

03062
19
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION
DE NITROGENO

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS
PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS DE *Rhizobium etli* EN LA
COMPETENCIA POR LA NODULACION .

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
HILDA VÁZQUEZ LÓPEZ

259485

CUERNAVACA, MOR.

1998

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.

A mis amigos,
a aquellos que confiaron en mi,
pero sobre todo a quienes aún siguen confiando en mi.

A mis sobrinos,
los pequeños del eterno ¿por qué?
quienes alimentan mi curiosidad científica.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Dávila.

A los miembros del comite tutorial por su valiosa contribución en el desarrollo de este trabajo y en mi desarrollo académico. A las Dras Georgina Hernández y Susana Brom a quienes admiro por ser mujeres dedicadas a la investigación científica. (Susy muchas gracias por toda la disposición que mostraste siempre, por facilitarme las cepas y por tu ayuda).

A los miembros del jurado, Dra. Esperanza Martínez, Dra. Valeria Souza, Dra alicia González, Dr. Mario Soberón y Dr. Guillermo Dávila agradezco su disposición para discutir el trabajo. Gracias por su valiosa crítica que contribuyó substancialmente a la calidad de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio por todos los momentos compartidos.

Agradezco infinitamente a mis queridos amigos del laboratorio, porque juntos hemos engendrado este trabajo y lo hemos alimentado con innumerables discusiones en los pasillos.

A mis amigos, por su apoyo moral en los tiempos difíciles.

A mi numerosa familia, gracias por todo.

ANALISIS DE LA PARTICIPACION DE LOS PLASMIDOS SIMBIOTICOS DE *Rhizobium etli* EN LA COMPETENCIA POR LA NODULACION.

La utilización de microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno es una alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados en los sistemas agrícolas. Los rizobia son capaces de interactuar con diversas poblaciones del suelo, contienden con diversas condiciones ambientales, de manera tal que aquellas bacterias que ocupan los nódulos son las que han logrado sobrevivir y competir en la rizosfera, a esta habilidad de dominar en la nodulación se le denomina competencia. La competencia representa una de las limitantes para el éxito del uso de inoculantes dado que la interacción entre los microorganismos del suelo es extremadamente compleja y los micro-habitad varían lo suficiente como para poder establecer generalidades a cerca de la ecología microbiana, es decir la competencia es un evento multifactorial, por tanto complejo.

El establecimiento de una cepa bacteriana en un nicho alterno como lo es el nódulo requiere de múltiples elementos genéticos (genes cromosomales, genes plasmídicos, etc) que en conjunto tiene funciones complementarias que participan en la competencia, por ello este trabajo analiza la participación de el plásmido simbiótico de dos cepas diferentes y sus respectivos fondos genéticos (cromosoma y otros plásmidos).

La estrategia general consiste en transferir el plásmido simbiótico (pSim) de la cepa TAL182 a el fondo genético de CFN42 y de igual forma transferir el pSim de CFN42 al fondo genético de TAL182. Con esta colección de cepas se logró evaluar la capacidad competitiva tanto de los plásmidos como la capacidad competitiva de los fondos genéticos utilizados.

Los resultados obtenidos muestran que el fondo genético de TAL182 provee de mayores ventajas en competencia con respecto al fondo genético de CFN42. El pSim de CFN42 es más competitivo que el pSim de TAL182.

Como conclusión general podemos decir que hay una actividad cooperativa entre los fondos genéticos y los plásmidos simbióticos, aún cuando se encuentran en un fondo genético no propio. Las interacciones plásmido-cromosoma proveen de mayores ventajas en cuanto a competencia y el recambio de estas entidades en suelo puede conducir a tener una amplia gama de cepas con diversas capacidades competitivas.

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno ofrece numerosas ventajas en los sistemas agrícolas, es una alternativa a la aplicación de fertilizantes nitrogenados en cultivos extensivos. Las ventajas que ofrece este sistema son menores costos de fertilización, menor desgaste de suelos, y la reducción de la contaminación de los mantos freáticos, por ello, la liberación de microorganismos fijadores de nitrógeno (*Rizobia*) al ambiente es ya una práctica agrícola usual; y ha dado la oportunidad de ampliar las fronteras en la investigación sobre la fijación biológica de nitrógeno (Sprent y Sprent, 1990).

Los organismos fijadores de nitrógeno son productores de amonio el cual es incorporado por diversas vías a la cadena trófica, de tal forma que su aporte es de beneficio al hombre. Algunos de estos tienen gran importancia ecológica, actuando como colonizadores pioneros en ambientes extremos y/o son un componente importante en algunos ecosistemas forestales, como las cianobacterias, que en su mayoría fijan carbono y nitrógeno en condiciones de vida libre. Las asociaciones simbióticas entre plantas leguminosas con bacterias rizobiáceas han sido ampliamente estudiadas gracias a que algunas de estas plantas son especies de importancia económica (Sprent y Sprent, 1990).

La simbiosis se inicia con la adhesión de una población bacteriana (residente de la rizósfera) a la raíz de la planta hospedera, esta adhesión precede a la nodulación (Smit et al, 1992). La nodulación es el resultado de un diálogo molecular, donde la planta hospedera exuda compuestos (en general flavonoides) que sirven como señales quimioattractoras a las bacterias que se encuentran en la rizósfera; los flavonoides también estimulan la expresión coordinada de genes bacterianos (*nod*, *nol*, *noe*) cuyos productos están involucrados en la síntesis y la excreción del factor de nodulación el cual es específico para cada *Rhizobium* (Fisher y Long, 1992).

El factor de nodulación (cuya estructura básica es la de un lipopolisacárido) actúa como un regulador de crecimiento en la planta, primeramente sobre la epidermis de la raíz induciendo la deformación, enroscamiento y ramificación de los pelos radiculares. El factor de nodulación también está involucrado en la iniciación de la formación de la estructura denominada hilo de infección que le sirve a la bacteria como canal de acceso a la zona central del nódulo (Denarié et al, 1996); el factor de nodulación induce mitosis en células de la corteza interna ó externa (dependiendo del tipo de nódulo que se formará, externa para los nódulos indeterminados, e interna para los nódulos determinados); la respuesta al factor de nodulación también se amplía al tejido vascular del nódulo. Los *Rhizobia* pueden infectar a su huésped por varios mecanismos como son penetración intracelular entre las células de la epidermis y las células corticales o bien a través de los pelos radiculares e hilo de infección (Denarié et al, 1996). A la vez que se desarrolla la estructura de el nódulo, la bacteria penetra hasta el citoplasma de las células corticales donde son envueltas por una membrana derivada de las células del

huésped, denominada membrana peribacteroidal; las bacterias se diferencian a bacteroides. Los bacteroides durante el proceso de diferenciación cambian en su metabolismo que permitirá que sean capaces de reducir nitrógeno atmosférico a amonio.

El amonio producto de la fijación es un compuesto asimilable por la planta hospedera; la bacteria, a su vez recibe fotosintato como fuente de carbono, estableciéndose así un equilibrio simbiótico donde la planta hospedera gana la habilidad de crecer en suelos pobres en nitrógeno, mientras que las bacterias obtienen un nicho alterno donde tiene su propio nitrógeno y una fuente de carbono.

La familia leguminosae comprende tres subfamilias Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, cada una de las cuales contienen géneros capaces de establecer simbiosis con rizobia. En general, se presentan diversos grados de especificidad, algunas plantas pueden ser noduladas por bacterias pertenecientes a diversos taxa y a su vez algunas bacterias son capaces de formar nódulos con plantas de diferentes géneros, algunas de las especies más estudiadas se muestran en la tabla siguiente (van Rhijn y Vanderleyden, 1995).

RHIZOBIUM	PLANTA HOSPEDERA
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus y Trigonella</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus y Lens</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
<i>R. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Rhizobium</i> sp. cepa NGR234	Leguminosas tropicales, <i>Parasponia</i> spp (no leguminosa)
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i> spp., <i>Macroptilium</i> spp.
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis, Galega orientalis</i>
<i>R. fredii</i>	<i>Glycine max, G. soja</i> y otras leguminosas
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max, G. soja</i> y otras leguminosas
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max, G. soja</i> y otras leguminosas
<i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa Parasponia	<i>Parasponia</i> spp.
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp (nodula tallo)

En general cuando dos grupos de organismos (huésped-parásito, hospedero-simbionte), evolucionan y se especian juntos, se presupone que sus filogenias son paralelas, sin embargo, en el caso de los rizobia, el fenómeno es mucho más complejo, ya que algunas de las plantas son hospederos para más de una especie o género de microsimbionte y algunos microsimbiontes son promiscuos y su especificidad se amplía a plantas de diferentes familias (como se ejemplificó anteriormente); por ello es difícil hacer alguna correlación filogenética directa. Sin embargo, se han establecido relaciones filogenéticas entre genes plasmídicos (*nodABC*) y leghemoglobinas de plantas, la correlación que describe este estudio se pierde cuando se usan para la comparación genes del cromosoma de las bacterias (Ueda, et al. 1995). Se postula que esta incongruencia se debe a que la bacteria no es un simbiote estricto y puede sobrevivir en condiciones de vida libre, esto le confirió la posibilidad de tener diferentes plantas huésped y por lo tanto aumentar o disminuir su especificidad (Young y Johnston, 1989).

Las interacciones entre los microorganismos del suelo son extremadamente complejas, los micro-hábitat varían lo suficiente como para no poder establecer generalidades acerca de la ecología microbiana (Triplett y Sadowsky, 1992). Las bacterias de *Rhizobium* presentes en el suelo son capaces de interactuar con diversas poblaciones, y contienden con numerosas condiciones ambientales, mientras que aquellas bacterias que son capaces de ocupar un nódulo son las que han logrado sobrevivir y competir en la rizósfera; a esta habilidad de dominar en la nodulación se le llama competencia y representa una de las limitantes para el éxito en el uso de inoculantes.

El problema agronómico de la competencia radica en que las poblaciones nativas de rizobia presentes en el suelo están bien adaptadas a su nicho y generalmente ocupan los nódulos desplazando a las cepas inoculadas, estableciendo diversas jerarquías en la ocupación de los nódulos (Young y Johnston, 1989; Triplett y Sadowsky, 1992; Maier y Triplett, 1996). La capacidad de proveer la sobrevivencia y competencia de los microorganismos benéficos es crucial para resolver importantes problemas agrícolas (Triplett y Sadowsky, 1992)

Tanto las plantas como los microorganismos utilizan al suelo no sólo como un soporte, sino también como una fuente de nutrientes. De esta forma, no es sorprendente pensar que las características que afectan al suelo también influenciarán la sobrevivencia y competencia tanto de las poblaciones bacterianas nativas como de las introducidas, y la supervivencia misma de las plantas. La competencia por la nodulación depende de muchos factores dentro de estos factores como: pH, temperatura, salinidad, concentración de nitratos, de calcio o de fosfatos, la presencia de herbicidas y/o pesticidas, la densidad de otras poblaciones tanto bacterianas como de protozoarios, la presencia de bacteriófagos, bacteriocinas y las condiciones de la planta hospedera. Los rizobia presentes en el suelo utilizan diferentes estrategias que les permiten competir, tales como: alta afinidad de adhesión a la raíz e iniciación temprana de la nodulación, mediadas por adhesión, quimiotaxis y la producción de toxinas (Dowling y Broughton, 1986; Toro, 1996).

