGA A

V.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa. Se preparan geles de agarosa al 0.8% disueltos en amortiguador de acetatos o de boratos 1X. Una vez fundida la mezcla se deja enfriar con agua fría y se vierte en cámaras horizontales para electroforesis (GIBCO-Life Technologies). Según las dimensiones de los pozos se decantan muestras de ADN digerido y los marcadores de peso molecular λ HindIII y 1 kb ADN-Ladder para someter el sistema a un campo eléctrico de 60 a 80 volts. Para visualizar las bandas de ADN se tiñen los geles entre 5 a 10 minutos con Bromuro de Etidio, un agente intercalante que se fija entre las dos hebras de ADN y fluoresce con luz UV (Williams, J.G. y Patient, R.K. 1990). Se utilizó una cámara de luz UV 'Eagle-Eye' (STRATAGENE).

Soluciones amortiguadoras para geles:

Tris Acetatos 10X

Trizma base 484 g
Acido acético glacial 114.2 g
EDTA 0.5 M pH 8 200 ml
H₂O c.b.p. 10 lt

Tris Boratos 5X

Trizma base 54 g
EDTA 0.5 M pH 8 20 ml
Acido bórico 27.5 g
H₂O c.b.p. 1 000 ml

V.7. Defosforilación de fragmentos de ADN. Una vez digerido el ADN plasmídico se necesita defosforilar sus extremos 5'-P para evitar que se vuelvan a pegar al momento de ligar (clonar) otro fragmento de ADN y así aumentan las probabilidades de que el fragmento de interés se ligue en el vector de clonación defosforilado. Para defosforilar una molécula linear de ADN se diluye la enzima fosfatasa CIAP (Alkaline Phosphatase) en proporción 99 μ l de H₂O por 1 μ l de enzima y se mezclan 10 μ l del Buffer 10X y 1 μ l de CIAP (ya diluida) con 5 μ l de ADN previamente digerido. Esta mezcla se somete a 37°C por 30 minutos repitiendo dos veces. Esta enzima remueve los grupos 5'-P para generar extremos hidroxilados (Williams, J.G. y Patient, R.K. 1990). Se purificó el ADN defosforilado según la técnica de lisis alcalina pero al momento de la precipitación de ácidos nucleicos se dejaron los tubos a -20°C durante una noche.

FOSFATASA ALCALINA [de intestino de bovino]

1 000 unidades (20 U/ μ l)

Definición de Unidad: La actividad enzimática a la cual hidroliza 1 μ mol de 4-nitrofenil fosfato en 1 minuto a 37°C.

Amortiguador de almacenamiento: Trietanolamina 30mM, NaCl 3 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0.1 mM; pH 7.6 a 4°C.

Amortiguador de defosforilación (10X): Tris-HCl 500mM, EDTA 1 mM; pH 8.5 a 20°C.

Actividad específica: \pm 2 000 U/mg

Estabilidad: 18 meses.

Almacenamiento: 4°C.

V.8. Ligación de moléculas de ADN con extremos adherentes. Técnica de Maniatis, T. et.al. (1982): Para la ligación se transfirieron \pm 3 μ l de ADN plasmídico previamente defosforilado y se agregó dos veces la cantidad de ADN inserto (genes bajo

estudio). Se calentó la mezcla a 70°C por 10 minutos para inactivar la enzima de restricción utilizada en la digestión y después se agregaron 2 µl de amortiguador de ligasa y 0.5 µl de T4 ADN ligasa y se diluye con H₂O hasta 20 µl para incubar la reacción durante 12 horas a 16°C. Como control se incluyó la ligación del vector desfosfatado sin inserto.

T4 DNA LIGASA [de *E. coli* NM 989]

500 unidades (1U/µl)

Definición de Unidad: Una unidad enzimática liga 1 µg de fragmentos λDNA-EcoRI en 1 hr a 22°C en un volumen de reacción de 20 µl.

Buffer de ligación (10X): Tris-HCl 660mM, MgCl₂ 50mM, DTE 10mM, ATP 10mM; pH 7.5.

Actividad específica: ca. 3x10³ unidades/mg.

Estabilidad: 18 meses.

Almacenamiento: -20°C.

V.9. Conservación de cepas bacterianas. Para ello se preparan suspensiones en glicerol: Poner cultivo de células deseadas en medio líquido con antibiótico de selección toda la noche. Tomar 5 ml de este cultivo y mezclarlos con 4 ml de glicerol 100% estéril. Mezclar muy bien. Transferir 1.5 ml al frasco previamente rotulado. Guardar a -20°C. Las células duran así más de 2 años y son de lenta recuperación.

V.10. Transconjugación o cruce triparental. Cointegración del vector por recombinación homóloga. Para incorporar un plásmido integrativo con los genes deseados, clonados en un vector de tipo integrativo en el genoma de *Rhizobium meliloti* 41 vía recombinación homóloga de secuencias repetidas, se realiza la cruce triparental entre *E. coli* DH5α y *R. meliloti* 41 con ayuda de *E. coli* HB101/pRK2013 (*Helper*) que cuenta con genes *tra*, necesarios para la transferencia del pSMD3-Tc (Tabla III). Se parte de medios PY-CaCl₂ líquidos inoculados con las tres cepas y se deja una noche a 30°C en agitación para que al día siguiente se centrifuguen a 14 000 rpm por 5 minutos y se resuspendan en H₂O dos veces. Se toman 40 µl, 80 µl y 40 µl de cada cultivo respectivamente y se mezclan estos volúmenes dejando la mezcla en medio PY-CaCl₂ y se secan en campana para después incubar una noche a 30°C. La mezcla resultante ya crecida se toma cuidadosamente con asa y se resuspende en 1 ml de MgSO₄/Tween 0.01%. Se realizan diluciones de la mezcla en MgSO₄/Tween 0.01% para plaquear en medio selectivo. La selección de las colonias candidatas a contar con la cointegración del

plásmido se obtienen en medios PY enriquecidos con CaCl₂ y la combinación de los antibióticos de selección Espectinomicina (Sp¹⁰⁰) y Tetraciclina (Tc⁵).

V.11. Purificación de ADN genómico de *R. meliloti*. Para la purificación de ADN total de las cepas de interés se inoculan en un volumen de 5 ml de medio PY-Ca²⁺ con los antibióticos de selección y se incuban 16 horas a 30°C. Se centrifugan 3 ml de cultivo en un tubo Eppendorf durante 2 minutos a 13 000 rpm, se resuspende perfectamente la pastilla celular en 1 ml de buffer TE 50/20 pH 8, mediante micropipeta ó Vortex. Se vuelven a centrifugar las células durante 2 minutos a 13 000 rpm y se resuspende igual la pastilla en 400 µl de TE 50/20 pH 8. A cada muestra se le adicionan 50 µl de pronasa-E 5 mg/ml en TE 50/20 pH 8 y 50 µl de SDS 10% en TE 50/20 pH 8 y se mezcla perfectamente por inversión suave. Se incuba durante 60 minutos a 37°C cada muestra para después pasar la misma por jeringa 3 veces con aguja insulfínica. Para extraer los ácidos nucleicos se prosigue la misma técnica de lisis alcalina, con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico y Cloroformo-Alcohol Isoamílico pero finalmente se adicionan 15 µl de NaCl 5M y 800 µl de etanol absoluto frío (-20°C). Cada muestra se deja reposar durante 30 a 45 minutos a -70°C y se lavan con etanol al 70 % frío, se resuspende la pastilla en 40 µl de TE 10/1 con RNAsa 10 mg/ml. Cada muestra se guarda en congelador a -20°C.

Tris 50 mM, pH 8 / EDTA 20 mM (TE 50/20):
Tris 1M, pH 8 50 ml
EDTA 0.25 M 80 ml
H₂O estéril c.b.p. 1 lt

SDS al 10%:
SDS 10 g
Buffer TE 50/20 c.b.p. 100 ml
NOTA: Mezclar suavemente y guardar a temperatura ambiente.

Pronasa 5 mg/ml:
Proteasa 5 mg
Buffer TE 50/20 1 ml
NOTA: Mezclar suavemente e incubar 90 minutos a 37°C. Guardar a -20°C.

Proteasas

PRONASA [de *Streptomyces griseus*]

Cat. No. 165921 - 1 g

Liofilizada

Definición de Unidad: Actividad enzimática que libera aminoácidos Folín-positivos y péptidos que corresponden a 1 μ mol de tirosina bajo condiciones de ensayo en 1 minuto.

Actividad específica: \pm 7 000 U/g liofilizado (40°C; caseína como sustrato; pH 7.5)

Estabilidad: Estable a 4°C cuando se almacena seca.

BOEHRINGER MANNHEIM. Biochemica.

V.12. Geles tipo Southern: Transferencia de ADN digerido a membranas de nylon. Hibridización con sondas génicas específicas. Los geles con ADN genómico digerido de las cepas de interés se transfieren a membranas de nylon (Amersham) según la técnica de Southern, E.M. (1975): Se deja el gel deseado en solución I de transferencia (HCl 0.25 N) 15 minutos en agitación dentro del cuarto frío, se repite una vez más. Se vierte esta solución y se agrega solución II de transferencia (NaOH 0.5 N/NaCl 1.5 N), de la misma manera que la solución I. Finalmente se trata el gel con solución III de transferencia (Trizma 0.5 M/NaCl 1.5 N), dos veces durante 30 minutos. Esto permite la desnaturalización de la doble hélice y hace posible realizar hibridizaciones con sondas radiactivas. Finalmente se arma una torre de transferencia tipo Southern y se deja en el cuarto frío cuando menos 18 horas para secar las membranas durante 2 horas a 80°C.

Soluciones para transferir geles:

I. HCl 0.25 M	20.68 ml
II. NaOH 0.5 M	19.99 g
NaCl 1.5 M	87.6 g
III. Trizma 0.5 M	60.57 g
NaCl 1.5 M	87.6 g
[solución III a pH 7.4]	

NOTA: A cada solución agregar agua destilada c.b.p. 1 000 ml.

Para comprobar la existencia de un cierto fragmento de ADN dentro del genoma de *Rhizobium* se hibridizan muestras de ADN digerido con sondas marcadas radiactivamente utilizando [α - 32 P]dCTP mediante el protocolo RPL (Random Primer Labelling) siguiendo las indicaciones de Amersham Ltd. Para marcar radiactivamente las

sondas se parte de los plásmidos linearizados y se someten 5 µl de cada una [pSUP205(BamHI), pSMD3-Tc (BamHI y EcoRI), *nodD3* y *syrM* (PCR)] a 95°C por 10 minutos e inmediatamente se llevan al hielo por 2 minutos. Cada muestra se lleva a 45 µl con agua para agregar 5 µl de marca (±50 mCi). Se somete la sonda a 95°C por 10 minutos e inmediatamente al hielo un minuto aproximadamente. Se transfiere cada muestra al tubo *redI*-prime sin tocar la mezcla enzimática (KLENOW) y se agregan 5 µl de marca (dNTP³²) a cada tubo, mezclando perfectamente con punta. Esta mezcla se somete a 37°C por 10 minutos, se deja inmediatamente en hielo y se centrifuga nuevamente para bajar la mezcla.

DNA POLIMERASA I, Enzima KLENOW [de *E. coli* lisogénica para NM 964]

Definición de Unidad: Actividad enzimática a la que se incorporan 10 nmol de nucleótidos en una fracción ácido-precipitable en 30 minutos bajo condiciones de ensayo a 37°C con poli [dA-T] como iniciador.

Buffer de almacenamiento: Fosfato de potasio 50 mM, ditiotreitól 1 mM, glicerol 50% (v/v); pH 7.0 a 4°C.

Estabilidad: 18 meses.

Almacenamiento: -20°C.

Cada membrana se introduce en tubos de vidrio para hibridación Hybaid y se agregan 20 ml de solución QuickHyb (STRATAGENE) a 68°C más 400 µl de ADN de esperma de salmón [100 µg/ml] previamente desnaturalizado y pasado por jeringa. Las membranas se prehibridizan 20 minutos a 68°C en hornos Hybaid. Se toman 400 µl de QuickHyb a 60°C y se mezclan con la marca desnaturalizada (95°C/10 minutos), se adiciona la mezcla de sonda marcada-QuickHyb en cada tubo. Se hibridiza una hora a 68°C en horno Hybaid. Las membranas se lavan dos veces con 2X SSC-0.1% SDS durante quince minutos a temperatura ambiente y una vez con 0.1X SSC-0.1% SDS durante 30 minutos a 60°C y 0.1X SSC durante 10 minutos para quitar el exceso de SDS. Cada membrana se expone a -70°C toda una noche para autoradiografía en contacto con películas Kodak XK-1. El revelado de las placas se realiza en cuarto oscuro, se pasa cada una por solución de revelado 30 segundos y después en fijador fotográfico (ambas de Kodak) por un minuto, se enjuga y deja secar al aire.

SSC 20X [solución stock]

NaCl	175.2 g
Citrato de Sodio	84.2 g
H ₂ O c.b.p.	1 000 ml

Es posible realizar hibridaciones no radiactivas tipo ECL (Amersham). Para marcar las sondas se hace una mezcla en un volumen total de 50 μ l de los cuales 5 μ l corresponden al ADN prueba cortado, 10 μ l de nucleótidos, 5 μ l de iniciadores (*primers*) y 1 μ l de enzima Klenow, se ajusta con agua el volumen final. Cada prueba se desnaturaliza previamente de la misma forma en un volumen de 20 μ l en TE 10/1. El tiempo de marcaje es de 4 horas mínimo a 37°C. Para la prehibridación se introducen las membranas en tubos de vidrio Hybaid y se agrega una solución de prehibridación [SSC 5X + 5% bloqueador + SDS 0.1% + Sulfato de Dextrán + ADN de esperma de salmón 100 μ g/ml desnaturalizado a 95°C]. De esta forma se prehibridiza en rotación durante 4 horas a 60°C. Cuando transcurre el tiempo de prehibridación se desecha la solución y se pone en su lugar la marca desnaturalizada disuelta en la misma mezcla pero sin ADN de salmón. Se dejan hibridizar en rotación a 60°C toda una noche.

Una de las ventajas de esta técnica es que se puede reutilizar la sonda, para lo cual se recupera en un tubo de vidrio limpio y se guarda a -20°C. Para los lavados se hacen con una solución de SSC 1X + SDS 0.1% y con otra en SSC 0.1% + SDS 0.1% en rotación a una temperatura de 60°C. Finalmente se lava durante un minuto cada membrana en Buffer I [Trizma 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5] a temperatura ambiente en rotación. Después de los lavados se agrega Bloqueador y Conjugado antiFI-HRP para favorecer una reacción luminosa que permita visualizar bandas hibridizantes.

De esta manera se desecha el Buffer I y se agrega Buffer II [Buffer I + 5% bloqueador] se dejan 45 minutos en rotación a temperatura ambiente para agregar nuevamente Buffer I (1 minuto en rotación) y después añadir el conjugado a la dilución 10^{-3} en el Buffer III [Buffer I + BSA 0.5%] recientemente preparado, se incuba así 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se hacen tres lavados de 10 minutos en el Buffer IV [Buffer I + Tween 20] a temperatura ambiente en rotación.

El revelado y la exposición se realiza secando cada membrana y después se cubren de la mezcla de soluciones de detección I y II. En este momento se cubren las membranas con una membrana plástica tipo 'Kleen-Pack' y se exponen en una película hiperfilm tipo ECL.