Debido a su complejidad, el problema de la competencia se ha abordado de diversas maneras. Algunos estudios han demostrado que las cepas nativas pueden ser desplazadas cuando se hacen inoculaciones con altas dosis de *Rhizobium*, así se ha logrado abatir la ocupación de nódulos por las cepas nativas y se observado que usualmente no hay permanencia de las poblaciones introducidas y deben ser constantemente reinoculadas (Dowling y Broughton, 1986; Streeter, 1994; Triplett y Sadowsky, 1992).

Se han explorado diversos genes bacterianos involucrados en competencia, algunos *loci* que confieren mayor eficacia en la nodulación, como son genes de eficiencia en la formación de nódulos (nodule formation efficiency *nfe*, Soto et al, 1993; Soto et al. 1994), producción de bacteriocinas, degradación de toxinas (Toro, 1996) y genes para la utilización de prolina (Jiménez-Zurdo et al. 1995); o bien también *loci* que permiten el crecimiento en rizósferas preferenciales donde se producen rizopinas (Toro, 1996). Los esfuerzos para la caracterización de los genes involucrados en la competencia por la nodulación están encaminados a mejorar la efectividad de los inóculos utilizados en los sistemas agrícolas.

Se ha observado que cambios fenotípicos en la motilidad, la producción de polisacáridos extracelulares y en las características de hidrofobicidad de algunas cepas, provocan deficiencias en la formación de nódulos (Araujo et al, 1994; Bittinger et al, 1997; Maier y Triplett, 1996).

Otra de las estrategias exploradas en la competencia es la construcción de cepas bacterianas con rangos de hospedero alterados; los genes "genotipo-específicos de nodulación" son secuencias bacterianas que permiten nodular cultivares específicos de plantas. La eficiencia de estos fenotipos no ha sido evaluada en campo y por ello no se conoce el comportamiento de estas cepas con respecto a las cepas nativas (Triplett y Sadowsky, 1992).

El uso de inhibidores de la inducción de los genes *nod* para regular la ocupación de nódulos también ha sido una propuesta evaluada recientemente, se utilizan cepas flavona-independientes que producen factor de nodulación aún en presencia del inhibidor de la nodulación y de esta forma se puede desplazar a las poblaciones nativas (Triplett, 1990).

Rhizobium etli es capaz de establecerse en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. La organización genética de estas bacterias se caracteriza por la presencia de un cromosoma y varios plásmidos de alto peso molecular. El genoma simbiótico está contenido en uno de los plásmidos de alto peso molecular denominado plásmido simbiótico (Martínez et al, 1990). El análisis de la diversidad genética de *Rhizobium etli* muestra que es una especie que posee un alto nivel de diversidad genética (Piñero, 1988 y Souza et al, 1994)

Se han evaluado la participación en competencia de plásmidos (simbióticos y no-simbióticos) y cromosoma. Este análisis ha demostrado que una cepa al ser curada de la mayoría de los plásmidos, presenta una disminución en su capacidad de competencia con respecto a la cepa de tipo silvestre, además la pérdida de esta capacidad es aditiva con respecto al número de plásmidos curados (Brom et

al,1992). Bajo otra estrategia de evaluación (manipulando cuatro diferentes plásmidos introducidos sobre tres cepas receptoras), se encontró que los plásmidos simbióticos y los cromosomas pueden tener influencia en competencia (Brewin et al, 1983).

Las bacterias del suelo comúnmente cuentan con elementos genéticos accesorios, tales como plásmidos, fagos (profagos) y transposones. En algunas ocasiones, estos elementos confieren a las poblaciones bacterianas la habilidad de competir y colonizar un nicho ecológico, proveyéndolas de los genes responsables de diversas características adaptativas; estos elementos accesorios son normalmente transferibles y de esta forma se dispersan en las poblaciones bacterianas.

El mantenimiento de estos elementos accesorios se puede explicar o como un parasitismo molecular, sin embargo, cualquiera que sea el mecanismo de mantenimiento de estos elementos genéticos accesorios, podemos decir que la selección a favor de las bacterias que los portan reduce el costo de su mantenimiento e inicia lo que se pudiera llamar simbiosis genética (Levin, 1993). Otro ejemplo de interacción entre cromosomas y otros elementos genéticos son los que existen en eucariontes, donde interactúan diversos tipos de genomas que permanecen en una célula, estos pueden generar funciones celulares complejas, como es el caso de la interacción entre el genoma mitocondrial y el genoma nuclear que colaboran para complementar las funciones respiratorias en células eucarióticas (Poyton y Mc Ewen, 1996).

El establecimiento de una cepa bacteriana en un nicho alterno como lo es el nódulo, requiere de múltiples elementos genéticos (genes cromosomales, plasmídicos, etc.), cada uno de ellos puede contener funciones complementarias para poder realizar un proceso complejo, como lo es la competencia, por ello este trabajo propone el análisis de alguno de los plásmidos simbióticos.

OBJETIVOS

Determinar el grado de participación del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* en la competitividad para la formación de nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- I. Determinar la cinética de nodulación y la capacidad de competencia de diversas cepas silvestres.
- III. Evaluar la capacidad competitiva de los plásmidos simbióticos de CFN42 y TAL182 sobre el fondo genético común de *Agrobacterium* (GMI9023).
- IV. Evaluar la capacidad de competencia de cada plásmido sobre un fondo genético *R. etli* alternativo.
- V. Evaluar la capacidad de competencia de los fondos genéticos de las cepas TAL182 y CFN42.

HIPOTESIS

La competencia evaluada como la capacidad de ocupar un número mayor de nódulos, ha sido propuesta como un evento en el que intervienen múltiples factores, dentro de los cuales la información genética de las cepas que compiten juegan un papel preponderante, queda por establecer si dentro de estos elementos genéticos alguno contribuye de manera decisiva en la competencia.

Si el plásmido simbiótico es el elemento genético necesario para la nodulación y fijación de nitrógeno, puede ser este el que contenga algunos loci que confieran competencia.

Si el cromosoma es en general el elemento que contiene la mayor parte de la información genética necesaria para la sobrevivencia puede este ser quien contribuya de manera preponderante en competencia.

Si la capacidad competitiva no puede ser atribuida a alguno de los elementos de manera independiente, entonces supondremos que existe una relación epigenética entre todos los componentes genéticos.

OBJETIVOS

Determinar el grado de participación del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* en la competitividad para la formación de nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- I. Determinar la cinética de nodulación y la capacidad de competencia de diversas cepas silvestres.
- III. Evaluar la capacidad competitiva de los plásmidos simbióticos de CFN42 y TAL182 sobre el fondo genético común de *Agrobacterium* (GMI9023).
- IV. Evaluar la capacidad de competencia de cada plásmido sobre un fondo genético *R. etli* alternativo.
- V. Evaluar la capacidad de competencia de los fondos genéticos de las cepas TAL182 y CFN42.

HIPOTESIS

La competencia evaluada como la capacidad de ocupar un número mayor de nódulos, ha sido propuesta como un evento en el que intervienen múltiples factores, dentro de los cuales la información genética de las cepas que compiten juegan un papel preponderante, queda por establecer si dentro de estos elementos genéticos alguno contribuye de manera decisiva en la competencia.

Si el plásmido simbiótico es el elemento genético necesario para la nodulación y fijación de nitrógeno, puede ser este el que contenga algunos loci que confieran competencia.

Si el cromosoma es en general el elemento que contiene la mayor parte de la información genética necesaria para la sobrevivencia puede este ser quien contribuya de manera preponderante en competencia.

Si la capacidad competitiva no puede ser atribuida a alguno de los elementos de manera independiente, entonces supondremos que existe una relación epigenética entre todos los componentes genéticos.

MÉTODOS

CEPAS UTILIZADAS

Rhizobium etli.

CEPA	MEDIO Y ANTIBIÓTICOS ($\mu\text{g/ml}$)	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES
VIKING 1(1)	PY, Nal ²⁰	nod ⁺ , fix ⁺ , Mel ⁻
TAL 182(1)	PY, Nal ²⁰	nod ⁺ , fix ⁺ , Mel ⁺
NITRAGIN 825(1) (NIT)	PY, Nal ²⁰	nod ⁺ , fix ⁺ , Mel ⁺
BRASIL 5(1) (BRA 5)	PY, Nal ²⁰	nod ⁺ , fix ⁺ , Mel ⁻

(1)Piñero et al., 1988.

Rhizobium etli CFN42 Y DERIVADAS.

CEPA	MEDIO Y ANTIBIÓTICOS ($\mu\text{g/ml}$)	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES
CFN42(2)	PY Nal ²⁰	<i>Rhizobium etli</i> , cepa tipo, silvestre, Guanajuato, Mex.
CFN42 Rif	PYNal ²⁰ , Rif100	Rif ⁺ .
CFN42 pd-Rif	PYNal ²⁰ , Rif100	CFNX89(3) Rif ^R , pd ⁻ .
CFN42 pb-Rif	PYNal ²⁰ , Rif100	CFNX183(3) Rif ^R , pb ⁻ .
CFN42 pe Δ Rif	PYNal ²⁰ , Rif100	CFNX185(3) Rif ^R , pe Δ .
CFNX2001(4)	PYNal ²⁰ , Rif100	pa ⁻ , pd ⁻ , nod ⁻ , fix ⁻ .
CFNX5Rif (5)	PYNal ²⁰ , Sp100, Gm100, Km15	CFN42pd ⁻ : GDYN en el gene <i>nifH</i> c, Rif ^R
2001 H1-35	PYNal ²⁰ , Km60, Nm50	Rif ^R , pa ⁻ , pd ⁻ , pSim TAL182 nod ⁺ , fix ⁻ .
CFN42 pb- H1-35	PYNal ²⁰ , Km60, Nm50	Rif ^R , pb ⁻ , pSim TAL182, nod ⁻
CFN42pd-H1-35	PYNal ²⁰ , Km60, Nm50	Rif ^R , pd ⁻ , pSim TAL182 nod ⁺ y fix ⁻
CFN42 pd- H1-3	PYNal ²⁰ , Km60, Nm50	Rif ^R , pd ⁻ , pSim TAIL82, nod ⁺ , fix ⁺ .

(2)Quinto et al., 1982.

(3)Brom et al., 1992.

(4)Leemans et al., 1984.

(5)Romero et al., 1991.