V.13. Electroforesis de megaplásmidos de *R. meliloti*. Geles tipo Eckhardt. Este tipo de geles son conocidos también como geles de lisis *in situ* debido a que las bacterias son lisadas con una muramidasa (lisozima) dentro del mismo gel de agarosa y sometido a un campo eléctrico (Eckhardt, T. 1978). Esto permite visualizar

plásmidos superiores a 20 kb que se encuentren en una bacteria, mientras que el cromosoma se observa como varios fragmentos. Cada plásmido se observa como una banda de peso molecular elevado pero también pueden observarse plásmidos de menor tamaño. Para esta técnica se prepara un gel horizontal a 0.75% de agarosa en TB 1X (0.75g de agarosa en 100ml de TEB 1X). Se lee la D.O. a 620 nm de los cultivos, para una D.O. de 0.2; se toma 1 ml del cultivo y se centrifuga 3 minutos a 13 000 rpm. Se extrae el sobrenadante con jeringa, se trabaja en hielo. Se agrega a cada pozo del gel 25 ml de SDS 10%-Xylen cyanol y se precorre a 100V durante 15 minutos con los polos invertidos. Se mezcla 1 ml de N-lauroryl sarcosina 0.3% con las células y se centrifuga 3 minutos a 13 000 rpm. Se extrae el sobrenadante con jeringa y se resuspende la pastilla en 40 µl de ficoll 20% en TE con micropipeta. después de dejar las muestras en hielo por 15 minutos se agrega buffer TB a la cámara para cubrir el gel y lisozima a la solución, se pesa 1mg de lisozima por 100 µl de H₂O y se agregan 40 µl a la solución de lisis. Se añade un volumen de 10 µl de solución de lisis a cada muestra y se toman 25 µl de la muestra para poner en cada pozo. Migración: 30 minutos a 40 V y 7 horas a 100 V.

LISOZIMA (Muramidasa) [de huevo blanco de gallina]

Cat. No. 1243004 - 5 g

Cristalizada (hidroclorada)

Definición de Unidad: Actividad enzimática a la cual decrece la absorbencia a una razón de 0.001/minuto bajo condiciones de ensayo.

Actividad específica: ca. 50 000 U/mg (25°C; *Micrococcus luteus* como sustrato).

Estabilidad: Estable a 4°C cuando se almacena seca.

BOEHRINGER MANNHEIM. Bioquímica.

V.14. Selección de cepas de *R. meliloti* con amplificaciones *in situ*. La estrategia para seleccionar cepas con amplificaciones *in situ* de los genes deseados se consigue al incubar las cepas elegidas en medio PY líquido enriquecido con CaCl₂ y Tetraciclina 5 µg/ml. Una vez que han crecido en estas condiciones se resembran en medio sólido con las mismas características, cada cultivo se diluye en una solución de sulfato de magnesio (MgSO₄) 10 mM y Polioxietilenesorbitanmonopalmitato [Tween 40] (vol/vol). Ya crecidas en medio sólido se repite el procedimiento pero ahora se cultivan en medios con Tc 10 µg/ml. Se repite así sucesivamente en medios con Tc 15, 20, 30 y 50 µg/ml respectivamente. A partir de Tc²⁰ las colonias con amplificaciones aparecen a los 3 a 5 días.

V.15. Análisis densitométrico de las regiones amplificadas. Para el análisis densitométrico de las autoradiografías se coloca cada placa sobre una hoja de acetato y se fija la lámpara del densitómetro rastreador a nivel de cada banda de interés. Se utiliza un software Windows 3.0 con el programa GS365W-2.22 *hsl* (Hoefer Scientific Instruments) donde se establecen los parámetros de lectura. Se mide la distancia que ha de correr la luz del densitómetro (la distancia entre las bandas de interés) y el porcentaje de transmitancia de la luz (5 a 25%). Una vez establecidos los parámetros se inicia la lectura y al mismo tiempo se activa la lámpara y el graficador para visualizar en la pantalla las densidades de cada banda como picos en una gráfica.

Una vez obtenida cada lectura se mide el área bajo la curva de cada uno de los picos mediante una integración de tipo gaussiana y así se obtienen valores numéricos que se traducen como proporciones entre las intensidades de cada banda e indirectamente es una medición del número de copias de una secuencia determinada. El tratamiento de los datos lo tiene programado el mismo software.

VI. RESULTADOS.

VI.1. Purificación del vector de clonación (pSUP205) y de los fragmentos de ADN con los genes *syrm-nodD3-syrA* de *R. meliloti* 41. Los plásmidos utilizados se purificaron mediante la técnica de lisis alcalina (Maniatis, T. et.al. 1982). La base de esta técnica es que existe un estrecho intervalo de pH al cual el ADN no súperenrollado se desnaturaliza, mientras que los plásmidos súperenrollados no lo hacen. Si se agrega NaOH a las células lisadas hasta un pH de 12 a 12.5, los puentes de hidrógeno en las moléculas no súperenrolladas se rompen, lo cual causa que la doble hélice se desdoble y las dos cadenas de polinucleótidos se separen (Brown, T.A. 1992). Se purificaron tanto el plásmido pSUP205 (figura 17) como el plásmido pNID6 (figura 18) a partir de *R. meliloti* AK631 y *E. coli* S17.1 respectivamente. Para confirmar la naturaleza de los plásmidos purificados, se digirieron ambos con la enzima de restricción BamHI y se sometieron a electroforésis en geles de agarosa. Los mapas de los plásmidos nos hacían esperar para el pNID6 dos fragmentos que correspondiesen a ± 20 kb (vector pRK290) y otro a ± 7.2 kb (genes *syrm-nodD3-syrA*; Györgypal, Z. et.al. 1988; Kondorosi, E. et.al. 1991a). En cuanto al pSUP205, la literatura muestra un plásmido de ± 8.6 kb (Simon, R. et.al. 1983), así que al digerirlo con la enzima de restricción BamHI -sitio único de corte en el plásmido- se lineariza el vector y en un gel de agarosa se observa una sola banda que migra con ese

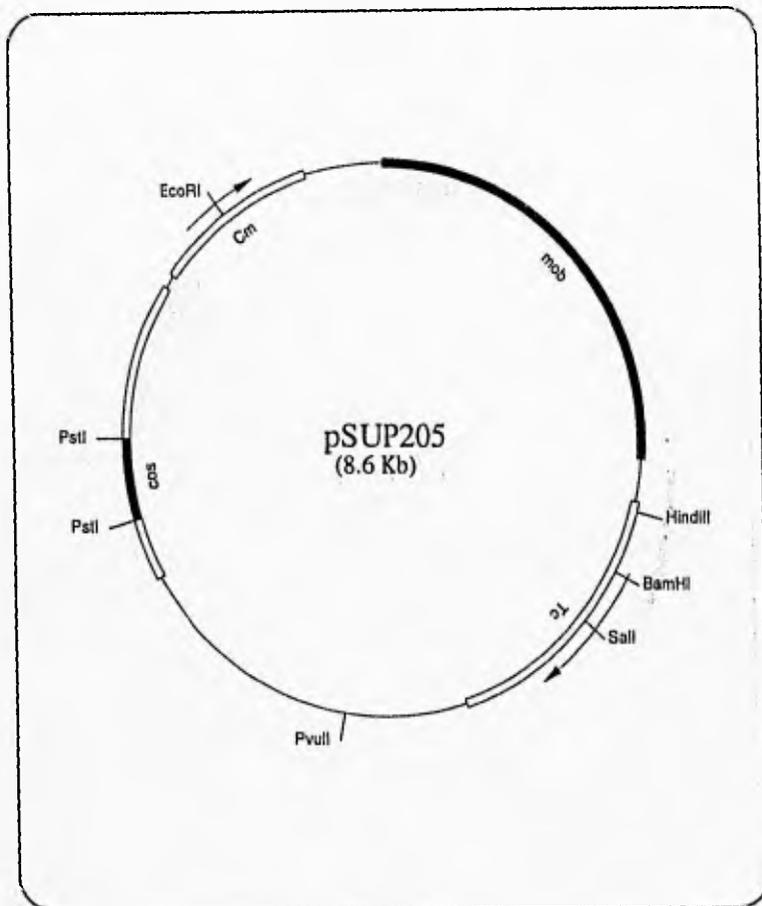


Figura 17. Plásmido pSUP205. La región *mob* permite movilizar este plásmido vía conjugación. La región *cos* permite clonar en esta molécula fragmentos grandes de ADN para funcionar como cósmido. Su origen de duplicación es *colE1* (para *Escherichia coli*). Confiere resistencia a Cloranfenicol y Tetraciclina.

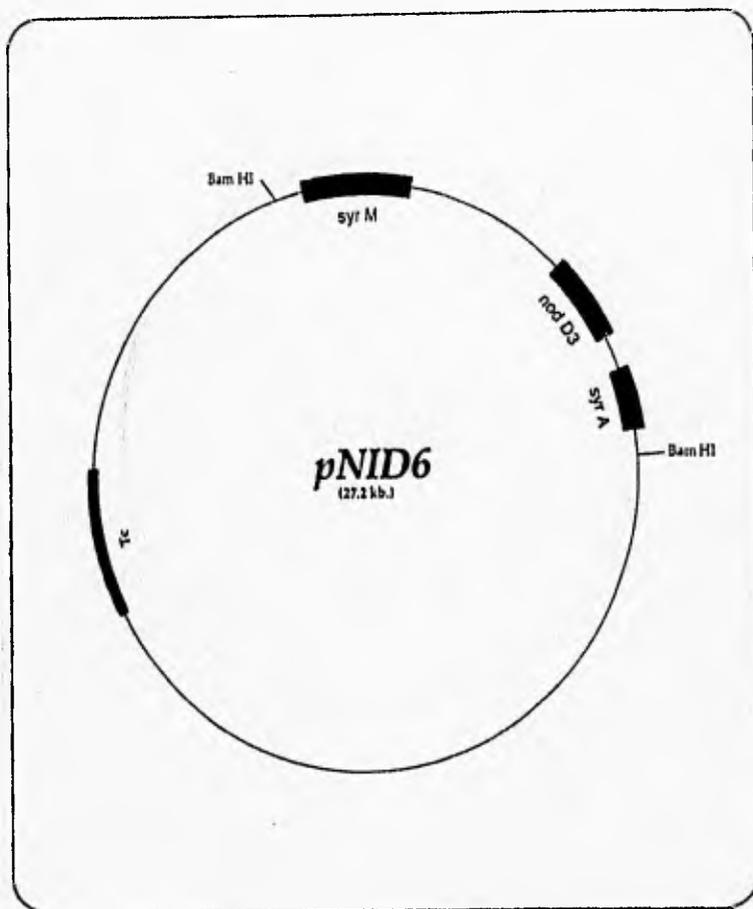


Figura 18. Plásmido pNID6. Donado al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno por la Dra. Eva Kondorosí. Porta los genes reguladores *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* 41 en un fragmento BamHI de ± 7.2 kb. Confiere resistencia a Tetraciclina.

tamaño. Las figuras 19 y 20 muestran efectivamente la purificación de los plásmidos de interés. Los plásmidos se cortaron en el sitio de restricción **BamHI** para observar mediante electroforesis en geles de agarosa un fragmento de 7.2 kb (*syrM-nodD3-syrA*) y uno de 20 kb (pRK290) respectivamente, en el caso del pNID6 y un solo fragmento de ± 8.5 kb que corresponden al pSUP205 cuyo único sitio para **BamHI** o **EcoRI** permite observar una sola banda en geles de agarosa.

VI.2. Construcción del plásmido integrativo pSMD3-Tc. El plásmido integrativo en *R. meliloti* llamado pSMD3-Tc se construyó como se muestra en la figura 21. El pNID6 (figura 18), tiene dos fragmentos al digerirlo con la enzima de restricción **BamHI**: un fragmento de ± 20 kb es el plásmido pPP375, un 'polylinker' derivado del pRK290, donde se clonaron los genes de nuestro interés *syrM-nodD3-syrA* en el sitio **BamHI** que miden en conjunto ± 7.2 kb (Györgypal, Z. et.al. 1988; Kondorosi, E. et.al. 1991a). Además, este plásmido tiene un origen de duplicación para *R. meliloti* (RK2, IncP). Después de la purificación de los plásmidos y su digestión con enzimas de restricción, se ligaron los fragmentos de interés y así se clonó el fragmento de 7.2 kb con los genes *syrM-nodD3-syrA* en el plásmido pSUP205 previamente defosforilado para generar un nuevo plásmido (figura 22) denominado pSMD3 (pSUP205 + *syrM-nodD3-syrA*). Después de la ligación se transformaron células competentes *E. coli* DH5- α y S17.1 y se plaquearon las mismas en medios sólidos LB, que se seleccionaron con Cm 10 $\mu\text{g/ml}$ (200 μl) Cm 50 $\mu\text{g/ml}$ (300 μl) y Cm 100 $\mu\text{g/ml}$ (500 μl). Después se sembraron las colonias (Cm^R) obtenidas en medios LB con Tc 10 $\mu\text{g/ml}$. Para confirmar que el gen de resistencia a Tetraciclina estaba bloqueado, se esperaban células Tc-sensibles y de las 112 colonias analizadas se encontraron sólo dos con el fenotipo deseado: Cm^R/Tc^S. Se prepararon frascos en glicerol para la conservación de las cepas de interés.

Se purificó ADN de las colonias Cm^R/Tc^S obtenidas y se digirió con la enzima de restricción **BamHI** para observarlo en un gel de agarosa 0.8%. Son evidentes dos fragmentos que corresponden al pSUP205 y a los genes *syrM-nodD3-syrA* (figura 23). Esta primera construcción recibió el nombre de pSMD3. El plásmido pretendía ser el que se cointegrara en el genoma de *R. meliloti* 41 para seleccionar fenómenos de amplificación al aislar con Cm. Sin embargo, el empleo del pSMD3 (Cm⁺) no permitió la selección de cepas cointegrantes debido a que después de realizar la cruce triparental encontramos una alta proporción de colonias de *R. meliloti* 41 que crecieron en medios PY con Cm 30 y hasta 40 $\mu\text{g/ml}$. Estos primeros resultados nos condujeron a realizar una segunda cruce

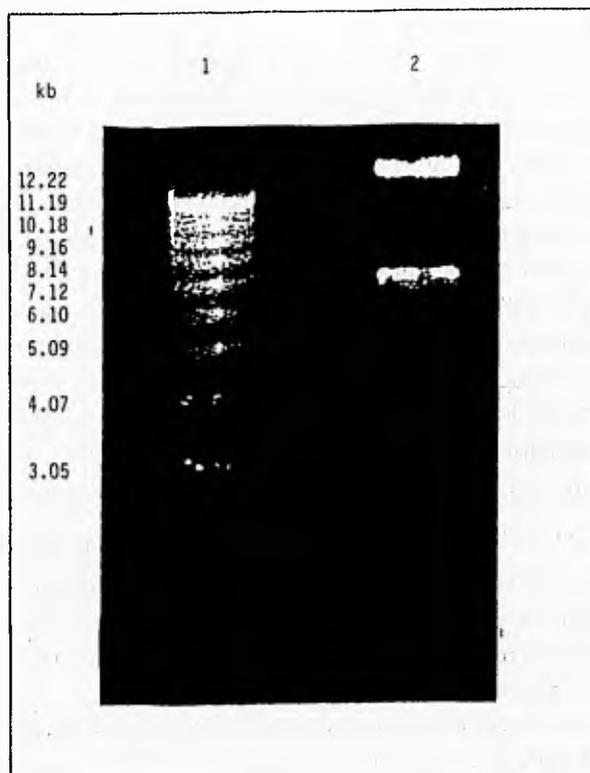


Figura 19. Patrón electroforético de restricción del plásmido pNID6 digerido con la enzima de restricción BamHI. En 1 se observa el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. En 2 se observan las dos bandas que corresponden a los dos fragmentos que se obtienen al digerir este plásmido cortando con BamHI. La banda de menor peso molecular corresponde al fragmento de ± 7.2 kb con los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* mientras que la banda superior corresponde a un derivado del pRK290 (± 20 kb), vector de clonación para estos genes.

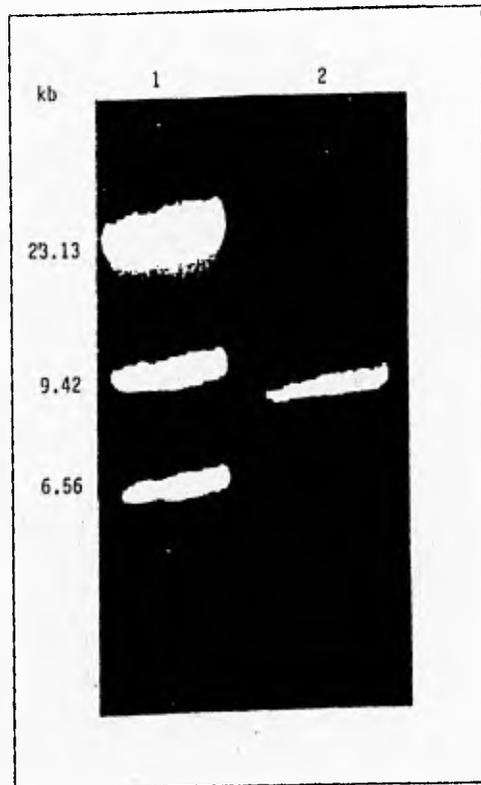


Figura 20. Patrón electroforético de restricción del plásmido pSUP205 digerido con la enzima de restricción **BamHI**. En 1 se observa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; en 2 se observa la banda que corresponde a este plásmido linealizado como un fragmento de ± 8.6 kb.

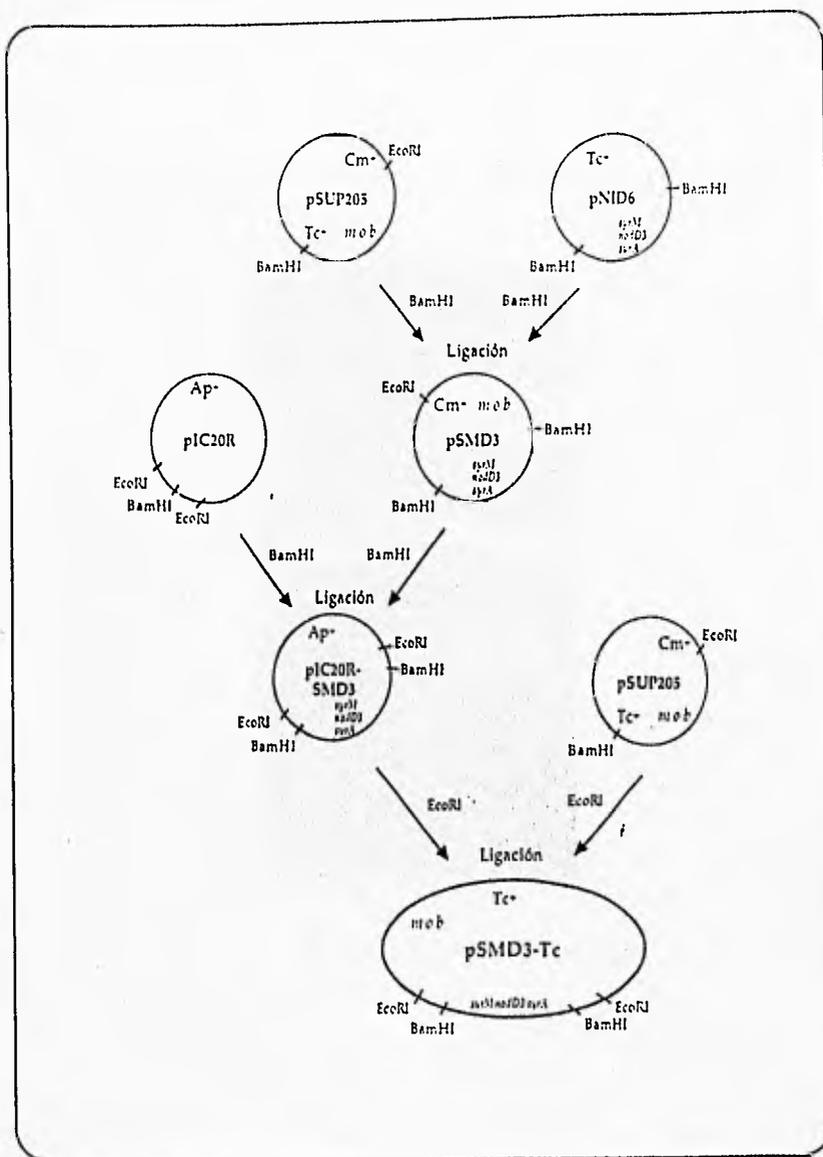


Figura 21. Génesis del plásmido pSMD3-Tc que permite cointegración de los genes *sym-110d3-syrA* en el genoma simbiótico de *R. meliloti* 41 aislando cepas *Tc⁺/Cm^r*.

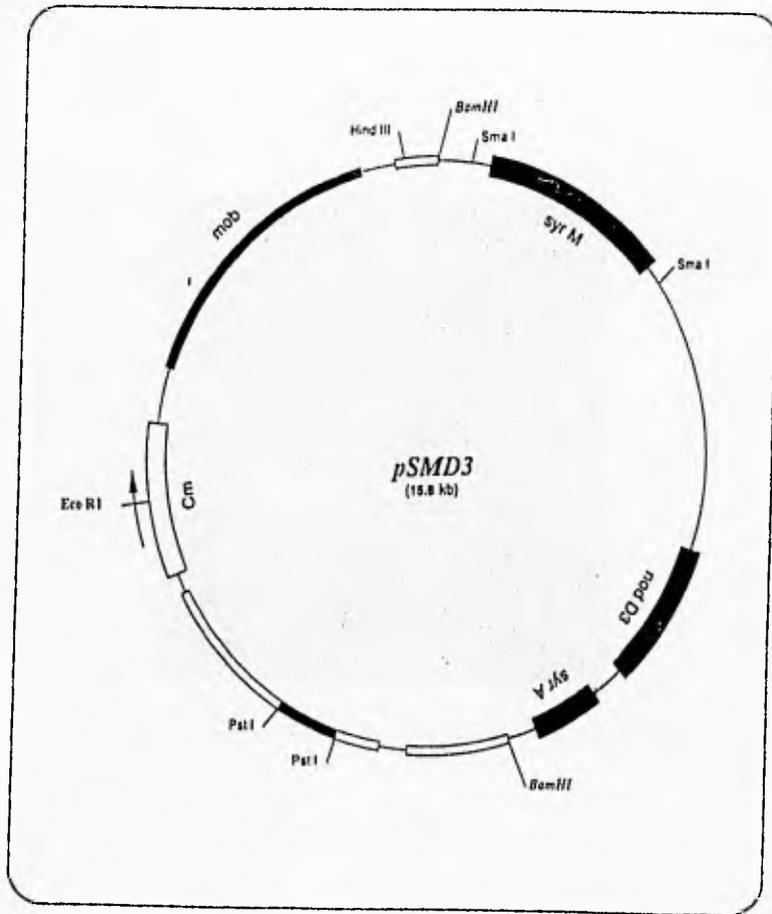


Figura 22. Plásmido pSMD3. Primera clonación del fragmento de 7.2 kb con los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti*. Contiene resistencia a Cloranfenicol. Plásmido 'suicida' en *Rhizobium*.

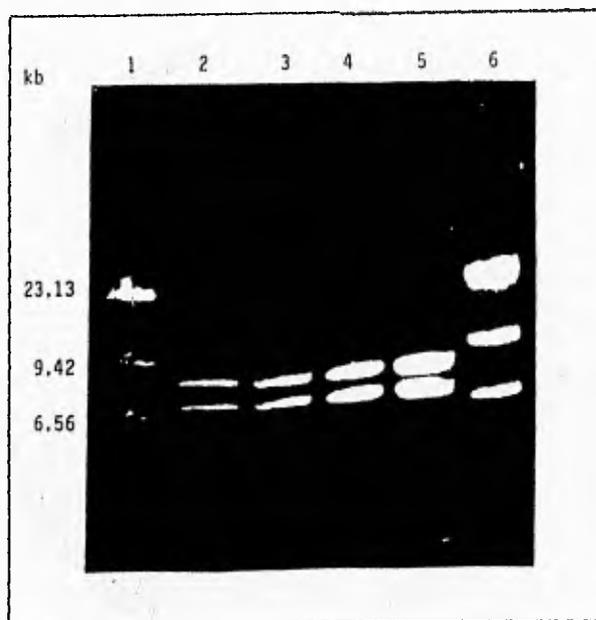


Figura 23. Patrón electroforético de restricción del plásmido pSMD3 digerido con la enzima de restricción BamHI. En 1 y 6 se observa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; en 2-5 se observan a diferentes cantidades de ADN las dos bandas que corresponden a los dos fragmentos que se obtienen al digerir este plásmido cortando con BamHI. La banda de menor peso molecular corresponde al fragmento de ± 7.2 kb con los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* mientras que la banda superior corresponde al vector de clonación pSUP205 como un fragmento de ± 8.6 kb.

triparental con una mezcla de selección de tres antibióticos: Sm¹⁰⁰, Cm³⁰⁻⁴⁰, Na¹²⁰, sin embargo ante estas condiciones no creció una sola colonia de las tres ni de la mezcla entre ellas.

Debido a estos problemas de selección se pensó en utilizar otro marcador selectivo. Se determinó clonar el gene de resistencia a Km ó Tc en el pSMD3. Con el fin de obtener un plásmido Tc^R se partió del pIC20R (figura 24) y se clonó el fragmento de 7.2 kb en BamHI para religar un fragmento EcoRI en el pSUP205. Fue necesario purificar el plásmido pIC20R para diseñar un nuevo vector capaz de seleccionar cointegraciones en *R. meliloti* 41 por medio de la resistencia a Tc. Se confirmó la purificación de este plásmido al digerir con la enzima de restricción BamHI y observar una sola banda de ± 2.7 kb en geles de agarosa. Se efectuó otra mezcla de ligación con relación 2:1 (10 µl pIC20R y 5 µl pSMD3) para obtener un plásmido que fuera portador de los genes *syrM-nodD3-syrA* pero que el fragmento tuviese extremos EcoRI y poder clonarlo así nuevamente en el pSUP205 y seleccionar con Tc.

Se ligaron los genes en el pIC20R y la nueva construcción intermediaria se le llamó pIC20R-SMD3 (figura 25). La selección de cepas *E. coli* DH5α con está construcción presentaban el fenotipo Ap⁺ (100 µg/ml) y Cm⁻. De las colonias analizadas el 3% mostraron este fenotipo y la purificación de ADN confirmó la existencia de la construcción. Se confirmó la naturaleza del plásmido al digerir con EcoRI y observar dos fragmentos que corresponden a los genes *syrM-nodD3-syrA* y al pIC20R (figura 26). El fragmento de interés cuenta así con extremos EcoRI y esto posibilita su clonación en el pSUP205.

Finalmente se partió del pIC20R-SMD3 y del pSUP205 -ambos digeridos con EcoRI- y defosforilado para integrar una última reacción de ligación que se realizó en proporción 1:10 respectivamente y se seleccionaron colonias transformantes *E. coli* DH5α en medios de cultivo LB con Tc 5 µg/ml y sensibilidad a Ampicilina (100 µg/ml). De 60 colonias seleccionadas al menos 10 presentaron el fenotipo deseado (Tc⁺/Ap⁻) y después de extraer ADN plasmídico de cada una de ellas se digirió con diferentes enzimas para confirmar que dos colonias contaban con el plásmido integrativo pSMD3-Tc, teóricamente capaz de seleccionar fenómenos de amplificación en *R. meliloti* 41. Se utilizaron HindIII (se obtienen dos fragmentos grandes mayores de 4 kb y 6 kb); SmaI (dos fragmentos superiores a 4 kb y 6 kb y uno pequeño menor a 1 kb) y con BamHI para obtener el fragmento original de 7.2 kb y dos fragmentos que en conjunto integran 8.6 kb y que corresponden al pSUP205 (figura 27). También se utilizó EcoRI y como es lógico sólo

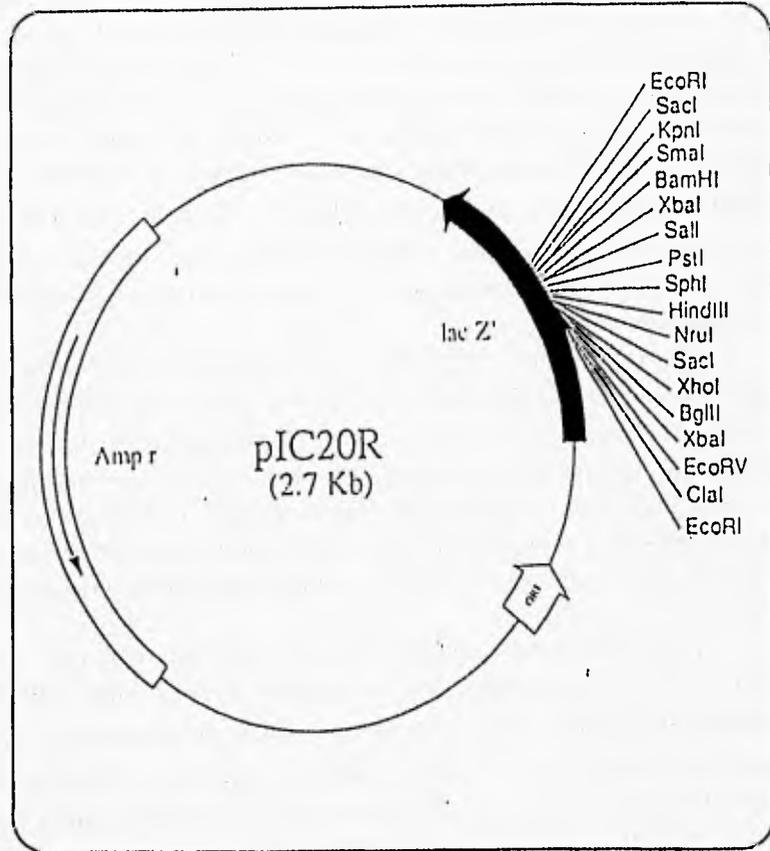


Figura 24. Plásmido pIC20R. Vector intermediario para clonar el fragmento BamHI - BamHI con los genes *sym-nodD3-syrA* de *R. meliloti* y poder obtenerlo posteriormente digiriendo este plásmido con la enzima de restricción EcoRI. La principal característica de interés del pIC20R para este trabajo fue que tiene un sitio "polylinker". Confiere resistencia a Ampicilina.