Rhizobium etli TAL182 Y DERIVADAS

CEPA	MEDIO Y ANTIBIÓTICOS (µg/ml)	CARACTERÍSTICAS RELEVANTE
TAL182	PY NaI20	<i>Rhizobium etli</i> silvestre, Hawaii EUA
TAL182 Rif	PYNaI20, Rif100	Rif ^R
TAL H1-3	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182 pSi m::Tn5mob, nod+, fix+.
TAL H1-4	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182 pSi m::Tn5mob, nod+, fix+.
TAL H1-20	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+.
TAL H1-35	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, gene <i>nifH</i> b, nod+, fix-
TAL H1-84	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+
TAL H2-4	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+
TAL H2-89	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+
TAL H3-5	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+.
TAL H3-14	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+.
TAL H3-79	PY NaI20, Km60, Nm50	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix+.
TAL H1-35 Rif.	PY NaI20, Km60, Nm50, Rif100	TAL182pSim::Tn5mob, nod+, fix- Rif ^R .
TAL182Rif/pd::GDYN	PY NaI20, Rif100, Km15, Sp100, Gm100	TAL182 pSim-/pdCFN42::GDYN en el gene <i>nifH</i> c, nod+, fix+ Rif ^R .
TAL182/pd::Tn5mob	PYNaI 20, Km60, Nm50	TAL182 pSi m- /pdCFN42::Tn5mob, nod+, fix+ Rif ^R .

Agrobacterium GMI9023 Y DERIVADAS

CEPA	MEDIO Y ANTIBIÓTICOS ($\mu\text{g/ml}$)	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES
GMI9023	LB Rif100	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , curada de plásmidos
GMI H1-3	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H1-4	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H1-20	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H1-35	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H1-84	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H2-4	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H2-89	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H3-5	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H3-14	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI H3-79	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim TAL182, nod+, fix+.
GMI9023/ pd::Tn5mob ⁽⁶⁾	LB Rif100, Km60, Nm50	<i>Agrobacterium</i> pSim CFN42, nod+, fix+.

⁽⁶⁾Flores et al., 1987.

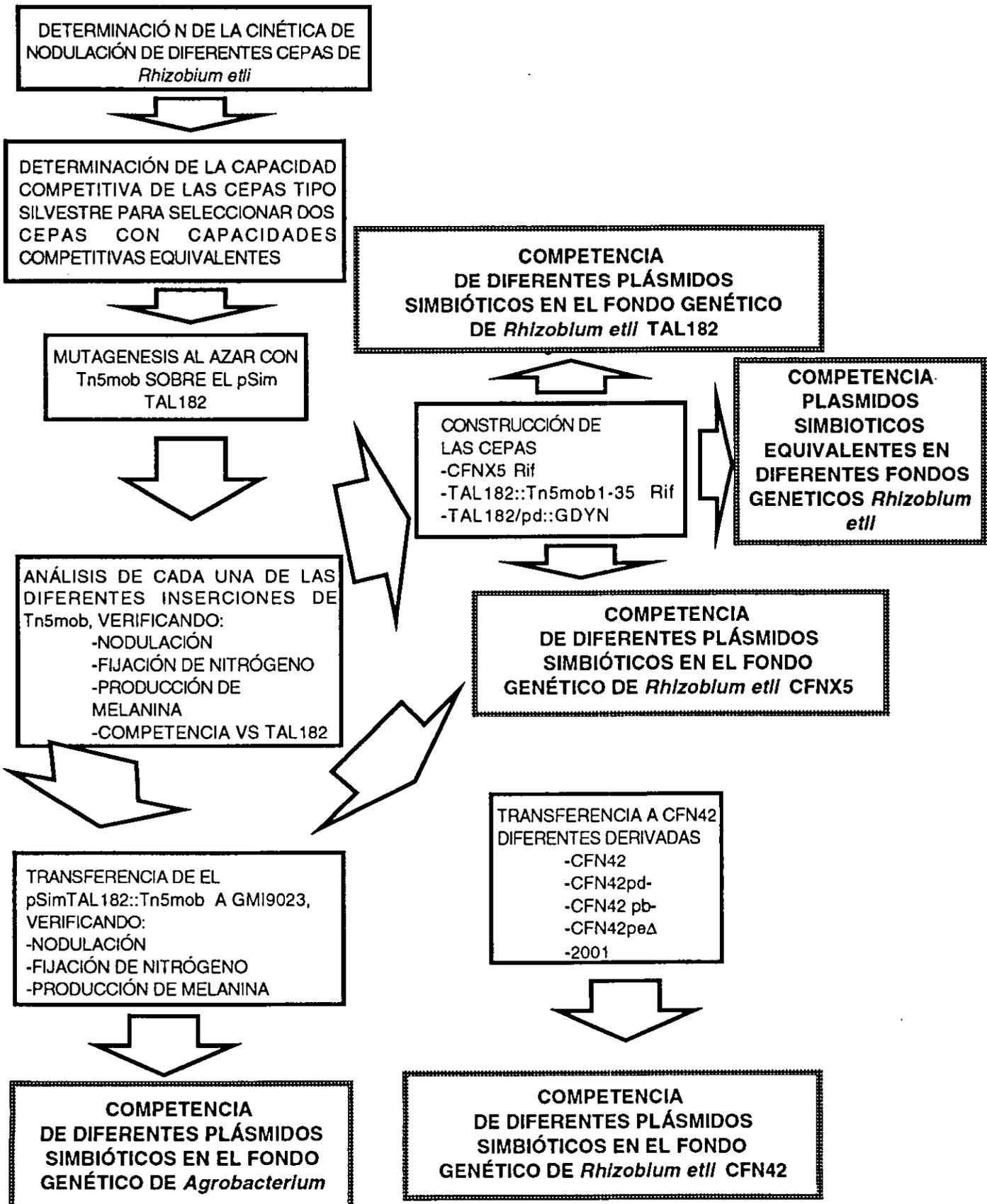
E. coli

CEPA	MEDIO Y ANTIBIÓTICOS ($\mu\text{g/ml}$)	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES
HB101/p15b ⁽²⁾	LB, Km	fragmento interno de nifHa (0.27Kb)
HB101/pCQ15 ⁽²⁾	LB, Km	pBR328/nifHDb
HB101/pSup 5011 ⁽⁷⁾	LB, Km, Neo	Tn5-mob en pBR325
HB101/pRK2013 ⁽⁸⁾	LB, Km	plásmido ayudador para conjugación

⁽⁷⁾Simon, 1984.

⁽⁸⁾Figurski y Helinski., 1979.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BACTERIAS

CONDICIONES CRECIMIENTO

Rhizobium etli.

Las distintas cepas de *Rhizobium etli* se cultivaron en medio PY más el antibiótico(s) adecuado para cada una. Se incubaron a 30°C durante 12- 14 hrs con agitación. Los cultivos sólidos se realizaron con el mismo medio más 1.5% de agar bacteriológico, las condiciones de crecimiento fueron iguales que para los cultivos líquidos.

Agrobacterium tumefaciens.

Se cultivaron en medio LB más el antibiótico(s) adecuado a cada cepa, se incubaron a 30°C durante 10- 12 hrs con agitación. Los cultivos sólidos se realizaron con el mismo medio más 1.5% de agar bacteriológico, las condiciones de crecimiento fueron iguales que para los cultivos líquidos.

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS TRANSCONJUGANTES.

Se mutagenizó la cepa TAL182, utilizando el transposón Tn5-*mob*, los plásmidos simbióticos con las diferentes inserciones resultantes se transfirieron a los fondos genéticos de GMI9023 (*Agrobacterium tumefaciens*) y de CFN42pd-, CFN42pb-, CFN42pe Δ y 2001 (derivadas de *Rhizobium etli* CFN42).

MUTAGENESIS CON Tn5-*Mob*.

A partir de un cultivo líquido (sin antibiótico) se hizo una mezcla de la cepa TAL182 (receptora 150 μ l) con la cepa HB101/pSup5011::Tn5mob (donadora 75 μ l) y se colocó sobre placas de medio PY con agar y se incubó a 30°C durante 24hrs. El crecimiento completo fue resuspendido en 1ml de MgSO₄ 10mM, diluido 10 y 100 veces y de estas diluciones se platearon 100 μ l en placas con medio selectivo PY NaI²⁰, Km⁶⁰. Las mutantes en el plásmido simbiótico se identificaron hasta que fueron transferidas a *Agrobacterium* como se describe a continuación.

TRANSFERENCIA DEL pSim TAL182 A *Agrobacterium tumefaciens* (GMI9023).

Se transfirió el pSim de cada una de las derivadas TAL182 (diferentes inserciones) mediante una cruce triparental a *Agrobacterium tumefaciens* (GMI9023). De cultivos de células en suspensión se mezclaron alicuotas de las cepa GMI9023 (receptora), HB101/pRK2013 (ayudadora) en proporción v/v de 1:0.25 receptora/ayudadora y se sembraron sobre placas de PY sólido, sobre esta mezcla se sembraron las cepas donadoras (colonias de TAL182::Tn5mob) y se incubaron durante 48hrs a 30°C para luego ser seleccionadas en el medio selectivo LB Km⁶⁰ Nm⁵⁰. Para evadir los posibles falsos positivos se repitió la selección y para verificar la presencia del pSim transferido, se analizó la actividad de tirosinasa (producción de melanina). Las cepas resistentes a los marcadores de selección y además productoras de melanina fueron verificadas por perfiles plasmídicos mediante la técnica de Eckhardt.

TRANSFERENCIA DEL pSim TAL182 Tn5 mob A derivadas de *Rhizobium etli* CFN42 (CFN42pd-, CFN42pb-, CFN42pe Δ y 2001).

De cultivos en fase de crecimiento exponencial se tomó 1ml de cada una de las cepas receptoras CFN42pd-, CFN42pb-, CFN42pe Δ y se sembró en placas de PY adicionadas con 100 μ g/ml de Rifampicina para seleccionar resistentes naturales a dicho antibiótico, las colonias seleccionadas fueron utilizadas como receptoras de el pSim de TAL182. La transferencia del pSim TAL182 se hizo mediante una crusa triparental, donde se mezclaron 150 μ l de la cepa receptora, 50 μ l de la cepa HB101/pRK2013 (ayudadora) y 50 μ l de la cepa TAL182::Tn5mob como donadora. Esta crusa se incubó durante 16hrs a 30°C, después de lo cual se resuspendió el crecimiento en 1ml de MgSO₄ 10mM, fué diluido 10 y 100 veces, de cada una de estas diluciones se platearon alícuotas de 100 μ l en placas con medio selectivo. De las clonas seleccionadas, se analizaron por perfiles plasmídicos al menos 10 transconjugantes.

EXPERIMENTOS CON PLANTAS

GERMINACIÓN.

Las semillas que se utilizaron en los diferentes experimentos de competencia fueron de *Phaseolus vulgaris* cv. "Negro Jamapa", PRONASE 1993.

La esterilización de las semillas se hizo sumergiéndolas en cloro comercial (6% de cloro activo diluido al 10%) durante diez minutos, para posteriormente ser lavadas con agua estéril. Para su germinación, se sembraron en charolas con vermiculita húmeda y estéril, y se mantuvieron a una temperatura de 30°C en condiciones de completa obscuridad. Después de dos días se trasplantaron a macetas con vermiculita (dos semillas germinadas por maceta) y, dos días después se procedió a la inoculación de estas plántulas.