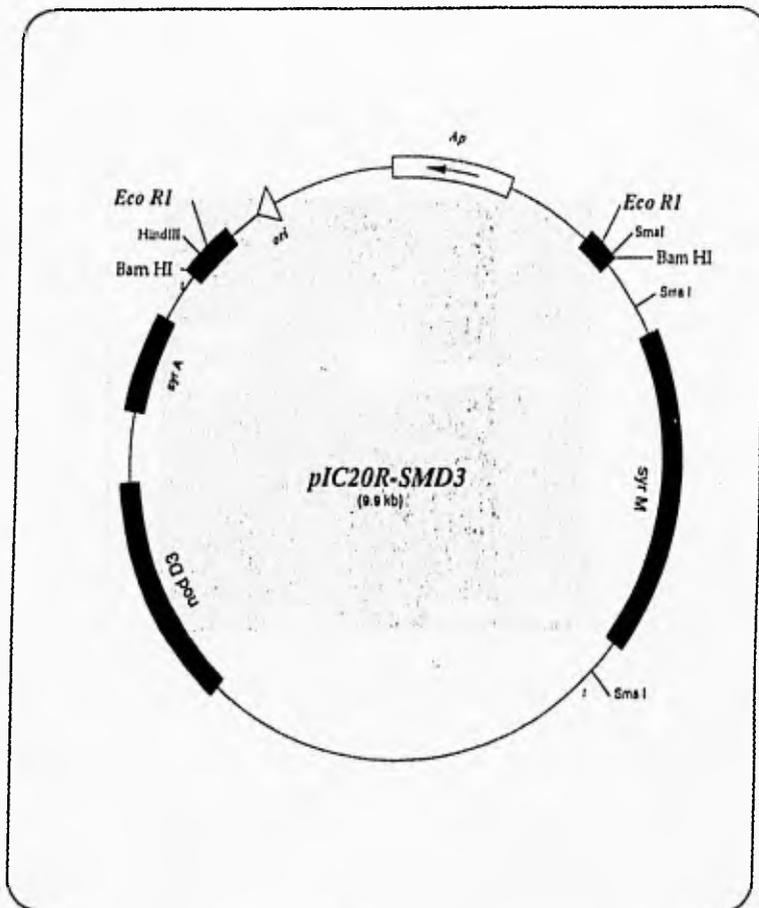


Figura 25. Plásmido pIC20R-SMD3. Vector intermediario que permite obtener el fragmento con los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* con extremos de corte para la enzima de restricción EcoRI. Confiere resistencia a Ampicilina.

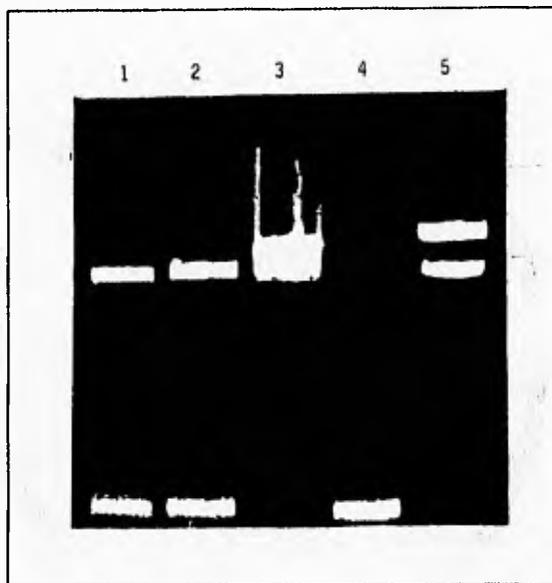


Figura 26. Patrón electroforético de restricción del plásmido pIC20R-SMD3 digerido con la enzima de restricción EcoRI. En 1 y 2 se observan los dos fragmentos que se obtienen al digerir este plásmido con la enzima EcoRI. La banda inferior corresponde al vector intermediario pIC20R y la superior al fragmento de ± 7.2 kb con los genes de interés *sym-nodD3-syaA*. En 3 se puede observar el mismo plásmido sin digerir, mientras que en 4 y 5 se incluyen como controles el pIC20R digerido con EcoRI y el pSMD3 digerido con BamHI respectivamente.

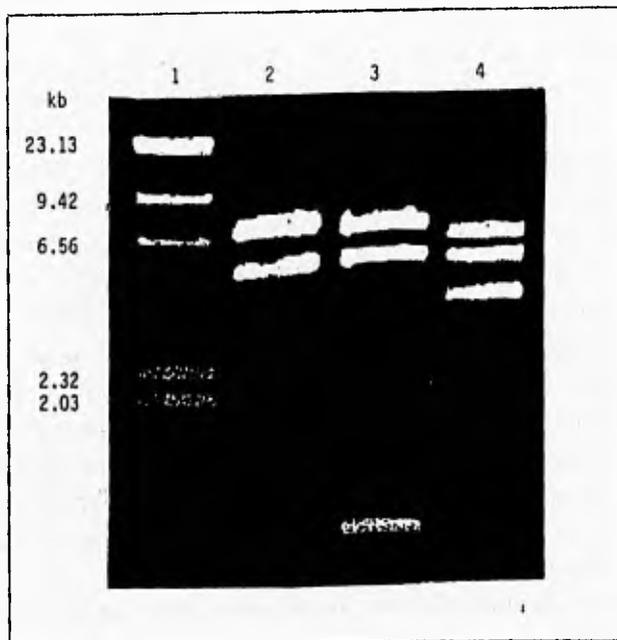


Figura 27. Patrón electroforético de restricción del plásmido pSMD3-Tc. En 1 se observa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; en 2 se observan los dos fragmentos que se obtienen al digerir este plásmido con la enzima de restricción Hinf III; en 3 se puede observar el mismo plásmido digerido con la enzima de restricción Sma I, mientras que en 4 se observa la digestión de este plásmido con Bam HI. Las tres digestiones muestran la construcción del plásmido suicida en *R. meliloti*, seleccionable con Tc^R.

se observan dos fragmentos casi idénticos en tamaño a los observados en el pSMD3: uno de ± 7.2 kb y otro de ± 8.6 kb. Se prepararon frascos con glicerol de estas cepas *E. coli* DH5 α /pSMD3-Tc.

VI.3. Integración de la molécula de ADN no duplicativa pSMD3-Tc en el pSym- α de *R. meliloti* 41. El plásmido pSMD3-Tc (figura 28) porta los genes reguladores *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* 41 pero tiene un origen de duplicación ajeno a la maquinaria molecular de esta especie. Esta característica lo hace un plásmido 'suicida' en *R. meliloti*. Sin embargo, es posible cointegrar el plásmido vía recombinación homóloga de las secuencias clonadas (*syrM-nodD3-syrA*) con los genes tipo silvestre de *R. meliloti*. La cointegración del plásmido suicida es dependiente de *recA* y el mecanismo molecular que interviene es del tipo Campbell. La integración en el pSym- α resulta en la creación de una Unidad de Amplificación (AUD), con dos secuencias repetidas en orientación repetida directa, separadas por la secuencia del vector de integración (pSUP205).

Para lograr la integración del plásmido pSMD3-Tc en el genoma de *R. meliloti* 41 se realizó una transconjugación de *E. coli* DH5 α (pSMD3-Tc) a *R. meliloti* 41 por medio de *E. coli* HB101 (pRK2013) como 'auxiliar' para la transferencia del plásmido. Los fenotipos de cada cepa utilizada para esta cruz se muestran en la Tabla IV. *R. meliloti* 41 sólo crece en medios de cultivo con Sp¹⁰⁰ y no con Tc⁵; *E. coli* DH5 α /pSMD3-Tc crece en medios con Tc⁵ pero no con Sp¹⁰⁰ y finalmente *E. coli* HB101/pRK2013 no crece en ninguno de los dos. Ahora bien, para cada una de las tres cepas no se observa crecimiento en las condiciones de selección Tc⁵/Sp¹⁰⁰.

Después de evaluar los fenotipos de las tres cepas de interés se hicieron todas las mezclas de dos de ellas. Para *R. meliloti* 41 + *E. coli* DH5 α /pSMD3-Tc se observa crecimiento tanto en Tc⁵ como en Sp¹⁰⁰ pero no en la mezcla de ambos (Tc⁵/Sp¹⁰⁰) y esto se puede interpretar como el crecimiento de cada cepa por separado, sin transconjugación. En la mezcla de *R. meliloti* 41 + *E. coli* HB101/pRK2013 se observa crecimiento sólo en Sp¹⁰⁰ pero no en Tc⁵ ni en la mezcla Tc⁵/Sp¹⁰⁰, lo cual indica que sólo está creciendo *R. meliloti* 41 y que tampoco hubo transconjugación entre ellas al no observarse crecimiento en la mezcla de los dos antibióticos. En la última mezcla control de *E. coli* DH5 α /pSMD3-Tc + *E. coli* HB101/pRK2013 se observa crecimiento sólo en Tc⁵ y esto revela que sólo *E. coli* DH5 α /pSMD3-Tc está sobreviviendo pero como ninguna de las dos cepas es resistente a Sp¹⁰⁰ no hay crecimiento en Sp¹⁰⁰ ni en Tc⁵/Sp¹⁰⁰, lo que revela que tampoco existió

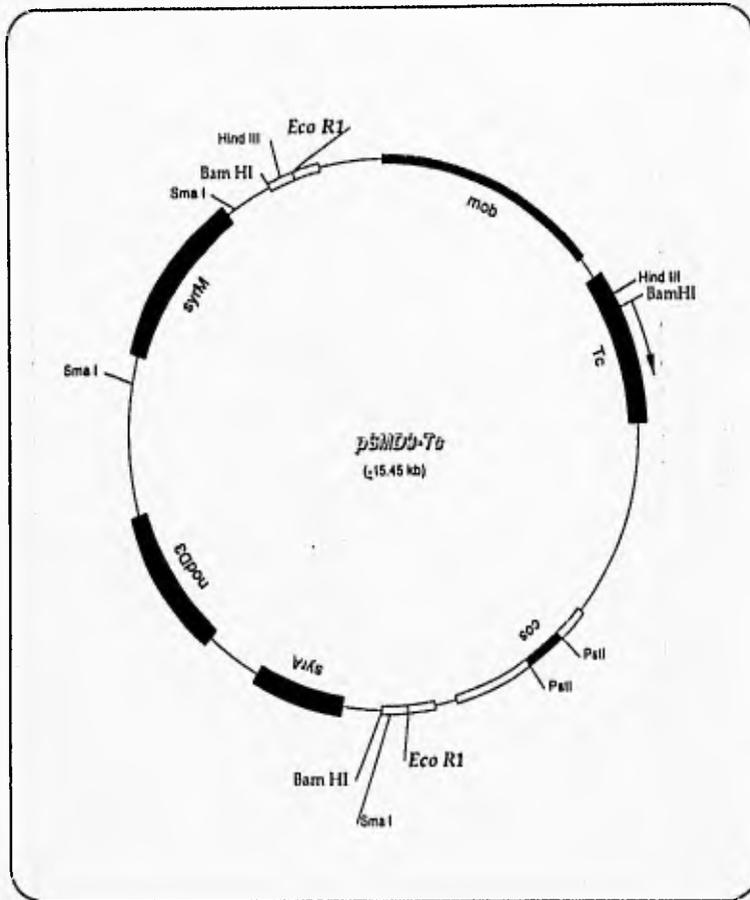


Figura 28. Plásmido pSMD3-Tc. Plásmido integrativo con los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* clonados en el sitio EcoRI del pSUP205. Confiere resistencia a Tetraciclina.

TABLA IV

Resultado de la cruce triparental para seleccionar cointegración del pSMD3-Tc (*E. coli*) en *R. meliloti*.

Medios	<i>R. meliloti</i> 41	<i>E. coli</i> DH5 α /pSMD3-Tc	<i>E. coli</i> HB101/pRK2013
PY/CaCl ₂	+	+	+
Tc ⁵	-	+	-
Sp ¹⁰⁰	+	-	-
Tc5/Sp ¹⁰⁰	-	-	-
	Medios { <i>R. meliloti</i> 41 + <i>E. coli</i> DH5 α /pSMD3-Tc <i>R. meliloti</i> 41 + <i>E. coli</i> HB101/pRK2013 <i>E. coli</i> DH5 α /pSMD3-Tc + <i>E. coli</i> HB101/pRK2013		
PY/CaCl ₂	+	+	+
Tc ⁵	+	-	+
Sp ¹⁰⁰	+	+	-
Tc5/Sp ¹⁰⁰	-	-	-

conjugación entre ellas.

Estos resultados confirmaron por una parte las resistencias de cada cepa y garantizaron que las colonias seleccionadas de la crucea triparental entre *R. meliloti* 41, *E. coli* DH5 α /pSMD3-Tc y *E. coli* HB101/pRK2013 serían células de *R. meliloti* 41 (Sp^R) con una cointegración por recombinación homóloga del pSMD3-Tc (Tc^R) y por estas características serían capaces de crecer en medios de cultivo con Tc⁵/Sp¹⁰⁰.

La mezcla triparental creció lentamente y hasta pasados tres días se contó con colonias aisladas. Se sembraron 100 de estas colonias en las mismas condiciones (PY-CaCl₂: Tc⁵ y Sp¹⁰⁰) y se eligieron 18 colonias al azar para realizarles extracciones plasmídicas tipo Eckhardt y confirmar que fuesen colonias de *R. meliloti* por análisis del patrón de migración en un gel de agarosa. Efectivamente el perfil de migración indica que todas las colonias seleccionadas Sp^R Tc^R son *R. meliloti* 41 al visualizarse en el gel tipo Eckhardt dos bandas que corresponden a los dos megaplásmidos pSym- α y pSym- β , además del cromosoma (figura 29).

Asimismo, se purificó ADN genómico de 5 cepas y se digirió con la enzima de restricción EcoRI para comparar el patrón de digestión con respecto a la cepa silvestre en geles de agarosa. Los perfiles de digestión son prácticamente idénticos entre sí (figura 30) y así se reconfirmó que se trataba de cepas de *R. meliloti* 41 resistentes a Tc seguramente por la integración del pSMD3-Tc (Tc^R).

Para evidenciar la integración del plásmido pSMD3-Tc en *R. meliloti* 41, se transfirió el ADN total digerido en EcoRI a membranas de nylon para la hibridización; se utilizaron como sondas radiactivas los plásmidos pSUP205 y pSMD3-Tc digeridos con la enzima de restricción EcoRI. Además, se utilizó como sonda radiactiva el producto de PCR (Polimerase Chain Reaction) *nodD3*.

El análisis de hibridización de las muestras del ADN total revelan que el pSUP205 se encuentra insertado en el genoma de *R. meliloti* 41 debido a que se pueden observar una sola banda en las colonias transformantes y no en la cepa silvestre (figura 31). La hibridización con *nodD3* (PCR) evidencia una banda muy intensa (hibridización *nodD3-nodD3*) y otras de menor intensidad que ésta y que podrían corresponder a hibridizaciones heterólogas con los genes *nodD3-nodD1*, *-nodD2* ó *-syrM*. En el caso de la hibridización del ADN de las cepas silvestre y las cointegrantes contra la sonda radiactiva *nodD3* la banda de la cepa silvestre es claramente de mayor tamaño que las de las colonias cointegrantes. Ello se debe a que el ADN de la cepa silvestre *R. meliloti* 41 se digirió con la enzima de restricción EcoRI y el ADN de las cepas cointegradas fue digerido con BamHI.

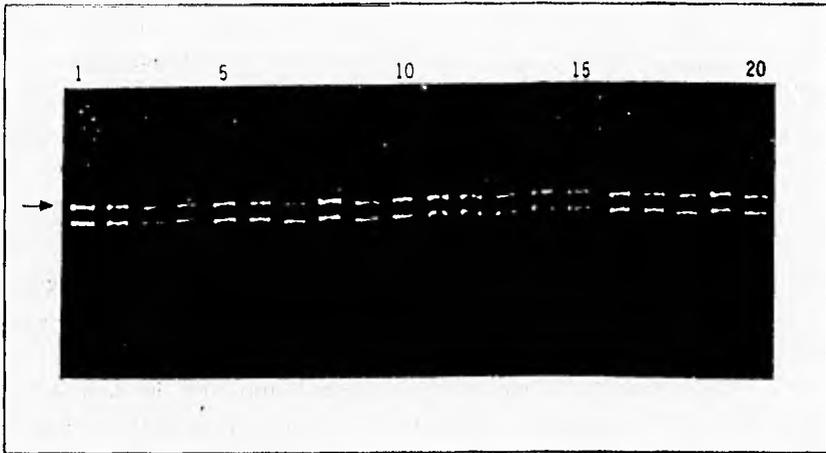


Figura 29. Patrón electroforético de los megaplásmidos pSym- α y pSym- β de *R. meliloti* 41. Los megaplásmidos pSym- α y pSym- β migran juntos y se observan en la flecha. La banda inferior corresponde a un plásmido críptico en esta cepa. En cada extremo se colocaron cepas silvestres, mientras que en el centro (2 - 19) se muestran cepas que son Tc^R debido a la cointegración del pSMD3-Tc en el pSym- α .

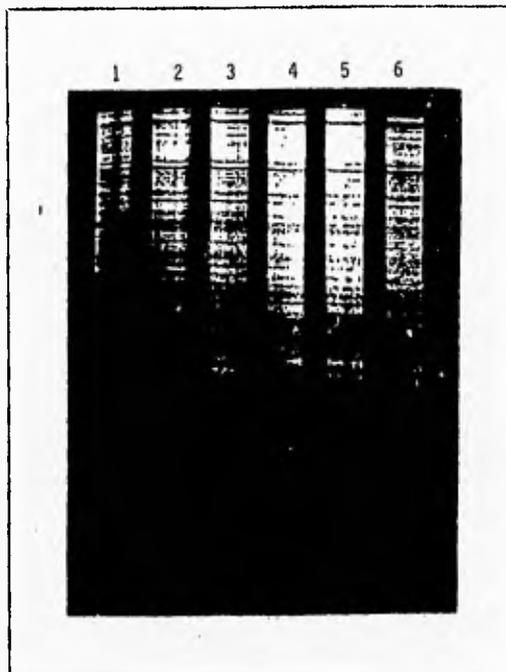


Figura 30. Patrón electroforético de restricción utilizando la enzima de restricción EcoRI de ADN genómico de las cepas coinTEGRANTES de *R. meliloti* 41 que han incorporado en su genoma el plásmido pSMD3-Tc por recombinación homóloga a nivel de la secuencia de los genes *syrM-nodD3-syrA*. En 1 se muestra el patrón de restricción de la cepa silvestre Rm 41 y de 2 - 6 se observan cinco patrones de restricción para igual número de colonias analizadas.

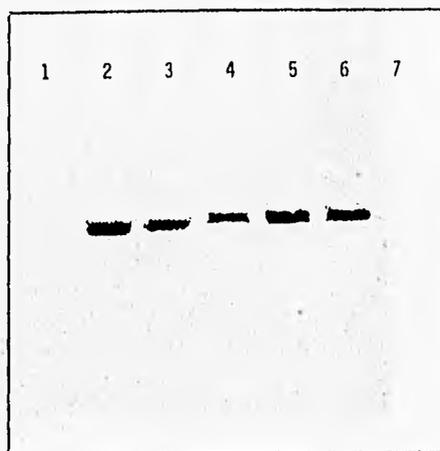


Figura 31. Hibridización de ADN total de *R. meliloli* 41 digerido con la enzima de restricción EcoRI utilizando como sonda radiactiva el plásmido pSUP205. Se muestran cinco cepas cointegrantes (2 - 6) que revelan la presencia del vector pSUP205 en el genoma por cointegración. En 1 y 7 no se observa hibridización por tratarse de ADN de la cepa silvestre Rm 41.

VI.4. Selección y Naturaleza de los Fenómenos de Amplificación.

Teóricamente, bajo las condiciones de crecimiento de las cepas cointegrantes en medios PY-CaCl₂ Tc⁵ y Sp¹⁰⁰ se encuentran al menos duplicados los genes *syrM-nodD3-syrA* o con un bajo número de copias. Con el fin de incrementar el número de copias de estas unidades de amplificación se sembraron tres cepas seleccionadas en medios PY-CaCl₂ con dosis sucesivamente más altas de Tc: Tc⁵, Tc¹⁰, Tc¹⁵, Tc²⁰, Tc³⁰ y Tc⁵⁰ (ver *Materiales y Métodos*). Teóricamente ante estas condiciones se seleccionaron cepas que habían amplificado el gen de resistencia a Tc y consecuentemente los genes bajo estudio. Estas cepas elegidas mostraron un ligero aspecto gomoso.

Al haber purificado ADN total de las tres cepas elegidas se digirió con la enzima de restricción BamHI y se sometió a electroforésis en geles de agarosa 0.8% para transferir las muestras de ADN a membranas de nylon y así hibridizar contra el plásmido integrativo pSMD3-Tc y evidenciar la magnitud de amplificaciones en cada una. Al digerir las muestras de ADN de las cepas cointegrantes con la enzima de restricción BamHI las bandas observadas que corresponden a los genes *syrM-nodD3-syrA* migran a la misma altura tanto en la cepa silvestre como en las cointegrantes.

Para evaluar el nivel de amplificación en este estudio se utilizó como sonda no radiactiva el producto de PCR *nifH*, que permitió comparar la intensidad de la banda hibridizada de este locus en una copia contra la intensidad que se obtuviese en la zona de los genes *syrM-nodD3-syrA*, al utilizar como sonda el plásmido pSMD3-Tc para esta zona amplificada.

Los resultados obtenidos sobre la cointegración del plásmido pSMD3-Tc en el genoma de *R. meliloti* 41 permiten ver un ligero incremento en la intensidad de la zona de estudio con los genes *syrM-nodD3-syrA* (figura 32). Después de haber obtenido estas cepas cointegrantes se crecieron en concentraciones sucesivamente más altas de Tc y de cada concentración de Tc se obtuvo ADN genómico para digerirlo con la enzima de restricción BamHI. Asimismo, se extrajo ADN genómico de la cepa silvestre *R. meliloti* 41 y de la cepa portadora del plásmido pNID6 en multicopia, *R. meliloti* AK631.

Después de transferir el ADN a membranas de nylon se hibridizaron con la técnica no radiactiva tipo ECL. Se utilizaron como sondas el producto de PCR *nifH* y el plásmido pSMD3-Tc. El resultado de esta hibridización (figura 33) indica un escaso nivel de amplificación en las cepas seleccionadas y al parecer el plásmido pNID6 está representado en un mayor número de copias por genoma.

La intensidad observada en los fragmentos de interés con los genes *syrM-nodD3-syrA* (7.2 kb) en las cepas cointegrantes con respecto a la intensidad de la banda

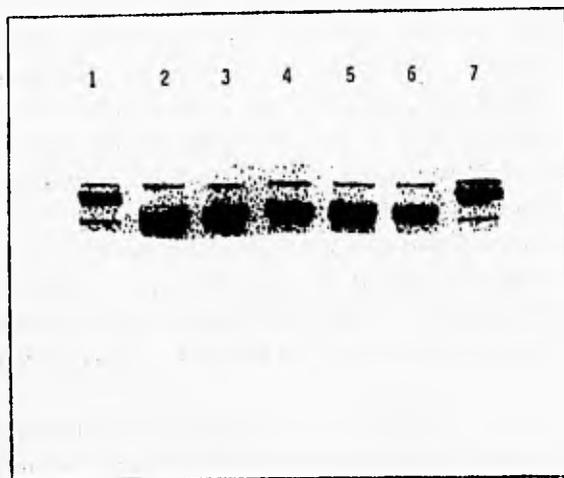


Figura 32. Hibridización de ADN total de *R. meliloti* 41 digerido con la enzima de restricción *EcoRI* utilizando como sonda radiactiva el producto de PCR *nodD3*. Se muestran cinco cepas cointegrantes (2 - 6) que revelan la presencia de al menos dos copias del gen *nodD3* en el genoma de *R. meliloti* 41, a juzgar de la intensidad de la señal de las bandas más gruesas (*nodD3-nodD3*). En 1 y 7 se observa la hibridación de *nodD3* en ADN de las cepas silvestres. En ambos casos se notan algunas otras bandas de menor intensidad que pudiesen corresponder a hibridaciones heterólogas con *nodD1* ó *nodD2*. Entre las cepas silvestres y las cointegrantes se observan diferentes tamaños de las bandas debido a que el fragmento *EcoRI* con los genes *syrM-nodD3-syrA* de las cepas silvestres es más grande con respecto a las cepas manipuladas por la integración del pSMD3-Tc (*ver texto*).

nifH de cada cepa hace pensar en pocos fenómenos de amplificación subsecuentes a la duplicación inicial. Las otras dos bandas observadas corresponden al pSUP205 (recuérdese que el pSMD3-Tc cortado con BamHI produce estos tres fragmentos). Sin embargo, aunque es evidente un aumento en la intensidad y por lo tanto en el nivel de amplificación, no es drástica la diferencia entre Tc⁵-Tc⁵⁰ (figura 33) y ello hace pensar en un bajo nivel de amplificación en la zona estudiada.

Algo interesante fue observar una intensidad muy similar entre el número de copias de los genes *syrM-nodD3-syrA* en el plásmido pNID6 con respecto al número de copias del locus *nifH* (figura 33). Al parecer la banda superior '*nifH*' en la cepa *R. meliloti* AK631 corresponde más bien a una hibridización entre el pSUP205 y el pRK290 debido a que comparten una buena porción de homología de secuencia. Para confirmar la realidad del número de copias de los genes *syrM-nodD3-syrA* clonados en el plásmido pRK290 en la cepa *R. meliloti* AK631 y compararla con el número de copias obtenido para los mismos genes en cada cepa cointegrante de *R. meliloti* 41 y seleccionadas en diferentes concentraciones de Tc se purificó ADN genómico de las ocho cepas estudiadas: *R. meliloti* 41, *R. meliloti* AK631::pNID6, *R. meliloti* 41-[Tc⁵], *R. meliloti* 41-[Tc¹⁰], *R. meliloti* 41-[Tc¹⁵], *R. meliloti* 41-[Tc²⁰], *R. meliloti* 41-[Tc³⁰] y *R. meliloti* 41-[Tc⁵⁰]. El ADN de cada cepa fue sujeto a restricción con la enzima BamHI. Cada muestra se sometió a electroforésis en geles de agarosa y para cada caso se pusieron diferentes volúmenes de ADN: 5, 10, 15 y 20 µl. Después de transferir cada grupo de muestras de ADN a membranas de nylon se hibridizó contra el producto de PCR *nifH* y contra el producto de PCR *syrM* por medio de la técnica no radiactiva. El empleo de estas sondas permitiría comparar exclusivamente el número de copias de los genes amplificados *syrM-nodD3-syrA* respecto al locus no amplificado (una sola copia) de *nifH*.

El resultado de estas hibridizaciones permitió observar que la cepa *R. meliloti* AK631::pNID6 tiene efectivamente mayor número de copias de los genes *syrM-nodD3-syrA* con respecto a la cepa silvestre *R. meliloti* 41. En lo que respecta a las seis cepas cointegradas restantes se observa un ligero incremento en la intensidad de la zona de estos genes (figuras 34 A-D).

VI.5. Análisis densitométrico de las amplificaciones obtenidas. La evidencia para revelar amplificación génica puede ser cualitativa por análisis directo de geles de agarosa con patrones de restricción de ADN, con las técnicas de hibridización tradicionales y también puede ser cuantificable mediante el análisis densitométrico. Una vez hibridizadas las muestras de ADN digerido con la enzima de restricción BamHI

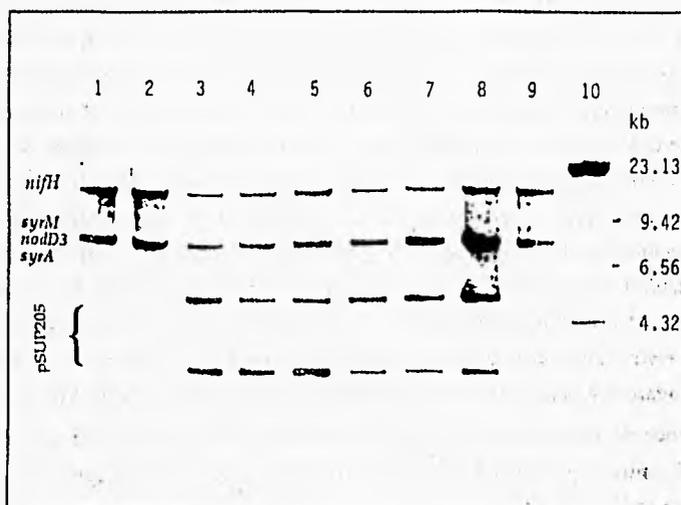


Figura 33. Hibridización de ADN total de *R. meliloti* 41 digerido con la enzima de restricción BamHI. Se utilizó como sonda no radiactiva el producto de PCR *nifH* y el plásmido pSMD3-Tc. En 1 y 2 se observa ADN de la cepa *R. meliloti* AK63t/pNID6; en 3, *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc⁹]; en 4, *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc¹⁰]; en 5, *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc¹⁵]; en 6, *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc²⁰]; 7, *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc³⁰] y en 8, *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc⁵⁰]. En 9 se muestra la hibridización de *syrM* y *nifH* en ADN total de la cepa silvestre *R. meliloti* 41 y en 10 el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III.

A

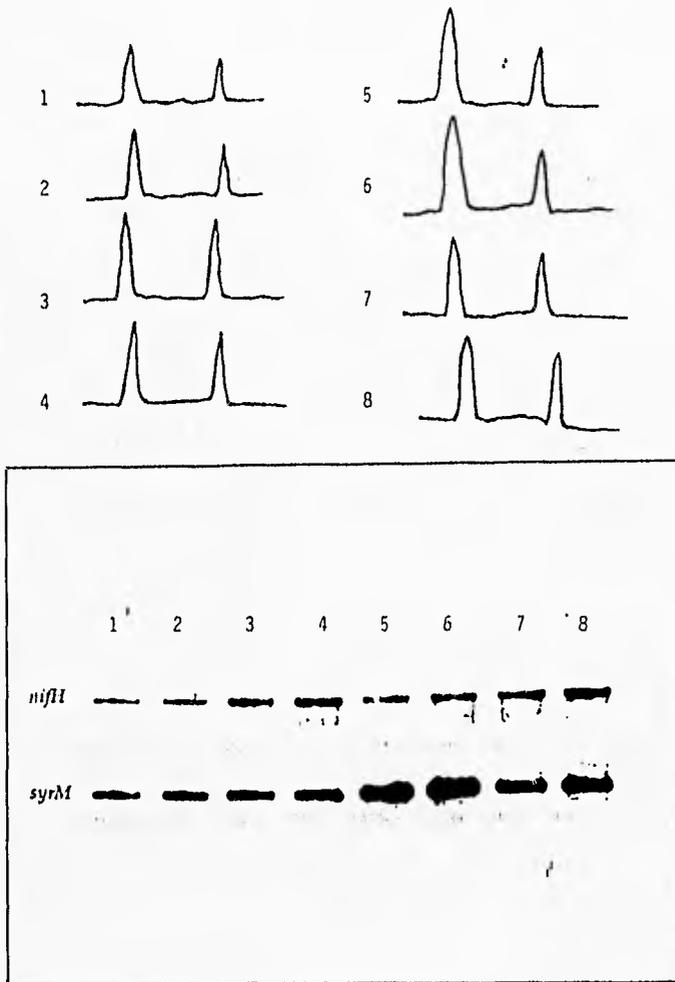


Figura 34. Hibridación de ADN total de cepas de *R. meliloti* 41 seleccionadas en diferentes concentraciones de Tc para obtener amplificaciones en los genes *syrM-modD3-syrA*. ADN digerido con la enzima de restricción BamHI. Las sondas no radiactivas utilizadas fueron los productos de PCR *nifH* y *syrM*.

A. Se muestra ADN de las cepas *R. meliloti* 41 (1 - 4) seleccionada con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ácido nalidíxico y *R. meliloti* AK631/pNID6 (5 - 8) seleccionada con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tetraciclina. De izquierda a derecha se colocaron 5, 10, 15 y 20 μl de ADN digerido respectivamente para cada cepa. Arriba, análisis densitométrico de cada muestra de hibridación. El pico de la izquierda para cada gráfica corresponde a la señal que revela el número de copias del gen *syrM* mientras que el pico de la derecha corresponde a la señal que revela el gen *nifH* como copia única en el genoma. La numeración se respeta para cada caso.