INOCULACIÓN

De un cultivo en suspensión de la cepa, se tomó una alícuota, se lavaron y resuspendieron en MgSO₄ 10mM para usarse como inóculos para plantas, se inocularon con 100 μ l /planta de una solución de bacterias preparada a partir de un cultivo líquido de células que se ajustaron a una densidad óptica de 0.2 a 620nm y se hicieron cuentas de células viables que corresponden a 10⁷bacterias/ml. . Para los experimentos de cinética de nodulación se utilizaron 100 μ l /planta, y para los inóculos de las cepas en competencia se mezclaron en las proporciones pre-establecidas 1:1, 10:1 o 1:10 y de estas mezclas se tomaron 100 μ l /planta como inóculo.

RIEGOS

El primer riego se llevó a cabo el día 7 post-inoculación con 100 ml/planta de medio Fáharaeus (Fáharaeus, 1957 para las plantas de los experimentos de cinética de nodulación) o solución Norris modificada (para las plantas inoculadas con las cepas en competencia) . Posteriormente se regó a diferentes tiempos y con volúmenes variables dependiendo de las condiciones de humedad de las macetas.

COSECHA DE LOS NÓDULOS

Para la cinética de nodulación se cosecharon los nódulos a los 13, 15, 18 y 21 días post-inoculación.

El análisis de los nódulos se hizo al término del tiempo de crecimiento de las plantas, que para el caso de la medición de la reducción de acetileno fue de 30 días post-inoculación y para las competencias fue de 25 a 32 días post-inoculación. Excepto para las competencias entre las cepas tipo silvestre que fueron analizadas a los 17 días post-inoculación.

REDUCCIÓN DE ACETILENO

La capacidad de fijación de nitrógeno se cuantificó de manera indirecta midiendo la reducción de acetileno en plantas noduladas, a los 30 días post-inoculación. Primeramente se separó la raíz de el tallo y esta se colocó en frascos herméticamente sellados, cuyo volumen aproximado es de 160cm³. Las raíces se incubaron durante una hora con 5cm³ de acetileno (CH-CH); transcurrido este tiempo se tomó una muestra de 1cm³, que se cuantificó en el cromatógrafo de gases (Varian Gas Chromatograph 3300) para hacer una estimación de la fijación de nitrógeno por planta.

ANÁLISIS DE LA OCUPACIÓN DE LOS NÓDULOS DE PLANTAS

Al término de tiempo de crecimiento de las plantas (25 a 32 días post-inoculación), se hizo un análisis de los nódulos producidos por estas, las bacterias de nódulo fueron substraídas de manera mecánica macerándolos (esterilizando previamente la superficie del mismo), el contenido del nódulo fue vertido sobre placas de cultivo y dependiendo de las características de las cepas inoculadas se hicieron los diferentes análisis:

a) Producción de Melanina.

El plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* contiene genes específicos para la producción de melanina (Borthakur et al, 1987), el revelar la producción de este pigmento nos sirvió como un marcador de la presencia del plásmido simbiótico. La cepa proveniente de nódulo se incubó sobre placas de medio (en algunos casos se utilizó medio selectivo con antibiótico) con 20µg/ml de CuSO₄.5H₂O y 50µg/ml de L-tirosina, durante dos días a 30°C. La cepa sobre-crecida se expone a luz indirecta durante 12hrs mínimo y finalmente, la producción de melanina se revela lisando las células con filtros humedecidos con SDS al 10%. Este tipo de análisis sólo fue utilizado para analizar competencias entre dos cepas donde una de ellas produjera melanina y la otra no.

b) Resistencia a Antibiótico.

La resistencia a antibiótico se evaluó estriando el contenido de los nódulos en placas de PY ó LB sólidos adicionadas con el antibiótico respectivo para cada una de las cepas a analizar. El análisis de resistencia a antibiótico se utilizó en los casos donde las cepas en competencia tuvieran diferentes marcadores de selección.

c) Perfil Plasmídico.

En los casos de los perfiles plasmídicos las cepas provenientes de nódulo fueron crecidas sobre placas de selección y analizadas por perfiles plasmídicos (Eckhardt, 1978); este análisis se utilizó únicamente donde las cepas a competir no tuvieran marcadores distintos tanto de producción de melanina como de resistencia a antibiótico y que si tuvieran diferentes perfiles plasmídicos.

CINÉTICA DE NODULACIÓN

Se llevó a cabo en un sistema de macetas, mediante el análisis de plantas inoculadas con las cepas CFN42, VIK I, TAL182, NITRAGIN y BRA 5. Los inóculos se aplicaron dos días después de la germinación de las plántulas, dicho inóculo se preparó tal como se describió anteriormente.

Las plantas fueron crecidas en condiciones de invernadero, irrigadas constantemente con medio Fáharaeus, los efectos de nodulación fueron observados a diferentes tiempos del crecimiento, en los que se incluyen los siguientes días 13, 15, 18 y 21, en estos días se extrajeron 5 de ellas y se hizo un conteo general de los nódulos presentes en cada una de las plantas inoculadas con las diferentes cepas.

Se hizo un análisis de varianza de los datos obtenidos bajo un diseño completamente al azar en virtud de que las plantas evaluadas permanecieron bajo las mismas condiciones durante su desarrollo y el número de ellas fue variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CINÉTICA DE NODULACIÓN

La cinética de la nodulación de las diversas cepas de *Rhizobium etli* (Tabla I) fue evaluada en plantas de frijol, en un sistema experimental de macetas tal como se describe en la metodología; el número de plantas evaluado fue variable (entre 7 y 10 plantas por cepa en cada experimento), los datos analizados corresponden a dos experimentos independientes que fueron agrupados en un sólo conjunto para su análisis estadístico.

TABLA I CARACTERÍSTICAS* GENERALES DE LAS CEPAS TIPO SILVESTRE.

(*Las características de número de plásmido, producción de melanina, y la resistencia a antibiótico son los marcadores de selección de las cepas en los experimentos de competencia)

CEPA	PROCEDENCIA	NUMERO DE PLÁSMIDOS	MELANINA	RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO (µg/ml)
CFN42	Guanajuato, Méx.	6	+	NaI ²⁰ , Sm ¹⁰⁰
VIKING 1	Belice	3	-	NaI ²⁰
TAL 182	Hawaii, EUA	4	+	NaI ²⁰
NITRAGIN (NIT)	EUA	4	+	NaI ²⁰
BRASIL 5 (BRA 5)	Brasil	4	-	NaI ²⁰

Los controles de las plantas no inoculadas no nodularon tal como se esperaba. Se hizo un análisis de varianza de los datos obtenidos, con él demostramos que no existen diferencias significativas en el número de los nódulos acumulados en las raíces de las plantas de frijol inoculadas con las diferentes cepas (Figura 1).

La cinética de nodulación de las cepas estudiadas muestra que las cepas formaron y acumularon un número equivalente de nódulos entre los días 13-21 post-inoculación, con estos resultados podemos sugerir que ninguna de las cepas analizadas es hipernodulante. La aparición de nódulos ocurrió a los 10 días post-inoculación.

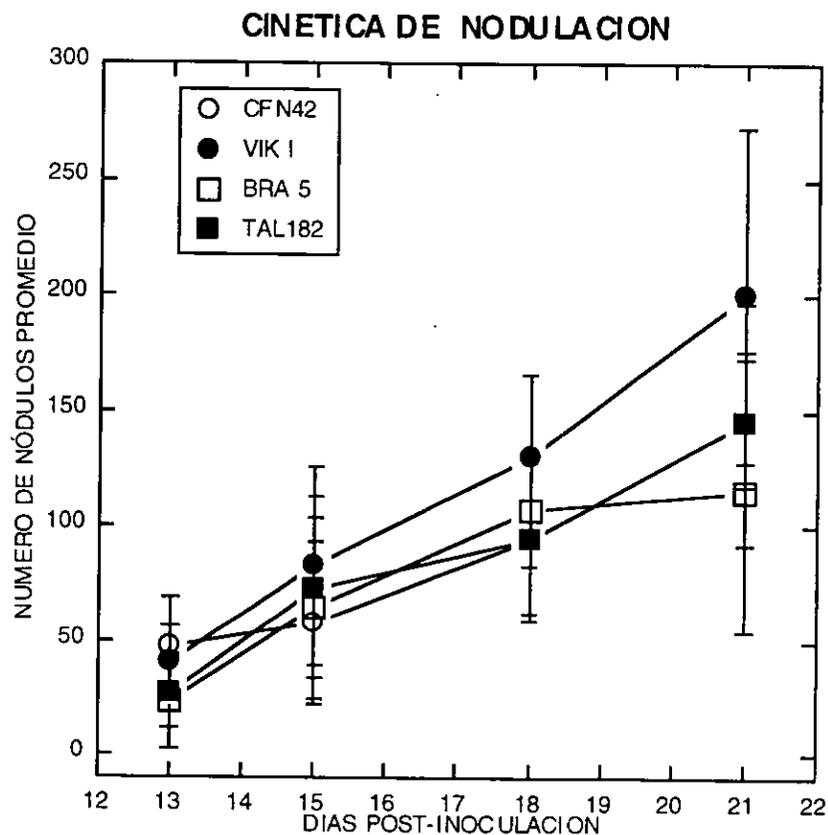


Figura 1 Evaluación de la cinética de nodulación en distintas cepas de *R. etli*. Los puntos representan el promedio de los nódulos formados en un grupo de plantas y sus correspondientes desviaciones estándar.

Dado que no se encontraron diferencias significativas en lo que se refiere a cinética de nodulación se procedió a la evaluación de la competencia con el fin de obtener cepas con características competitivas equivalentes, característica ideal para la evaluación de las capacidades competitivas conferidas por los plásmidos.

COMPETENCIA DE LAS CEPAS TIPO SILVESTRE

Se determinaron las capacidades competitivas de las cepas VIKING I (VIK I), BRASIL 5 (BRA 5) y TAL 182 con respecto a la cepa CFN42, en plantas de frijol. Las coinoculaciones se hicieron en proporciones 1:1 y 10:1; las pruebas de competencia entre las cepas VIKI, BRA 5, TAL 182 se hicieron en proporción 1:1. Las plantas fueron mantenidas en condiciones de invernadero y se cosecharon a los 17 días post-inoculación. Se analizaron 6 plantas por experimento y 10 nódulos por planta (un total de 60 nódulos por competencia). Las colonias aisladas de los nódulos fueron analizadas por producción de melanina, resistencia a estreptomicina o bien por perfil plasmídico según las características de las cepas sometidas a la prueba de competencia (TABLA II).

TABLA II MARCADORES DE SELECCIÓN

(*cepa evaluada por presencia en nódulo, según marcador de selección, resistencia a estreptomicina o producción de melanina).

COMPETENCIA	MARCADOR
CFN42* VS VIK I	Smr, Mel+
CFN42* VS TAL 182	Smr
CFN42* VS BRA 5	Smr, Mel+
TAL 182* VS VIK I	Mel+
TAL 182* VS BRA 5	Mel+
BRA 5 VS VIK I	PERFIL PLASMÍDICO

Los resultados obtenidos (Figura 2) muestran que la cepa CFN42 es equivalente en competencia a la cepa TAL182, ocupa un 80% de los nódulos cuando compete contra la cepa VIK I y que la cepa BRA 5 es completamente desplazada por la cepa CFN42. De igual forma la cepa BRA 5 es completamente desplazada por la cepa TAL182. Con estos datos proponemos que: la cepa TAL182 tiene una capacidad competitiva equivalente a la de la cepa CFN42, VIK I es menos competitiva con respecto a las anteriores, y finalmente BRA 5 es la menos competitiva.