B

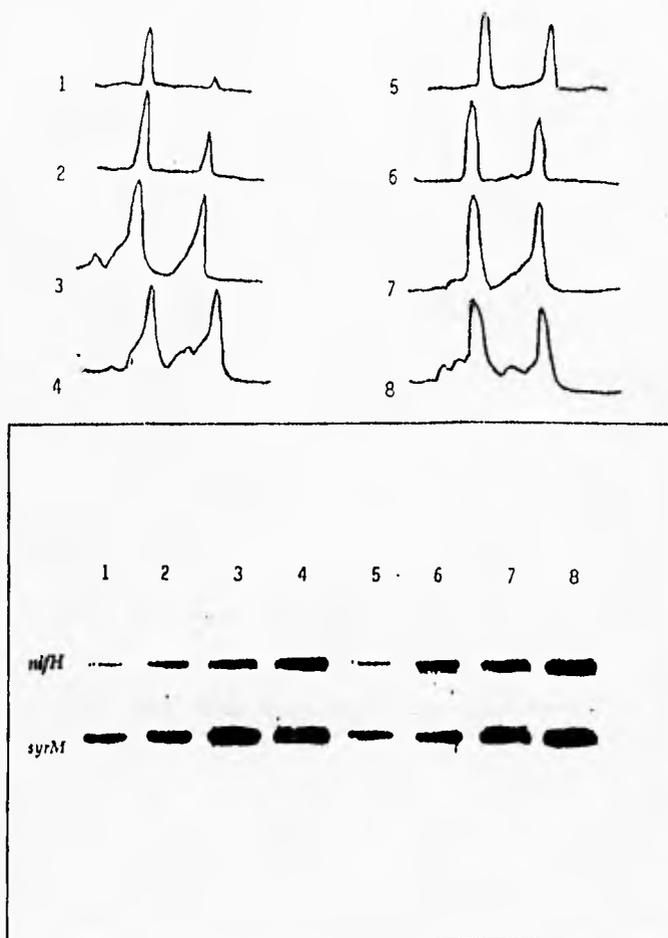
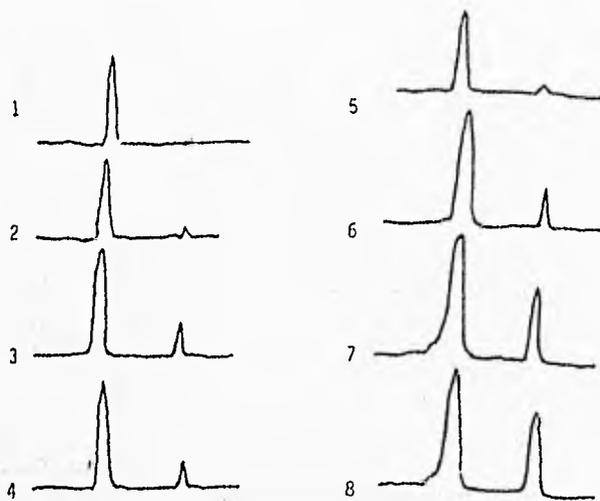


Figura 34 B. Se muestra ADN de las cepas amplificadas *R. meliloti* Δ 1::pSMD3-Tc [Tc³] (1 - 4) seleccionada con 5 μ g/ml de Tetraciclina y *R. meliloti* Δ 1::pSMD3-Tc [Tc¹⁰] (5 - 8) seleccionada con 10 μ g/ml de Tetraciclina. De izquierda a derecha se colocaron 5, 10, 15 y 20 μ l de ADN digerido respectivamente para cada cepa. El pico de la izquierda para cada gráfica corresponde a la señal que revela el número de copias del gen *syrM* mientras que el pico de la derecha corresponde a la señal que revela el gen *nifH* como copia única en el genoma. La numeración se respeta para cada caso.



D

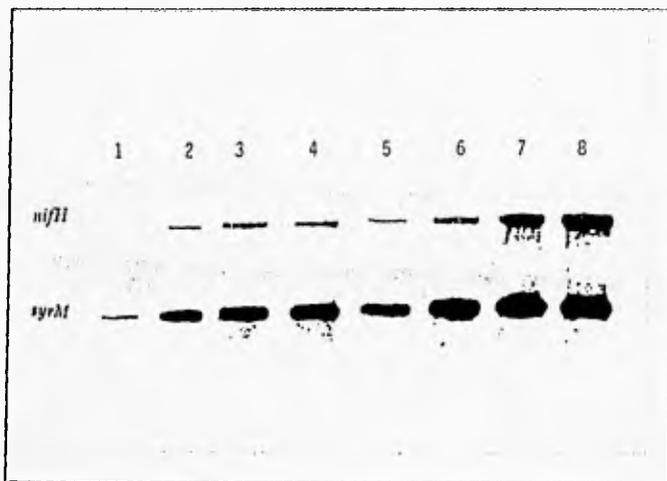


Figura 34 D. Se muestra ADN de las cepas amplificadas *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc³⁰] (1 - 4) seleccionada con 30 µg/ml de Tetraciclina y *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc⁵⁰] (5 - 8) seleccionada con 50 µg/ml de Tetraciclina. De izquierda a derecha se colocaron 5, 10, 15 y 20 µl de ADN digerido respectivamente para cada cepa. El pico de la izquierda para cada gráfica corresponde a la señal que revela el número de copias del gen *syrM* mientras que el pico de la derecha corresponde a la señal que revela el gen *nifH* como copia única en el genoma. La numeración se respeta para cada caso.

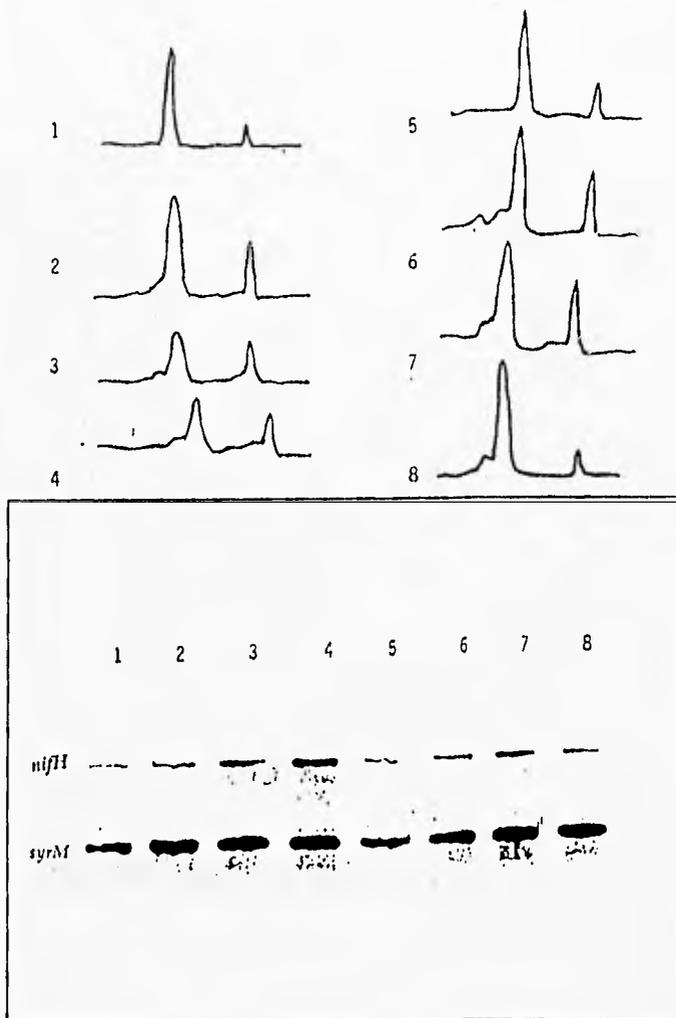


Figura 34 C. Se muestra ADN de las cepas amplificadas *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc¹⁵] (1 - 4) seleccionada con 15 µg/ml de Tetraciclina y *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc [Tc²⁰] (5 - 8) seleccionada con 20 µg/ml de Tetraciclina. De izquierda a derecha se colocaron 5, 10, 15 y 20 µl de ADN digerido respectivamente para cada cepa. El pico de la izquierda para cada gráfica corresponde a la señal que revela el número de copias del gen *syrM* mientras que el pico de la derecha corresponde a la señal que revela el gen *nifH* como copia única en el genoma. La numeración se respeta para cada caso.

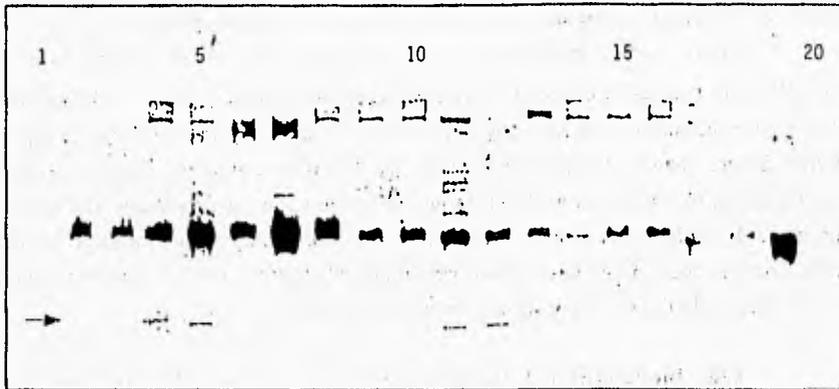


Figura 35. Hibridación del pSym- α contra la sonda no radiactiva pSUP205 en tres cepas amplificadas de *R. meliloti* 41::pSMD3-Tc. Gel tipo Eckhardt. En ambos extremos (1 y 20) se colocó como control *R. meliloti* 41 y no se revela señal alguna de la presencia del vector integrativo pSUP205. En (2 - 7), (8 - 14) y (15 - 19) se muestran las hibridaciones para las tres diferentes cepas seleccionadas para amplificación. En cada caso se muestran selecciones en Tc⁵, Tc¹⁰, Tc¹⁵, Tc²⁰, Tc³⁰ y Tc⁵⁰ respectivamente. La flecha indica la presencia -en ciertas cepas- de recircularizaciones de fragmentos de ADN con el vector pSUP205 (4 [Tc¹⁵], 5 [Tc²⁰], 11 [Tc²⁰] y 12 [Tc³⁰]). Curiosamente las cuatro bandas observadas son del mismo tamaño.

utilizando como sondas no radiactivas los productos de PCR *syrM* y *nifH* se analizaron densitométricamente las intensidades de las bandas obtenidas como una medida indirecta del número de copias existente en la región amplificada -*syrM-nodD3-syrA*- con respecto a un gen que se encuentra como una sola copia en el genoma -*nifH*-. Los resultados obtenidos de este análisis densitométrico mediante la integración gaussiana de cada pico obtenido (figuras 34 A-D) se muestran en la Tabla V. Como se puede observar en esta tabla, en general la cepa silvestre *R. meliloti* 41 (Rm 41) tiene una copia del gene *syrM* por una copia del gen *nifH* (relación 1:1) y los valores se compararon entre las cepas amplificadas. La cepa *R. meliloti* AK631 con el plásmido multicopia pNID6 muestra en promedio para la misma relación (*syrM/nifH*) una proporción de 2 copias de *syrM* respecto a *nifH*. Los reportes indican que el plásmido pNID6 se halla en multicopia a un orden de 4 a 6 copias -plásmidos- por genoma (Kondorosi, E. et.al. 1991a).

En las cepas amplificadas se puede notar que en general el nivel de amplificación fue bajo. La selección en medios de cultivo con 5, 10, 15 y 20 µg/ml de Tetraciclina muestran cepas con poca amplificación de la región cointegrada (2 a 3 copias). Sin embargo, cuando se seleccionan cepas en Tc³⁰ parece subir un poco el nivel de amplificación (4 a 6 copias en Tc³⁰). Como se puede notar, la proporción del número probable de copias no se mantiene entre las cuatro diferentes concentraciones de ADN analizadas, es decir, no se observa una proporcionalidad directa entre la concentración de Tetraciclina y el número de copias de la región estudiada.

VI.6. Inestabilidad de la zona amplificada. Se seleccionaron tres cepas amplificadas para visualizar su patrón plasmídico en un gel tipo Eckhardt y se hibridizó con el plásmido pSUP205 como sonda. El perfil de hibridización muestra que algunas colonias experimentaron rearrreglos genómicos con la liberación de fragmentos de ADN que portan el plásmido vector pSUP205. Particularmente se observan recircularizaciones en las cepas seleccionadas en Tc¹⁵ y Tc²⁰ (figura 35). Como se comentó anteriormente, las secuencias repetidas suponen estados altamente reactivos que pueden manifestarse como deleciones o deamplificaciones.

TABLA V
 Cuantificación densitométrica del número de copias de *syrM* respecto a la *nifH* de *R. meliloti* 41[®]. Se muestran datos para diferentes concentraciones de ADN hibridizado contra las sondas no radiactivas *syrM* y *nifH*.

Volúmen de ADN (μl)	Rm 41	Rm AK631/pNID6	Rm 41::pSMD3-Tc					
			[Tc ⁵]	[Tc ¹⁰]	[Tc ¹⁵]	[Tc ²⁰]	[Tc ³⁰]	[Tc ⁵⁰]
5	1.9	1.8	3.8*	0.7	5.0*	2.7*	—	9.7*
10	1.8	1.8	1.6	0.9	2.5	0.6	8.7*	3.5
15	1.4	1.6	1.3	1.0	1.9	2.2	4.3	2.2
20	1.3	1.6	1.0	1.3	1.8	8.4*	6.7	2.0
Número promedio de copias de la secuencia <i>syrM-nodD3-syrA</i>.	1	2	2	2	2a3	2	4a6	2a3

* Valor poco confiable

— Valor no calculado

[®] Los valores numéricos corresponden a las proporciones que guardan entre sí las áreas bajo la curva de cada banda hibridizante y que son la razón entre el número de copias de los genes *syrM-nodD3-syrA* sobre el número de copias de *nifH* (1:1) en la cepa silvestre Rm41.

VII. DISCUSIÓN.

La amplificación genética es un fenómeno que ha sido observado y descrito en procariotas, levaduras, *Drosophila* y vertebrados (Stark, G.R. y Wahl, G.M. 1984). Para que el proceso de amplificación pueda ser llevado a cabo es necesaria la presencia previa de una duplicación, lo cual presupone una situación inestable altamente reactiva en términos de recombinación genética. La recombinación homóloga, entre las secuencias duplicadas, tiene como resultado la pérdida de la duplicación o bien la amplificación posterior del segmento de ADN (Anderson, R.P. y Roth, J.R. 1977). Como ya se dijo, las regiones en cada extremo, repetidas y en orientación directa, participan en fenómenos recombinatorios que se pueden manifestar como la amplificación de tales secuencias del ADN. Estas estructuras pueden experimentar eventos recombinatorios posteriores incrementando el nivel de amplificación pero también pueden ser deletadas (Flores, M. et.al. 1993; Palacios, R. et.al. 1993).

La estrategia genética utilizada en este estudio constituye un enfoque directo para manipular el genoma y seleccionar amplificación génica de un fragmento de ADN de *R. meliloti* 41 que entre otras cosas porta los genes regulatorios *syrM-nodD3-syrA*. La construcción de un plásmido que tuviese un origen de duplicación ajeno a la maquinaria duplicativa de *Rhizobium* y que portara los genes de interés -pSMD3-Tc- permitió seleccionar aquellas colonias que habían cointegrado, mediante un mecanismo de recombinación homóloga, este vector en el genoma. Como marcador se utilizó un fenotipo seleccionable que en este caso fue la resistencia al antibiótico Tetraciclina. De esta manera fue posible aislar cepas merodiploides (duplicadas en la secuencia *syrM-nodD3-syrA*) de la población. En este punto se contó ya con células de *R. meliloti* merodiploides para el fragmento de interés con los genes *syrM-nodD3-syrA*, es decir con las secuencias duplicadas que hipotéticamente se seleccionan en Tc⁵.