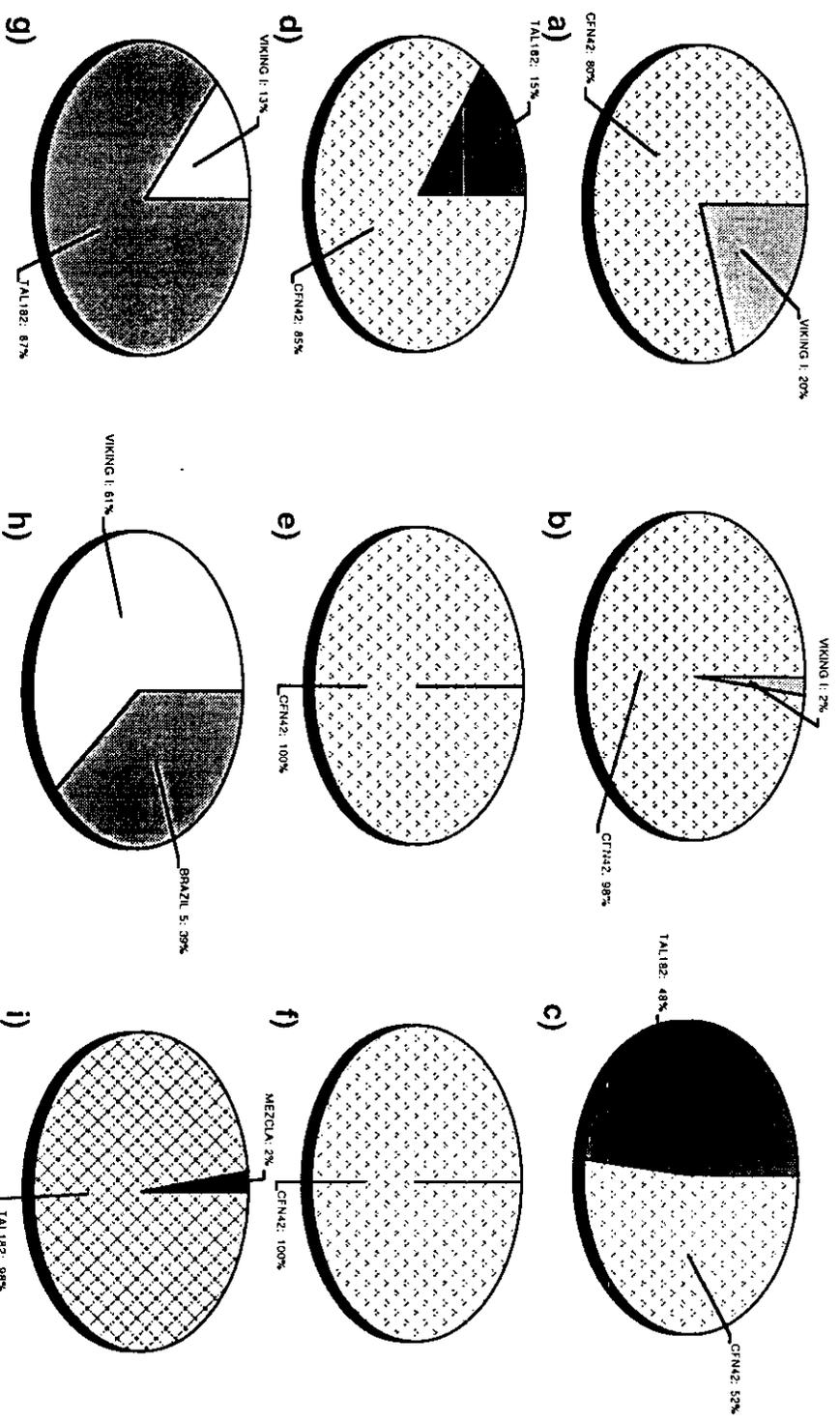


Figura 2. Porcentaje promedio de nódulos ocupados por las cepas competidoras en coinoculaciones a) CFN42 VS VIKING I 1:1, b) CFN42 VS VIKING I 10:1, c) CFN42 VS TAL182 1:1, d) CFN42 VS TAL182 10:1, e) CFN42 VS BRASIL 5 1:1, f) CFN42 VS BRASIL 5 10:1, g) TAL182 VS VIKING I 1:1, h) VIKING I VS BRASIL 5 1:1, i) TAL182 VS BRASIL 5.

Martínez y Rosenblueth (1990), reportaron que la cepa VIK I, es más competitiva que la cepa CFN42. Para verificar estos datos bajo nuestro sistema experimental se hicieron dos experimentos adicionales donde se checó que la inserción de Tn5 *mob* en CFN42 no afecta la capacidad de competencia. Así mismo, corroboramos la reproducibilidad de nuestros resultados con respecto a la capacidad competitiva de la cepa VIK I. Estos resultados nos sugieren que, además de las cepas *per se*, los distintos sistemas experimentales (semillas y condiciones medio ambientales), inciden de manera determinante en los resultados.

Con base a los resultados anteriores se decidió tomar para nuestro estudio a las cepas CFN42 y TAL182. Ambas cepas tiene una capacidad competitiva equivalente por lo que podemos proponer que aquellas diferencias encontradas en competencia (si es que las hubiera) entre los plásmidos y/o fondos genéticos serán exclusivas de estas entidades genéticas y las cepas con sus plásmidos silvestres son iguales en su capacidad de competir por la ocupación de los nódulos.

MUTAGÉNESIS CON Tn5-Mob.

Para poder transferir el plásmido simbiótico de las cepa de *Rhizobium etli* TAL182 a diferentes fondos genéticos fue necesario mutagenizarla (ver métodos) con Tn5-mob, para después analizar si la mutagénesis afecta la nodulación, fijación de nitrógeno y competencia. Las cepas mutagenizadas al azar fueron conjugadas por *Agrobacterium* (GMI9023) para poder obtener todas aquéllas transconjugantes que contuvieran el Tn5-mob insertado en el pSimTAL182, la descripción de las cepas transconjugantes se reportan más adelante en la transferencia del psim de TAL182::Tn5mob a *Agrobacterium* GMI9023.

La cepa TAL182 mutagenizada con Tn5-mob fue evaluada en cuanto a su capacidad de nodular y fijar nitrógeno. Para la evaluación de la nodulación se inocularon 4 macetas con dos plantas cada una, usando como inóculos a las diferentes inserciones (ver tabla en métodos).

Se observó la aparición y acumulación de nódulos a los 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación. Las diez cepas evaluadas para nodulación presentaron nódulos en el decimo día post-inoculación (producto de la acumulación de nódulos entre los día 6 a 9); la apariencia de estos nódulos coincidió con la de los nódulos de las cepas TAL182 y CFN42, a excepción de las plantas inoculadas con la cepa TAL H1-35, que fueron menos desarrollados y aparentemente no fijadores de nitrógeno.

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas con diferentes inserciones de Tn5-mob, se midió la reducción de acetileno en un promedio de dos o tres raíces (30 días post-inoculación) de plantas inoculadas con una misma cepa. Los resultados obtenidos demostraron que nueve de las diez cepas inoculadas fijan nitrógeno (TABLA III), la excepción fue la cepa TAL H1-35 que mostró deficiencias en la fijación de nitrógeno, lo que coincide con los datos fenotípicos de nodulación, antes mencionados.

Así mismo en las figuras 3, 4, 5 y 6 se muestra qué las plantas inoculadas con la cepas TAL182::Tn5 mob muestran un apariencia sana, excepto aquellas que fueron inoculadas con la cepa TAL H 1-35.

TABLA III FIJACIÓN DE NITRÓGENO

CEPA	N o . PLANTAS	D E	REDUCCIÓN DE ACETILENO
CONTROL SIN INOCULAR	3		-
TAL 182	2		+
TAL H1-3	3		+
TAL H1-4	3		+
TAL H1-20	3		+
TAL H1-35	3		-
TAL H1-84	3		+
TAL H 2-4	3		+
TAL H2-89	3		+
TAL H3-5	3		+
TAL H3-14	3		+
TAL H3-79	3		+

Se hizo un ensayo de competencia de las cepas mutantes contra la cepa parental TAL182, para identificar aquellas cepas que presentaran igual capacidad competitiva que la cepa TAL182.

Las diferentes mutantes mostraron diferentes capacidades competitivas (tabla IV), se detectó una cepa con equivalencia en competencia con respecto a la cepa parental, esta fué la cepa TAL H1-35.



Figura 3. PLANTAS CONTROL INOCULADAS CON LA CEPA CFN42 (20 DÍAS POST-INOCULACIÓN).

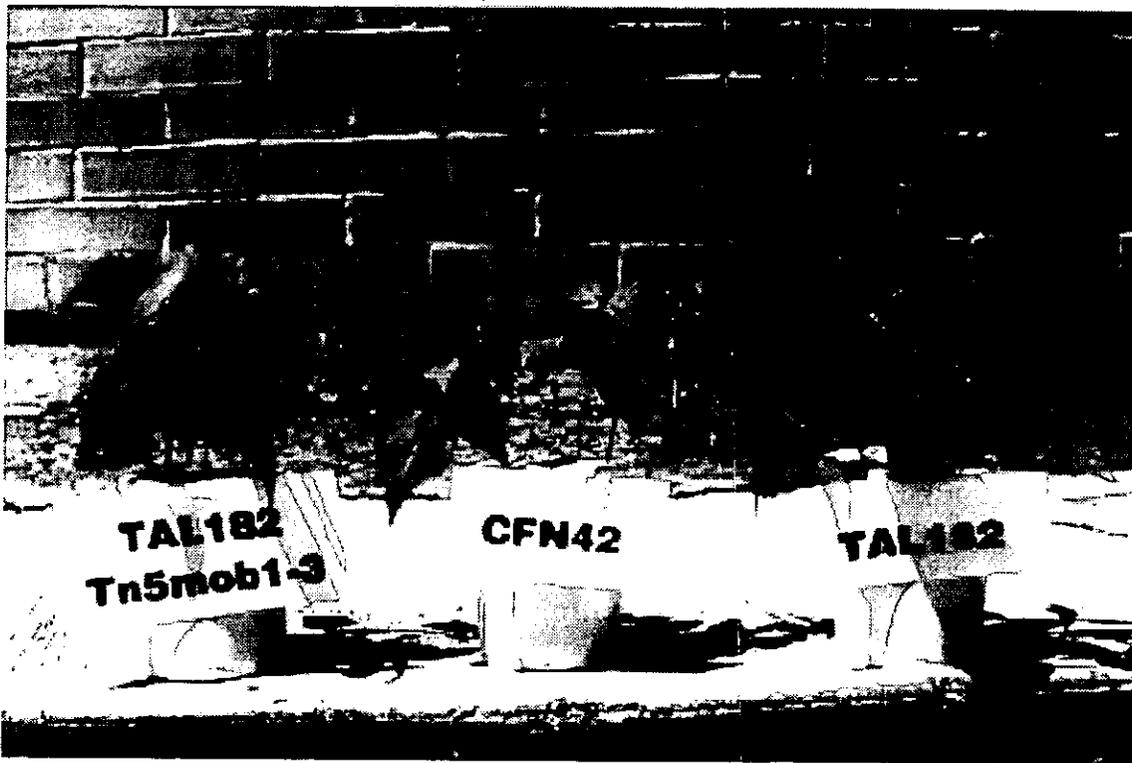


Figura 4. PLANTAS INOCULADAS CON LA CEPAS TAL H1-3, CFN42 Y TAL182 (20 DÍAS POST-INOCULACIÓN).