En teoría, las cepas merodiploides para un gen particular producen aproximadamente dos veces la cantidad de producto génico (Anderson, R.P. y Roth, J.R. 1977). Una vez confirmada la cointegración de este plásmido, se tuvo como meta amplificar las unidades duplicadas dentro del genoma de *R. meliloti* 41. Si existen las condiciones adecuadas de selección, las cepas que porten amplificaciones sucesivas pueden aislarse de la población merodiploide. Para conseguirlo se seleccionaron fenómenos de amplificación mediante el incremento de la dosis de Tetraciclina. Dentro de toda la población merodiploide (duplicada en los genes regulatorios *syrM-nodD3-syrA*) surgieron algunas células que habían ido más allá de la mera cointegración y

amplificaron las secuencias homólogas; como consecuencia, tenían más copias del gen de resistencia a Tc.

En una población celular, aquellas bacterias que porten amplificaciones en su genoma crecerán más lentamente y continuarán manteniendo las secuencias amplificadas hasta cierto número de copias, según la estabilidad de las secuencias amplificadas en las líneas celulares subclonadas (Anderson, R.P. y Roth, J.R. 1977). De esta manera se consiguió obtener cepas que crecieron hasta concentraciones de Tc⁵⁰ y que conforme se incrementaron las dosis del antibiótico tardaban más en crecer.

La frecuencia de amplificación es función de la estabilidad de las unidades amplificadas. En este sentido, la dosis genética incrementada confiere a las células mayor adecuación ante un medio donde la concentración de antibiótico Tetraciclina es el factor limitante para la sobrevivencia de toda la población, lo que permite que esa parte de la población sea aislada y caracterizada.

Así, aumentan la proporción de bacterias con rearrreglos genómicos de tipo amplificación dentro de la población. Por otra parte, en ausencia de presiones selectivas, sería innecesario mantener copias extra de los genes amplificados, esto permite que ciertos fenómenos de segregación puedan regenerar una población predominantemente haploide. En este sentido, es de particular interés hacer notar que la zona amplificada con los genes regulatorios de nodulación *syrM-nodD3-syrA*, resultó ser en algunas cepas estudiadas inestable, fenómeno que fue observado por la presencia de posibles recircularizaciones que incluyeron la secuencia del vector de clonación pSUP205 (figura 35). Esta observación reconfirmó la naturaleza inestable de las secuencias reiteradas.

La naturaleza precisa del locus amplificado no ha sido bien determinada. En estos experimentos el locus coamplificado fue un fragmento BamHI de ± 7.2 kb que porta al menos tres genes regulatorios del regulón *nod* de *R. meliloti* 41: *syrM-nodD3-syrA* pero que indudablemente acarrea otras secuencias de ADN que no corresponden a los tres genes. De este modo no es fácil atribuir exactamente a cualquiera de estos genes los efectos que se observan al seleccionar fenómenos de amplificación. Una estrategia de manipulación génica mucho más fina sería sintetizar exactamente con PCR cada gen, respetando regiones regulatorias y clonarlo en vectores tipo integrativo.

El mecanismo molecular preciso de integración del plásmido pSMD3-Tc a *Rhizobium* no ha sido completamente establecido, sin embargo el vector de integración eventualmente se estableció entre las dos copias de este locus que facilitó la integración y como consecuencia se produjeron dos copias en orientación repetida directa, lo cual apoya el modelo propuesto por Campbell. De este modo, la introducción de los genes

syrM-nodD3-syrA en el genoma de *R. meliloti* 41 condujo a la duplicación de tal región y subsecuentemente a la selección de cepas amplificadas aislando colonias resistentes a Tc.

Por otra parte, los patrones de hibridización que se obtuvieron establecen que las copias del pSMD3-Tc comprenden un arreglo repetido dentro de una sola localización dentro del pSym- α . El segmento total de ADN que integra la Unidad de Amplificación (AUD) es de aproximadamente 23 kb. Sin embargo, el nivel de amplificación obtenido es bajo (2 a 3 copias) en las cepas seleccionadas en medios de cultivo con Tc⁵ - Tc²⁰ y hasta de 3 a 4 copias en las cepas seleccionadas en Tc⁵⁰ (Tabla V). Estos resultados deben tomarse con cuidado para su interpretación ya que pudiesen estar involucradas ciertas variables en la medición del número de copias de la región *syrM-nodD3-syrA*. Otros elementos podrían estar influyendo en las observaciones descritas.

Por una parte esta cuantificación depende de la calidad de la hibridización y del sistema de detección de los fragmentos estudiados. Al parecer, el sistema de hibridización no radiactiva ECL tiene un nivel de saturación, al momento de la detección, de tal manera que no parece responder de forma lineal la señal que se observa en la placa fotográfica con respecto a la cantidad real de ADN hibridizado. En este trabajo se emplearon ambas técnicas: hibridización tipo ECL e hibridización radiactiva. Para el segundo caso se observaron resultados similares, un escaso nivel de amplificación (datos no mostrados).

Por otra parte, el sistema de detección por densitometría es una técnica muy indirecta. En este trabajo se reportan en general de dos a tres copias de los genes *syrM-nodD3-syrA* en *R. meliloti* 41 pero debe tenerse presente que aún falta controlar más finamente la selección, detección y cuantificación de las amplificaciones *in situ*.

Los resultados mostrados aquí incluyen la construcción y cointegración del vector integrativo pSMD3-Tc en el genoma de *R. meliloti* 41 a nivel de los genes *syrM-nodD3-syrA* con niveles de amplificación bajos al seleccionar cepas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Tetraciclina. Esto podría indicar que dentro de toda la población existen células que pueden resistir Tc con un bajo número de copias del gen de resistencia 1/0 que las secuencias amplificadas en esta región son, como ya se dijo, hasta cierto punto inestables. Esta situación no permite la selección de cepas con una marcada diferencia en el número de copias que sea directamente proporcional a la dosis de antibiótico con la cual son seleccionadas. Asimismo, es posible que haya sido suficiente el bajo número de copias del gen de resistencia a Tc que fue clonado.

Además de los factores externos, ajenos al organismo y que son resultado de la manipulación experimental, existen ciertos factores biológicos que pueden afectar los niveles de amplificación genética ante determinadas situaciones. Es probable que el

número de copias no se pudo manipular tan finamente con la dosis del antibiótico debido quizás a un mecanismo de resistencia alternativo o simplemente como efecto de la inestabilidad de toda la región cointegrada. Los plásmidos en multicopia con los genes regulatorios *syrM-nodD3-syrA* -plásmido pNID6 en *R. meliloti* AK631- son tal vez más estables en el genoma de *R. meliloti* con respecto al mismo fragmento cointegrado al genoma de *R. meliloti* 41 por ser intrínsecamente más inestable y deletéreos para la célula bacteriana por alguna otra razón.

Los rearrreglos del material genético pueden reflejar en ocasiones contraselección, que reduce la expresión de los genes coamplificados codificantes para proteínas que son deletéreas en grandes cantidades (Stark, G.R. y Wahl, G.M. 1984). Es posible que las proteínas SyrM, SyrA y NodD3 producidas en grandes cantidades resulten tener un efecto inhibitorio en la estabilidad del genoma de *R. meliloti* 41. El análisis genético del efecto de las amplificaciones de los genes regulatorios *syrM-nodD3-syrA* sugiere la abundancia de la proteína NodD3 debido al incremento en la dosis génica de su regulador positivo *syrM*, así como el efecto de la autoregulación positiva del gen *nodD3* amplificado. La sobreexpresión, particularmente del gen *nodD3* podría ocasionar la pérdida de regulación en respuesta a nitrógeno combinado. La expresión de *nodD3* es controlada por altas concentraciones de amonio y la sobreexpresión de *nodD3* podría resultar en la expresión de los operones *nod* en presencia de fuentes de nitrógeno, situación que no sucede naturalmente y esto se traduciría en la formación de nódulos en plantas que crecen en suelos ricos en nitrógeno.

Se sabe que *syrM* puede regular coordinadamente la síntesis de exopolisacáridos y factores-Nod, que participan, ambos, en el proceso infectivo (Dénarié, J., et.al. 1992). *syrM* actúa en *trans* estimulando la expresión de los genes *nod* vía *nodD3* y los genes *exo* vía *syrA* (Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989). La amplificación de los genes *syrM-nodD3-syrA* pudo haber influido en la sobreexpresión de los genes *exo* vía una sobreproducción de las proteínas SyrM y SyrA. Un fenómeno de esta naturaleza pudo haber ocasionado un aumento en la biosíntesis de exopolisacáridos capsulares y como consecuencia tuvieron un efecto en la pérdida de permeabilidad de la membrana celular, y así constituyeron un mecanismo de defensa físico capaz de resistir los efectos nocivos de la Tetraciclina. Los genes *exo* de *R. meliloti* se encuentran físicamente en el megaplásmido simbiótico p-Sym β , así como en el cromosoma y codifican para proteínas que participan en la biosíntesis de succinoglicano (SanJuan, J. et.al. 1992). *R. meliloti* tiene un grupo de 13 genes en el megaplásmido p-Sym β y algunos otros en el cromosoma (Gray, J.X. et.al. 1991).

Se han estudiado los mecanismos de resistencia a Tetraciclina en diversas líneas celulares y todas comparten una característica común: portan un gen que participa en la alteración de la permeabilidad de la membrana a este compuesto químico. Incluso se sabe que la Tetraciclina es transportada al citosol de *E. coli* por un mecanismo dependiente de la energía de Mg^{2+} (Kaji, A y Ryoji, M. 1979).

Es posible así, que la sobreexpresión de los genes *syrM* y *syrA* en estado duplicado hayan modificado la permeabilidad membranal a la Tetraciclina vía la actividad de los genes *exo*, lo que constituye así un mecanismo de resistencia independiente de la amplificación genética *per se*. Sin embargo es probable que durante las primeras etapas de amplificación (estado merodiploide de duplicación) las células hayan resistido a Tc debido a la actividad del gene Tc^R clonado pero que a la par fue siendo sustituida por la pérdida de permeabilidad a Tc, producto de los genes *exo*. De esta manera llegó un momento en el que no fue necesario contar con sobreexpresión del gene de resistencia a Tc. Esto explicaría en parte los resultados observados sobre el escaso nivel de amplificación posterior a la etapa cointegrativa del plásmido pSMD3-Tc. Sin embargo, no queda descartada la posibilidad de que existan también otras vías alternativas que no incluyen amplificación genética y que conduzcan a la resistencia al antibiótico Tc (v.gr.: mutación en los ribosomas).

VII.1. Algunas aplicaciones de la amplificación genética. Actualmente muchos microorganismos son utilizados comúnmente para la producción a escala industrial de ciertos compuestos de interés y ellos cuentan con secuencias de ADN amplificado dentro de sus genomas, como resultado de ciclos repetidos de selección. En el caso de nuestro modelo de estudio (*R. meliloti*), es de particular interés el diseñar cepas que cuenten con ciertos genes amplificados que participan en la extensión del espectro de hospederos, en una tasa de fijación biológica de nitrógeno más alta y en la asimilación de compuestos nitrogenados por parte de la planta.

Es posible incorporar casi cualquier gen clonado en un vector de tipo suicida y obtener por recombinación homóloga una Unidad de ADN Amplificable en el genoma del organismo utilizado y coamplificar tanto el gen deseado como el vector mismo, como una parte integral de la AUD.

Es de particular interés examinar la relación existente entre el número de copias del(los) gen(es) clonado(s) y la cantidad de producto genético sintetizado en cepas manipuladas por esta vía. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la amplificación genética es particularmente inestable y hace a las cepas susceptibles a "degenerar" (v.gr.:

perdida irreversible de características favorables). Este "degeneración" puede ser la consecuencia fenotípica de la inestabilidad genética. La solución a estos problemas continúa en discusión.

Sin embargo, pueden proponerse ciertas alternativas para resolver estos problemas. Por ejemplo, si un gen biosintético esencial fuertemente expresado y requerido para alguna ruta metabólica particular es incorporado como una AUD bajo el control de un promotor "débil", entonces la selección para mantener la AUD a un alto número de copias puede ser posible en cepas que hayan deletado el gene. En este tipo de construcción se podría clonar a su vez el gen de interés y coamplificarlo para la sobreproducción de algún metabolito. Otra posibilidad que resultaría de interés es diseñar cepas en las cuales los segmentos del ADN amplificado se encuentren localizados en diferentes posiciones dentro del genoma.

VII.2. Perspectivas a futuro. Este estudio permitió introducir mediante cointegración de un plásmido suicida en *R. meliloti* 41 un fragmento de 7.2 kb que porta los genes regulatorios de nodulación *syrM-nodD3-syrA* dentro del megaplásmido simbiótico pSym- α como un primer enfoque de manipulación del genoma bacteriano.

Es evidente que resultaría de gran interés evaluar experimentalmente el efecto real de el empleo de estas cepas con diferentes niveles de amplificación en simbiosis. Para ello se propone un proyecto de investigación que cumpla con diferentes objetivos:

- i) Utilizar como vector(es) de clonación otros plásmidos con diferentes resistencias a antibióticos o algún otro agente de selección (v.gr.: resistencia a metales pesados).
- ii) Diseñar plásmidos integrativos con genes funcionales clonados, bien determinados (sólo marcos de lectura abierta con sus regiones regulatorias).
- iii) Diseñar plásmidos integrativos con regiones clonadas de función desconocida hasta la fecha (brechas de secuencia) y amplificar tal región.
- iv) Perfeccionar la estrategia de selección de amplificaciones.
- v) Perfeccionar la cuantificación del número de copias por genoma.
- vi) Estudiar la producción de factores de Nodulación de las cepas amplificadas.
- vii) Estudiar el efecto de utilizar estas cepas amplificadas para nodulación de alfalfa.
- viii) Probar cepas amplificadas para establecer simbiosis con diferentes hospederos.
- ix) Estudiar competitividad de cepas amplificadas contra silvestres.
- x) Estudiar el efecto de las amplificaciones *in situ* en la fijación de Nitrógeno.

VIII. CONCLUSIONES.

Los vectores de integración pueden ser usados como poderosas herramientas para el análisis de la genética y la biología de los organismos procariotas. La alta frecuencia de recombinación para crear secuencias duplicadas en orientación repetida directa permite seleccionar fenómenos de amplificación experimentalmente inducida y aislar colonias resistentes al antibiótico de selección. Esto hace de los plásmidos integrativos un sistema atractivo para el estudio de las funciones de genes determinados, así como también permite trabajar con cepas que tengan características relevantes para determinados propósitos. Técnicamente hablando, con estas herramientas se pueden mapear genes, clonarlos, mutagenizar, construir merodiploides y diseñar fusiones génicas.

En este estudio se diseñó el vector de integración pSMD3-Tc que cuenta con las siguientes características: (1) Su origen de duplicación (*colE1*) es ajeno a la maquinaria duplicativa de *R. meliloti* 41 y por tanto se trata de un plásmido 'suicida' en *Rhizobium*, pero puede ser propagado y manipulado en *E. coli*. (2) Este plásmido porta entre otras cosas los genes *syrM-nodD3-syrA* de *R. meliloti* 41 que en total integran un fragmento de ± 7.2 kb y constituyen una secuencia homóloga para el mismo fragmento en la región de nodulación del pSym- α en el genoma de *R. meliloti* 41, dentro del cual puede integrarse vía recombinación homóloga. (3) Asimismo, tiene clonada una región *mob* que facilita la movilización del plásmido desde *E. coli* hasta *R. meliloti* utilizando como auxiliar de transferencia el producto del gen *tra* clonado en el plásmido pRK2013 de *E. coli* HB101. (4) Como lo indica su nombre, el pSMD3-Tc cuenta con un marcador genético que puede ser utilizado para seleccionar cepas de *R. meliloti* 41 resistentes al antibiótico Tetraciclina.

Las cepas que cointegraron el pSMD3-Tc en el pSym- α mostraron posteriormente bajos niveles de amplificación y no fue posible manipular el nivel de amplificación con la dosis de antibiótico Tc. Una hipótesis para explicar estas observaciones es que existe algún otro mecanismo que hace resistentes a Tetraciclina tales cepas y esto podría estar relacionado con la sobreproducción de exopolisacáridos capsulares y la pérdida de la permeabilidad a este compuesto, resultado particular de la amplificación de los genes *syrM-syrA*. Sin embargo, queda todavía mucho por hacer en cuanto al mejoramiento de los sistemas de detección para la cuantificación de los niveles de amplificación *in situ*.

Por otra parte, la estrategia experimental utilizada en este estudio constituye una poderosa herramienta de análisis genético que permite manipular el genoma y sobreexpresar ciertos genes para evaluar las etapas limitantes en la simbiosis *Rhizobium*-planta y hace posible obtener cepas de interés:

TIBS - February 1980



LITERATURA CITADA.

- Albertini, A.M. y Galizzi, A. 1985. Amplification of a Chromosomal Region in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 162: 1203-1211.
- Anderson, R.P. y Roth, J.R. 1977. Tandem genetic duplications in phage and bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 473.
- Ardourel, M., Lortet, G., Mallet, F., Roche, P., Truchet, G., Promé, J.C. y Rosenberg, C. 1995. In *Rhizobium meliloti*, the operon associated with the *nod* box n5 comprises *nodL*, *nodA* and *nodB*, three host-range genes specifically required for the nodulation of particular *Medicago* species. *Mol. Microbiol.* 17: 687-699.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seldman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. 1994. Current Protocols In Molecular Biology. Vol. 3. J. Wiley & sons, Inc. U.S.A.
- Azcón-G. C., Barea, J.M., y Olivarez, J. 1983. Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Recopilación de Investigación y Ciencia por J. M. Barea. *Prensa Científica*, España. 56-65 pp.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., y Kondorosí, A. 1991. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 228: 113-124.
- Baev, N. y Kondorosí, A. 1992. Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti nodL* gene located in locus n5 of the *nod* regulon. *Plant Mol. Biol.* 18: 843-846.
- Begon, M., Harper, J. y Towsand, C.R. 1990. Ecology: Individuals, Populations and Communities. 2nd. ed. Boston, Blackwell Scientific Pub. 945 pp.
- Berg, D.E. 1992. Genomic rearrangements in prokaryotes. GENE rearrangement. BD Hames.
- Bi, X. y Liu, L.F. 1994. *recA*-independent and *recA*-dependent Intramolecular Plasmid Recombination. *J. Mol. Biol.* 235: 414-424.
- Brewin, N.J., Downie, J.A. y Young, J.P.W. 1992. Nodule Formation in Legumes. *En: Encyclopedia of Microbiology*. vol. 3. 239-248.
- Brown, T.A. 1992. Gene Cloning: An Introduction. Chapman & Hall. London. 276 pp.
- Burkardt, B. y Burkardt, H.J. 1984. Visualization and Exact Molecular Weight Determination of a *Rhizobium meliloti* Megaplasmid. *J. Mol. Biol.* 175: 213-218.
- Burrie, R.H. 1991. Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* 266: 9339-9342.
- Cren, M., Kondorosí, A. y Kondorosí, E. 1995. NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* 15: 733-747.
- Debellé, F. y Sharma, S.B. 1986. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucl. Acids Res.* 14: 7453-7472.
- Demont, N., Ardourel, M., Mallet, F., Promé, D., Ferro, M., Promé, J.-C. y Dénarié, J. 1994. The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by (ω -1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO J.* 13: 2139-2149.
- Demont, N., Debellé, F., Aurelle, H., Dénarié, J., y Promé, J. 1993. Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* Genes in the Biosynthesis of Lipo-oligosaccharidic Nodulation Factors. *J. Biol. Chem.* 268: 20134-20142.
- Dénarié, J. y Cullimore, J. 1993. Lipo-Oligosaccharide Nodulation Factors: A Minireview New Class of Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Cell.* 74: 951-954.
- Dénarié, J., Debellé, F., y Rosenberg, C. 1992. Signaling and Host range Variation in Nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 497-531.
- Dilworth, M. y Glenn, A. 1984. How does a legume nodule work? *TIBS.* 9: 519-523.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Hellinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Genetics.* 77: 7347-7351.
- Domargues, Y., Dreyfue, B., Gla Diem, H. y Duhoux, E. 1990. Fijación del Nitrógeno y Agricultura Tropical. *Mundo Científico.* 5: 276-285.
- Dowda, B.C.A., O'Kane, Gormley, E., McConnell, D.J. y Devine, K.M. 1988. Integrating Plasmids in the Genetic Engineering of Bacilli. *En: Recombinant DNA and Bacterial Fermentation.* J. A. Thomson (ed.) CRC Press. Florida, U.S.A. 137-156 pp.
- Duaha, I., Bakos, A. Kondorosí, A. de Bruijn, F.J. y Schell, J. 1989. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen regulated: Isolation of a mutant strain with efficient

- nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 89-96.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*. **1**: 1403-1409.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M. y Long, S.R. 1992. Depolarization of Alfalfa Root Hair Membrane Potential by *Rhizobium meliloti* Nod Factors. *Science*. **256**: 998-1000.
- Elkan, G.H. 1992. Biological Nitrogen Fixation. *En: Encyclopedia of Microbiology*, vol. I. Academic Press, Inc. 285-295.
- Etcheverry, M.T. 1985. Amplification of the Cooper-Chelatin Gene in Yeast. *In: Genome Rearrangement*. M. Simon & I. Herskowitz (eds.). Alan R. Liss, Inc., N.Y. 336 pp.
- Fisher, R.F. y Long, S.R. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. **357**: 655-660.
- Fishman, S.E. y Herashberger, C.L. 1983. Amplified DNA in *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **155**: 459-465.
- Flores, M., Brom, S., Stepkowski, T., Girard, M., Dávila, G., Romero, D., y Palacios, R. 1993. Gene amplification in *Rhizobium*: Identification and *in vivo* cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 4932-4936.
- Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G., y Palacios, R. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* **169**: 5782-5788.
- Flores, M., González, V., Pardo, M.A., Leija, A., Brom, S., Martínez, E., Romero, D., Piñero, D., Dávila, G., y Palacios, R. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **170**: 1191-1196.
- Gibson, A.H. 1990. The Genetics of Nitrogen-Fixing Symbiotic Associations, p. 461-488. *En: Y.P. Abrol* (ed.), Nitrogen in Higher Plants. Research Studies Press LTD. John Wiley & Sons Inc. New York.
- Girard, M. de L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. y Dávila, G. 1991. Structural Complexity of the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *J. Bacteriol.* **173**: 2411-2419.
- Grey, J.X., de Maagd, R.A., Rolfe, B.G., Johnston, A.W.B. y Lugtenberg, J.J. 1991. The Role of the *Rhizobium* Cell Surface During Symbiosis. *En: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. D.P.S. Verma (ed.). CRC, London.
- Györgypal, Z., Iyer, N. y Kondorosí, A. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 85-92.
- Haaker, H. y Veeger, C. 1984. Enzymology of nitrogen fixation. *TIBS*. **9**: 188-192.
- Hill, S. 1992. Physiology of Nitrogen Fixation in Free-Living Heterotrophs. *En: G. Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans* (ed.). Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall. New York.
- Honeycutt, R.J., McClelland, M., y Sobral, B.W.S. 1993. Physical Map of the Genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **175**: 6945-6952.
- Honma, M.A., Asomaning, M. y Ausubel, F.M. 1990. *Rhizobium meliloti nodD* Genes Mediate Host-Specific Activation of *nodABC*. *J. Bacteriol.* **172**: 901-911.
- Howard, J.B. y Rees, D.C. 1994. NITROGENASE: A Nucleotide-Dependent Molecular Switch. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 235-264.
- Kajl, A. y Ryoji, M. 1979. Tetracycline. *En: Antibiotics: Mechanism of Action of Antibacterial Agents*. F.E. Hahn (ed.). vol. I. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, N.Y.
- Kljne, J.W. 1992. The *Rhizobium* Infection Process. *En G. Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans* (ed.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall. New York.
- Klm, J. y Rees, D.C. 1992. Structural Models for Metal Centers in the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein. *Science*. **257**: 1677-1682.
- Kondorosí, A. 1992. Regulation of Nodulation Genes in Rhizobia. *En: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. D.P.S. Verma (ed.). CRC Press. London.
- Kondorosí, E., Gyurfa, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J. y Kondorosí, A. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* **8**: 1331-1340.
- Kondorosí, E., Bulré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B. & Kondorosí, A. 1991a. Involvement of the *symM* and *nodD3* genes of the *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Mol. Microbiol.* **5**: 3035-3048.

- Kondorosí, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Bulré, M., Hoffmann, B., Schell, J. y Kondorosí, A. 1991b. Identification of *NolR*, a Negative Transacting Factor Controlling the *nod* Regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**: 885-896.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1993. Principles of Biochemistry. Worth Publishers. 2nd. ed. 1114 pp.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Mallet, F., Truchet, G., Promé, J.C. y Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**: 781-784.
- Mallet, F., Debellé, F. y Dénarié, J. 1990. Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory gene *nodD3*, and of the common and host-specific *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1975-1984.
- Mancinelli, R.L. 1992. Nitrogen Cycle. *En: Encyclopedia of Microbiology*, vol III. Academic Press, Inc. 229-237 pp.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A laboratory manual. CSH Laboratory. 545 pp.
- Martínez, E., Romero, D. y Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**: 59-93.
- Marsh, J.L., Erbe, M. y Wykes, E.J. 1984. The *pIC* plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by Insertional Inactivation. *Gene*. **32**: 481-485.
- Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989. A Family of Activator Genes Regulates Expression of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. *Genetics*. **122**: 7-18.
- Nep, J.P. y Bisseling, T. 1990. Developmental Biology of a Plant-Prokariote Symbiosis: The Legume Root Nodule. *Science*. **150**: 948-954.
- Orme-Johnson, W.H. 1992. Nitrogenase Structure: Where to Now? *Science*. **257**: 1639-1640.
- Palacios, R., Brom, S., Dávila, G., Flores, M., Girard, M., de L., Romero, D. y Stepkowski, T. 1993. Gene Amplification in *Rhizobium*. *In: New Horizons in nitrogen Fixation*, 581-585. Kluwer Acad. Pub. The Netherlands.
- Peterson, B.C. y Rownd, R.H. 1985. Drug Resistance Gene Amplification of Plasmid NR1 Derivatives with Various Amounts of resistance Determinant DNA. *J. Bacteriol.* **161**: 1042-1048.
- Petes, T.D. y Hill, C.W. 1988. Recombination Between Repeated Genes in Microorganisms. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 147-168.
- Phillips, D.A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 29-49.
- Plazenet, C., Réfrégier, G., Demont, N., Truchet, G. y Rosenberg, C. 1995. The *Rhizobium meliloti* region located downstream of the *nod* box *n6* is involved in the specific nodulation of *Medicago lupulina*. *FEMS Microbiol. Letters*. **133**: 285-291.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Bailado, T., Soberón, G. y Palacios, R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature*. **299**: 724-726.
- van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**: 124-142.
- Rocha, M. y De las Peñas, A. 1990. La fijación del Nitrógeno. *ICyt.* **12**: 78-82.
- Roche, P., Debellé, F., Mallet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J. y Promé, J.-C. 1991. Molecular Basis of Symbiotic Host Specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPD* Genes Encode the Sulfation of Lipo-Oligosaccharide Signals. *Cell*. **67**: 1131-1143.
- Romero, D., Brom, S., Martínez-Salazar, J., Girard, M., Palacios, R., y Dávila, G. 1991. Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2435-2441.
- Romero, D., Martínez-Salazar, J., Girard, M., Brom, S., Dávila, G., Palacios, R., Flores, M., y Rodríguez, C. 1995. Discrete Amplifiable Regions (Amplicons) in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bacteriol.* **177**: 973-980.
- Rostas, K., Kondorosí, E., Horváth, B., Simoncsits, A., y Kondorosí, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 1757-1761.
- Rushing, B.G., Yelton, M.M. y Long, S.R. 1991. Genetic and physical analysis of the *nodD3* region of *Rhizobium meliloti*. *Nucl. Acids Res.* **19**: 921-927.
- SanJuan, J., Luka, S., y Stacey, G. 1992. Genetic maps of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Genetic Maps*. **2**: 136-2.144.
- Schlaman, H.R.M., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1992. Regulation of Nodulation Gene

- Expression by NodD in Rhizobia. *J. Bacteriol.* 174: 5177-5182.
- Schopf, J.W. 1978. The evolution of the earliest cells. *Sc. Am.* 239(2): 110-138.
- Schultze, M., Kondorosí, E., Ratet, P., Bulré, M. y Kondorosí, A. 1994. Cell and Molecular Biology of *Rhizobium*-Plant Interactions. *Internat. Rev. Cyt.* 156: 1-75.
- Schultze, M., Staehelin, C., Röhrling, H., John, M., Schmidt, J., Kondorosí, E., Schell, J. y Kondorosí, A. 1995. *In vitro* sulfoltransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: Lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 2706-2709.
- Schwedock, J.S. y Long, S.R. 1992. *Rhizobium meliloti* Genes Involved in Sulfate Activation: The Two Copies of *nodPQ* and a New Locus, *saa*. *Genetics.* 132: 899-909.
- Simon, A. 1992. An Intimate Look at Nitrogen's Bio-Partner. *Science.* 257: 1624-1625.
- Simon, R., Prieter, U. y Pühler, A. 1983. Vector Plasmids for *in-Vivo* and *In-Vitro* Manipulations of Gram-Negative Bacteria. *En: Molecular Genetics in Bacterial-Plant Interactions.* 98-106.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stark, G.R. y Wahi, G.M. 1984. Gene Amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 447-491.
- Swanson, J.A., Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1993. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics.* 134: 435-444.
- Török, I., Kondorosí, E., Stepkowski, T., Pósfal, J. y Kondorosí, A. 1984. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Nucl. Acids Res.* 12: 9509-9524.
- Truchet, G., Promé, J.-C. y Dénarié, J. 1993. Symbioses Bactéries-Légumineuses: Un Dialogue Moléculaire. *La Recherche.* 24(250): 92-94.
- Vázquez, M., Santana, O. y Quinto, C. 1993. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 52: 134-141.
- Whitten, K.W. y Galley, K.D. 1988. *Química General.* Interamericana, Mex. 893 pp.
- Williams, J.G. y Patient, R.K. 1990. Genetic Engineering. IRL Press, Oxford. 65 pp.
- Young, M. 1984 Gene Amplification in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1613-1620.
- Young, M. y Hranuel, D. 1988. Chromosomal gene Amplification In Gram-Positive Bacteria. *En: Recombinant DNA and Bacterial Fermentation.* J. A. Thomson (ed.) CRC Press, Florida, U.S.A. 157-200 pp.
- Yu, G.-Q., Zhu, J.-B., Gao, Y.-F. y Shen, S.-J. 1994. Further Studies on Structure of *nodD3* Gene in *Rhizobium meliloti*. *Sc. in China.* 37: 975-983.