Figura 5. PLANTAS INOCULADAS CON LA CEPAS TAL H1-3, TAL182 Y TAL H1-35 (20 DÍAS POST-INOCULACIÓN).



Figura 6. PLANTAS INOCULADAS CON LA CEPAS TAL H1-3, TAL182 Y PLANTAS CONTROL SIN INOCULAR (20 DÍAS POST-INOCULACIÓN).

La mutagenesis al azar del pSim de TAL182 nos permitió primeramente el tener un *mob* necesario para la transferencia incluido dentro de la misma molécula y con ello la posibilidad de tener una colección de cepas con diferentes capacidades competitivas de las cuales pudieramos escoger la que tuviera una capacidad competitiva semejante a la cepa original.

TABLA IV COMPETENCIA ENTRE LA CEPA TAL182 VS TAL182::Tn5mob

COMPETENCIA	% DE OCUPACIÓN DE NÓDULOS DE TAL182	% DE OCUPACIÓN DE NÓDULOS DE TAL182::Tn5mob
TAL182 VS TAL H1-3	76	24
TAL182 VS TAL H1-4	85	15
TAL182 VS TAL H1-20	36	64
TAL182 VS TAL H1-35	57	43
TAL182 VS TAL H1-84	33	67
TAL182 VS TAL H 2-4	40	60
TAL182 VS TAL H2-89	37	63
TAL182 VS TAL H 3-5	75	25
TAL182 VS TAL H3-14	60	40
TAL182 VS TAL H 3-79	25	75

TRANSFERENCIA DEL pSim DE TAL182::Tn5mob A *Agrobacterium* (GMI9023)

La transferencia del plásmido simbiótico de TAL182::Tn5mob (diferentes inserciones) a *Agrobacterium* se hizo por medio de una cruce triparental (Tn5mob como donadora, GMI9023 como receptora y HB101/pRK2013 como ayudador).

La selección de las transconjugantes con el plásmido simbiótico se hizo por la capacidad de estas cepas de producir melanina. Se seleccionaron colonias aisladas para cada transconjugante y se analizaron sus perfiles plasmídicos (Figura 7), para corroborar que el pSim de TAL182 en GMI9023 migra a la misma altura que dicho plásmido en la cepa silvestre se analizaron los perfiles plasmídicos y observamos que el plásmido simbiótico de esta cepa es de mayor tamaño que el descrito para la cepa CFN42, el tamaño aproximado es de 500Kb; la transferencia a *Agrobacterium* nos permite diferenciar cual es el plásmido simbiótico de la cepa TAL182 que en la cepa silvestre comigra con un plásmido de un tamaño ligeramente mayor a el plásmido simbiótico como se observa en la Figura 8.

Las cepas transconjugantes se utilizaron como inoculantes de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Todas las plantas mostraron síntomas de deficiencia de nitrógeno (plantas cloróticas) durante los primeros 20 a 25 días, posteriormente las plantas mejoraron como consecuencia de la asimilación tardía de nitrógeno, efecto que se mantuvo hasta el final de su desarrollo (30 días post-inoculación). La clorosis se observó como un efecto permanente en las plantas control sin inocular y en las plantas inoculadas con GMI9023 (*Agrobacterium tumefaciens* sin plásmido simbiótico) y de igual manera que en las plantas inoculadas con la cepa GMI H1-35. Las plantas inoculadas con la cepa silvestre, TAL182, no mostraron apariencia de deficiencia de nitrógeno durante todo el tiempo que se mantuvieron en el invernadero (32 días).

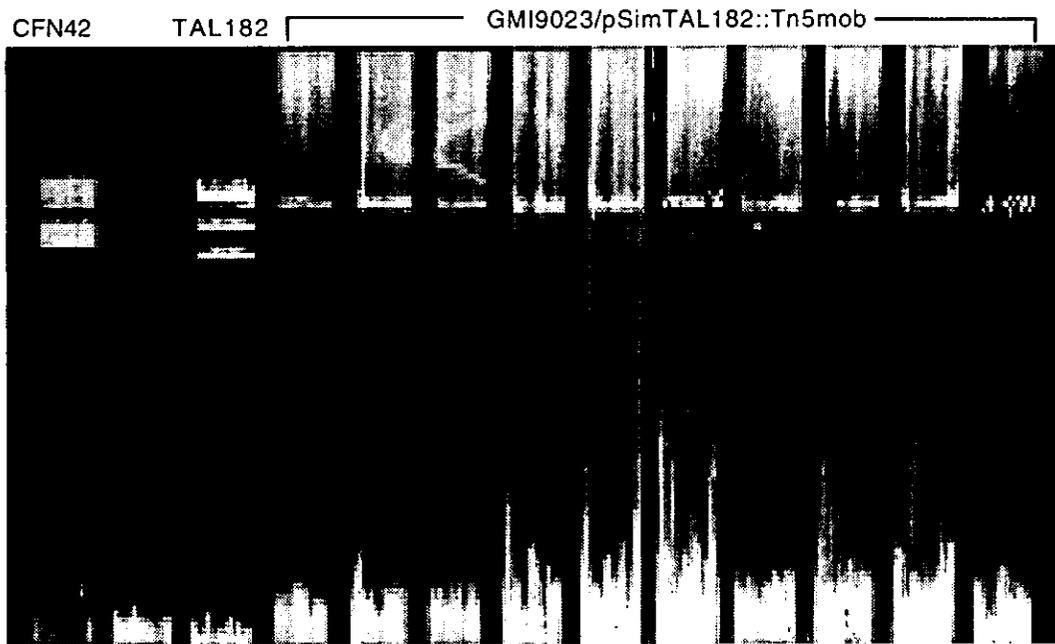


Figura 7. Perfiles plasmídicos de *Agrobacterium* (GMI9023) plásmido simbiótico de TAL182, diferentes inserciones de Tn5mob.



Figura 8. Perfiles plasmídicos.
 1)CFN42.
 2)GMI9023/pdCFN42.
 3)TAL182.
 4)GMI H1-35.

Para la localización de los Tn5-*mob* se llevaron a cabo hibridaciones tipo "Southern", sobre el DNA total de las cepas de GMI9023/pSimTAL182::Tn5mob, usando como detector el plásmido pSup5011Tn5mob. Para revelar las diferentes reiteraciones de los genes *nifHDK* en esta cepa se utilizó un segundo detector, el plásmido pCQ15 el cual contiene un fragmento del gene *nifHDb* de la cepa CFN42 de *Rhizobium etli* (Figura 9 y 10).

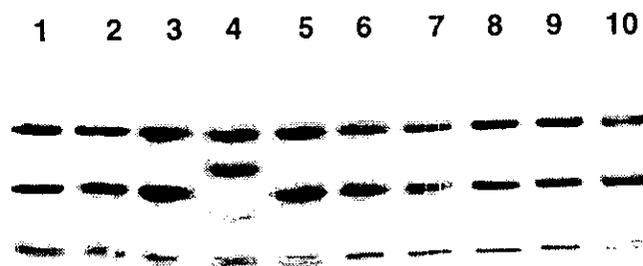


Figura 9. Hibridación de las diferentes transconjugantes de *Agrobacterium* (digestión de DNA total usando la enzima *Bam*HI en cepas tranconjugantes de GMI9023) contra el pCQ15 (Quinto et al, 1982). 1) TALH1-3, 2) TALH1-4, 3) TALH1-20, 4) TALH1-35, 5) TALH1-84, 6) TALH2-4, 7) TALH2-89, 8) TALH3-5, 9) TALH3-14, 10) TALH3-79.

Las hibridaciones muestran que las inserciones de Tn5mob están localizadas en sitios diferentes dentro del plásmido simbiótico de TAL182. La inserción Tn5mob 1-35 está interrumpiendo uno de los genes *nif*, el que correspondería a la copia *nifHb*, y en esta cepa se observa que no hay fijación de nitrógeno en las plantas inoculadas con la cepa TAL H1-35 o GMI H1-35.

Romero et al, 1988. propone que *nifHa* y *b* actúan de manera conjunta, contribuyendo aproximadamente la mitad de el total de la actividad de la nitrogenasa, en la cepa TAL H1-35 no se observó esa correlación puesto que no obtuvimos actividad de nitrogenasa.

Este efecto puede ser atribuido a que en esta cepa no hay funcionalidad de la reiteración *nifHa* y la fijación de nitrógeno de esta cepa es únicamente dada por la reiteración *nifHb* que en este plásmido está interrumpida por la inserción antes mencionada, el mecanismo de inactivación de este operón no lo conocemos, pero en esta cepa será interesante estudiar que factor(s) están involucrados en este fenotipo y que son adicionales al Tn5*mob* insertado.

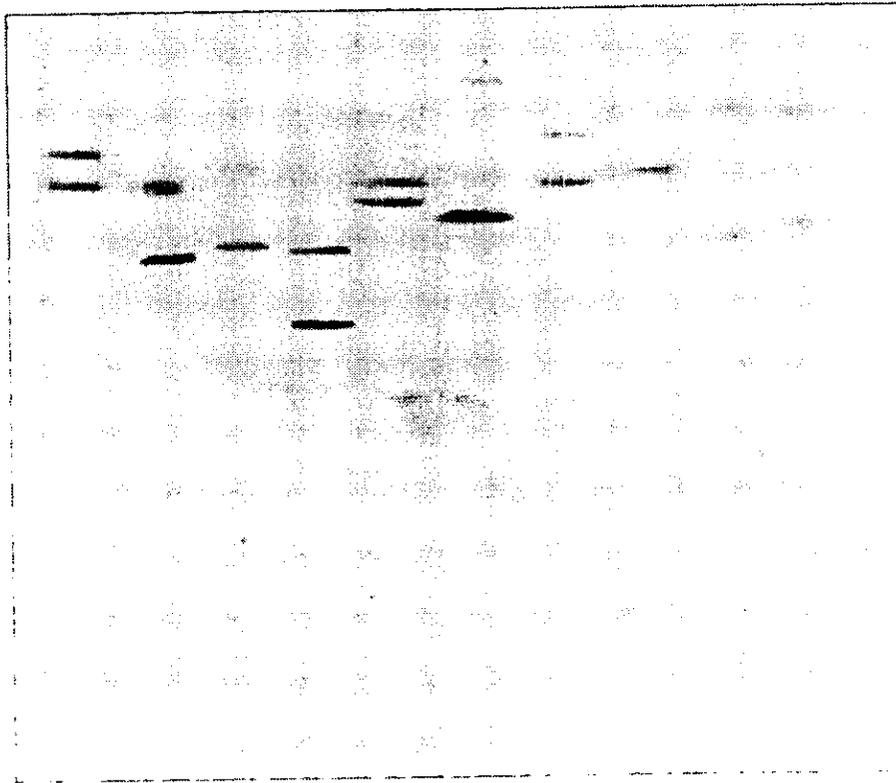


Figura 10. Hibridización de las diferentes transconjugantes de *Agrobacterium* (digestión de DNA total usando la enzima *Bam*HI en cepas tranconjugantes de GM19023) contra el pSup5011Tn5mob. Se muestran las diferentes inserciones de Tn5mob sobre el pSimTAL182 . 1) TALH1-3, 2) TALH1-4, 3) TALH1-20, 4) TALH1-35, 5) TALH1-84, 6) TALH2-4, 7) TALH2-89, 8) TALH3-5, 9) TALH3-14, 10) TALH3-79.

Oliveira y Graham (1990), evaluaron cepas mutantes en fijación de nitrógeno en cuanto a su capacidad de competir y propusieron que la habilidad de una cepa en competencia es independiente de su habilidad de fijar nitrógeno, y pueden ser una cepa con un marcador fácilmente distinguible. En base a estos antecedentes y los experimentos realizados se decidió tomar la cepa TAL182 H1-35 como referencia para posteriores experimentos de competencia.

COMPETENCIA DE LAS CEPAS GM19023/pdCFN42::Tn5mob VS GM1 H1-35.

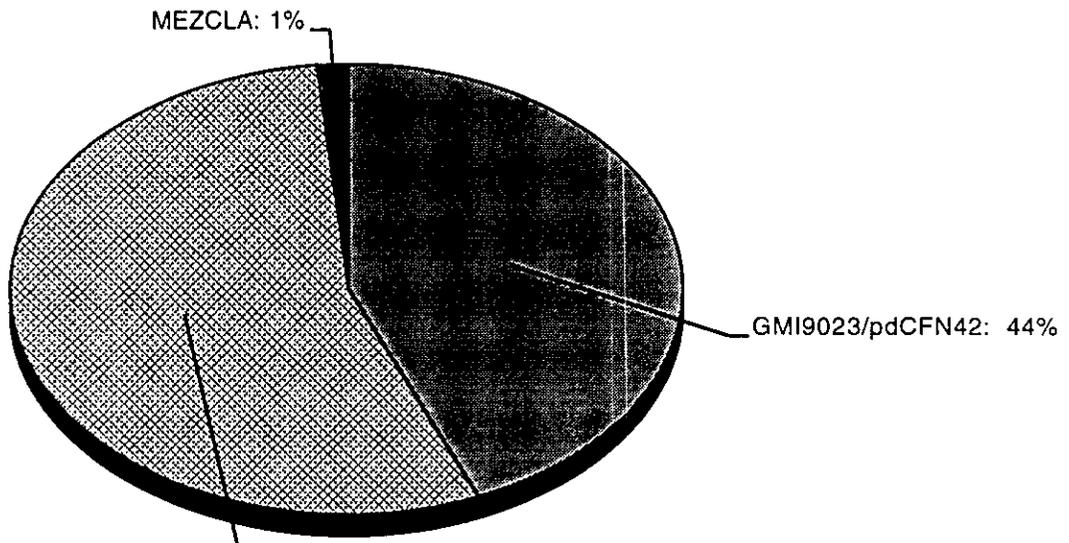
Dado que la cepas a competir con los plásmidos simbióticos de CFN42 y TAL182 tienen los mismos marcadores de resistencia, el método de análisis de ocupación de los nódulos se hizo por medio de los perfiles plasmídicos, en geles tipo Eckhardt, en los que las diferencias de tamaño son evidentes (el pSim de TAL182 es de 500Kb, el pSim de CFN42 es de 390Kb).

Los nódulos en *Agrobacterium* son pequeños y en apariencia deficientes en fijación de nitrógeno.

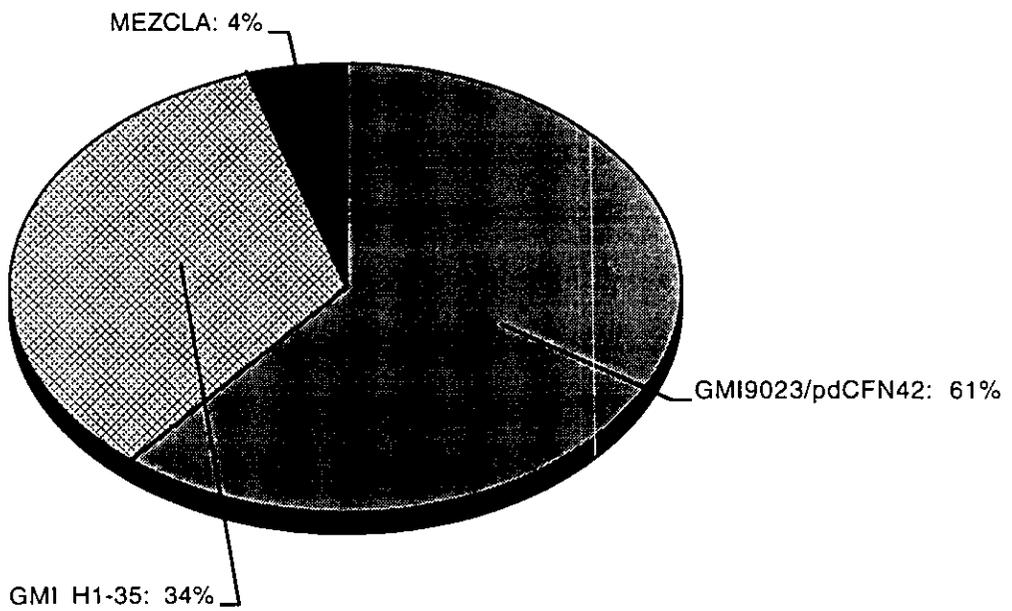
Los resultados de la competitividad se concentran en la Tabla V, y se esquematizan en la Figura 11.

TABLA V. COMPETENCIA GM19023/pdCFN42::Tn5mob(1) VS GM1 H1-35(2).

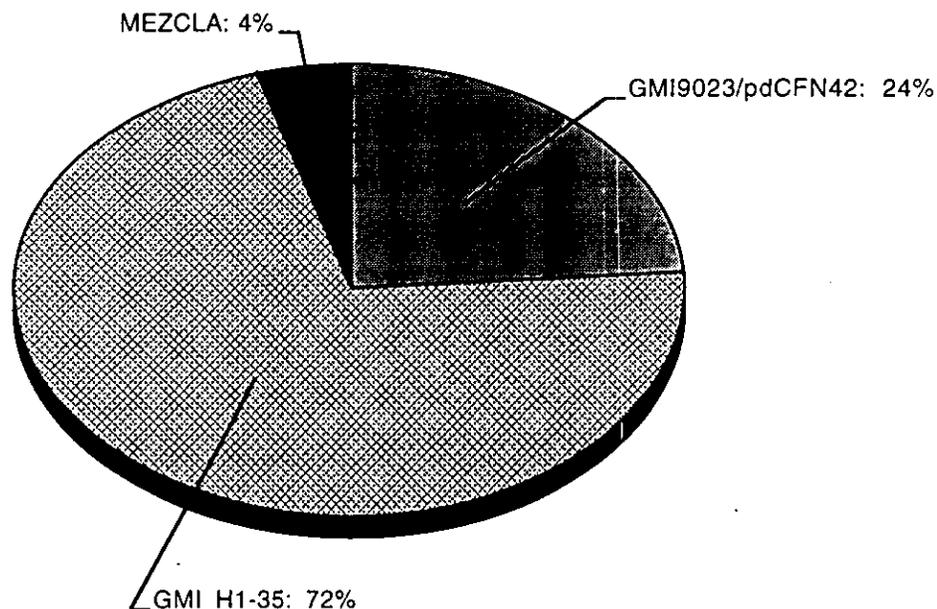
PROPORCIÓN	No. DE NÓDULOS	1 ^o REPETICIÓN (%)	No. DE NÓDULOS	2 ^o REPETICIÓN (%)	No. DE NÓDULOS	3 ^o REPETICIÓN(%)	PROMEDIO TOTAL
1:1	26	(1) 38.46	37	(1) 41.17	37	(1) 51.36	43.66
		(2) 61.54		(2) 54.91		(2) 48.64	55.03
		(1 y 2)		(1 y 2) 3.92		(1 y 2)	1.31
10:1	37	(1) 54.05	32	(1) 63.16	30	(1) 66.67	61.21
		(2) 37.85		(2) 31.57		(2) 33.33	34.25
		(1 y 2) 8.10		(1 y 2) 5.27		(1 y 2)	4.54
1:10	35	(1) 2.85	34	(1) 28.58	52	(1) 40.38	23.93
		(2) 94.30		(2) 61.21		(2) 59.62	71.71
		(1 y 2) 2.85		(1 y 2) 10.21		(1 y 2)	4.36



a)



b)



c)

FIGURA 11 Porcentaje promedio de nódulos ocupados por las cepas GMI9023/pdCFN42 y GMI H1-35 coinoculadas en proporción a) 1:1, b) 1:10 y c) 10:1 respectivamente. Los valores de los porcentajes son valores ajustados a números enteros.

Se analizaron de 26 a 52 nódulos provenientes de cuatro plantas. Puesto que, como ya se mencionó anteriormente, el muestreo es ineficiente dada la limitada recuperación de los nódulos, es decir, se analizó una muestra pequeña con respecto al número total de los nódulos producidos (*Agrobacterium* produce alrededor de 200 nódulos por planta), tenemos que la desviaciones entre las repeticiones son amplias, por lo que el análisis de un número mayor de nódulos nos permitiría una estimación mas acertada de estos resultados, sin embargo, metodológicamente es poco accesible.

Los resultados obtenidos muestran que los plásmidos simbióticos de CFN42 y TAL182 en el fondo genético de *Agrobacterium* son equivalentes en competencia, sin embargo, en experimentos posteriores (ver página siguiente) la inserción de Tn5-*mob* en el pSim de la cepa CFN42 afecta la capacidad competitiva, de la mutante, por ello no podemos asegurar que el pSim de la cepa CFN42 sea equivalente en competencia como se muestra en las competencias sobre el fondo genético de *Agrobacterium*.

COMPETENCIA ENTRE CFN42 Y CFN42::Tn5mob.

Para analizar la capacidad competitiva de la cepa mutante CFN42pd::Tn5mob, se hizo un ensayo de competencia, en el que se analizaron dos lotes de 6 plantas cada uno y se tomaron como muestra 50 nódulos por planta, se coinocularon dichas plantas en proporción 1:1. Los resultados se muestran en la tabla VI y en la figura 12.

TABLA VI. COMPETENCIA CFN42(1) VS CFN42::Tn5mob(2).

PROPORCIÓN	No. DE NÓDULOS	1ª REPETICIÓN		2ª REPETICIÓN		PROMEDIO TOTAL	
1:1	300	(1)	88.67	300	(1)	91.00	89.83
		(2)	11.33		(2)	9.00	

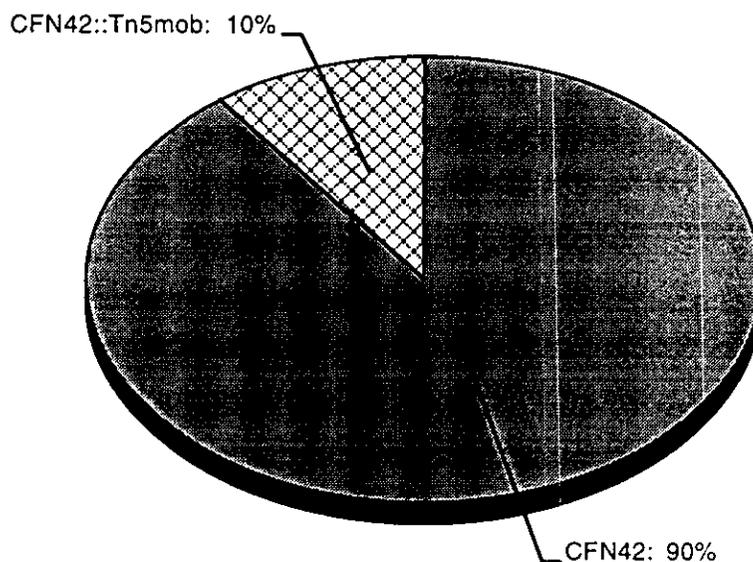


FIGURA 12

Porcentaje promedio de nódulos, ocupados por las cepas en competencia CFN42 y CFN42::Tn5mob.

La inserción de *Tn5mob* en el p42d se ha localizado por secuencia a partir de los bordes de el transposón en el fragmento BG03 (G. Dávila comunicación personal), análisis tipo Blastx de esta región muestra que la mayor homología es en un segmento de 222 aminoácidos con una identidad de 51% con una coproporfirina oxidasa del tipo III de *Rhodobacter sphaeroides*.

La coproporfirina oxidasa está involucrada en la biosíntesis del anillo de porfirina, que es el grupo prostético de algunas proteínas tales como la hemoglobina, mioglobina y algunos de los citocromos. Sin embargo la cepa CFN42::*Tn5mob* produce nódulos rojos, los cuales indican producción de leghemoglobina.

En *R. etli* se ha demostrado que el citocromo tipo c-aa₃ es esencial para la división durante los primeros pasos de la interacción simbiótica con la planta hospedera (Soberón, et al 1993).

La mutación en el plásmido evaluado en competencia no parece estar directamente relacionado con nodulación, sin embargo, se observa que hay un retraso en la cinética de nodulación, que no podemos explicar directamente por la inserción, a menos que se determine la función del gen mutado y que la producción de la proteína sea necesaria para la sobrevivencia de la bacteria ya sea en la rizosfera, en los hilos de infección o durante la invasión de la zona central del nódulo.

TRANSFERENCIA DEL pSim TAL 182 Tn5mob SOBRE *Rhizobium etli* CFN42 Y SUS DERIVADAS CFN42pd-, CFN42pb-, CFN42pe Δ y 2001.

Se transfirió el pSim de TAL H1-35 sobre las derivadas de CFN42, CFN42pd-, CFN42pb-, CFN42pe Δ y 2001 las transconjugantes nos permitieron conocer algunas características de el pSim de TAL182 en el fondo genético de CFN42 (tabla VII, Figura 13).

TABLA VII. CEPAS DERIVADAS DE CFN42 CON EL pSim DE TAL182.

CEPA	CARACTERÍSTICAS DE LAS TRANSCONJUGANTES
CFN42 H1-35	pdCFN42-,nod+, mel+
CFN42pb- H1-35	pdCFN42-,nod-, mel+, floclula
CFN42pe Δ H1-35	nod-, mel+, floclula
2001 H1-35	nod+, mel+
CFN42pd-H1-35	nod+, mel+

Dado que el pSim de TAL182 se mantiene de manera estable sobre el fondo de CFN42 y provoca la pérdida del pSim de CFN42, podemos decir que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. Además de la pérdida de el pSim, se observan eventos de pérdida del plásmido c (las frecuencias de pérdida no fueron evaluadas), esta característica es un evento que también es observado en la cepa silvestre (Brom S. comunicación personal).

En la cepa CFN42pb- H1-35, encontramos que no hay nodulación este fenomeno fué descrito para la cepa CFN42pb-, sugerimos que es necesaria la información genética para la producción de lipopolisacárido contenida en un loci del pb (García-de los Santos et al, 1997) y al igual que en CFN42 esta función no está contenida en el pSim de la cepa TAL182.

La cepa transconjugante CFN42pe Δ H1-35 mantuvo su perfil idéntico mas un plásmido simbiótico del mismo tamaño que en la cepa TAL 182, esta cepa no nodula, esto sugiere que además de la información contenida en este plásmido simbiótico es necesaria la información de otras entidades genéticas.

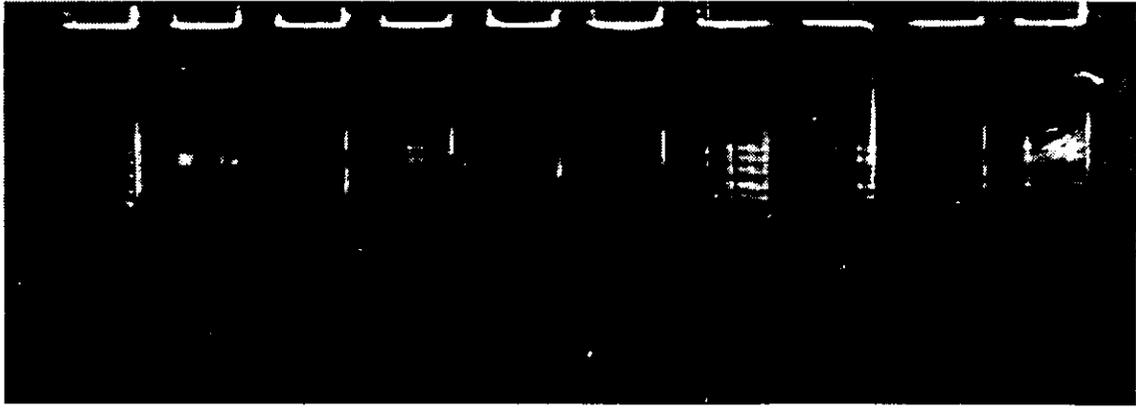


Figura 13. TRANSCONJUGANTES. 1)CFN42, 2)TAL182, 3) CFN42pd-Rif, 4)CFN42pd- H1-35, 5)CFN42peDRif, 6)CFN42peD H1-35, 7)CFN42pb-Rif, 8)CFN42pb- H1-35, 9)2001, 10)2001 H1-35.

Las plantas inoculadas con la cepa CFN42pd- H1-35, mostraron la apariencia de plantas cloróticas como resultado de la deficiencia de Nitrógeno (Figura 14), esto corresponde con el fenotipo anteriormente descrito en las cepa parental TAL H1-35.

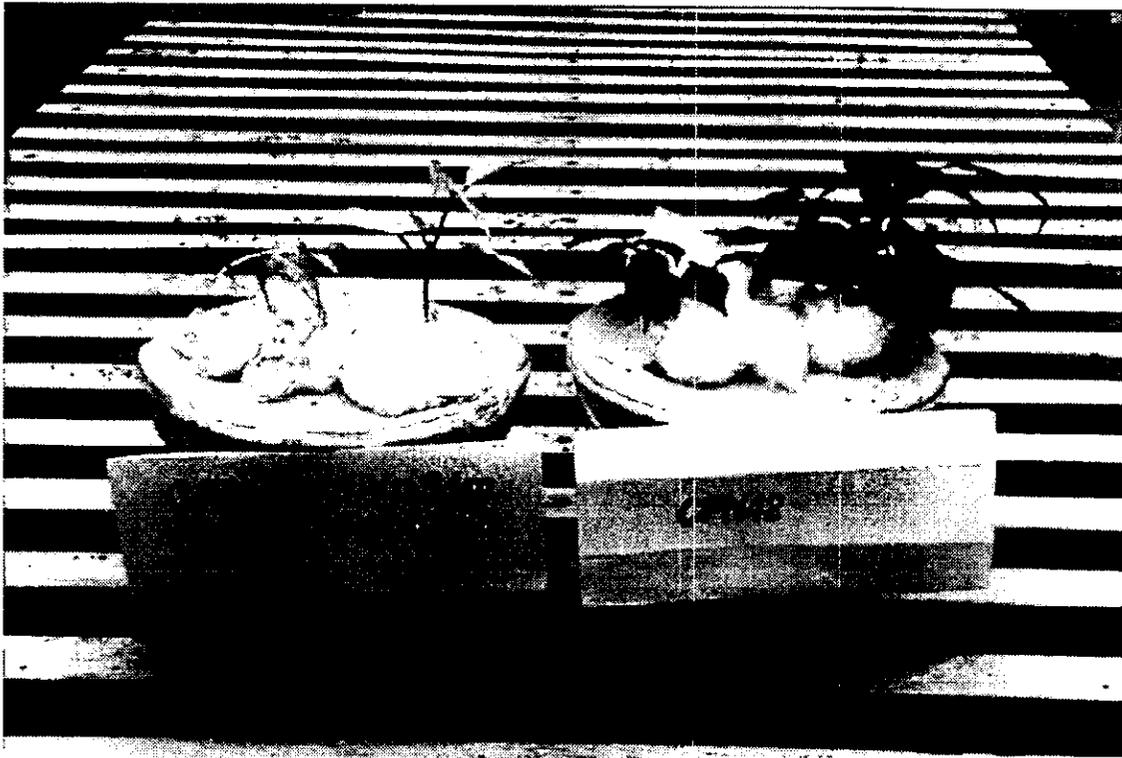


Figura 14. Plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv "Negro Jamapa"), inoculadas con CFN42 y CFN42pd- H1-35 (22 días post-inoculación).

A los 30 días post-inoculación se midió la reducción de acetileno (Figura 15) en 16 plantas inoculadas con cada una de las diferentes cepas evaluadas. Todas las plantas fijaron nitrógeno de manera regular exceptuando a la planta inoculada con la cepa CFN42pd- H1-35, además se utilizó como control positivo la cepa transconjugante CFN42pd- H1-3 que contiene un pSim de TAL182 que no afecta fijación de nitrógeno, este control nos permitió verificar que el pSim de TAL182 en el fondo genético de CFN42 es equivalente en cuanto a fijación de nitrógeno. El efecto de reducción de acetileno está relacionado con la clorosis de las plantas, ya que como se ha descrito anteriormente todas las mutantes que contienen el pSim TAL182::Tn5mob 1-35 son deficientes en fijación de nitrógeno independientemente de el fondo genético donde esten contenidas, ya sea TAL182, GMI9023 o CFN42.

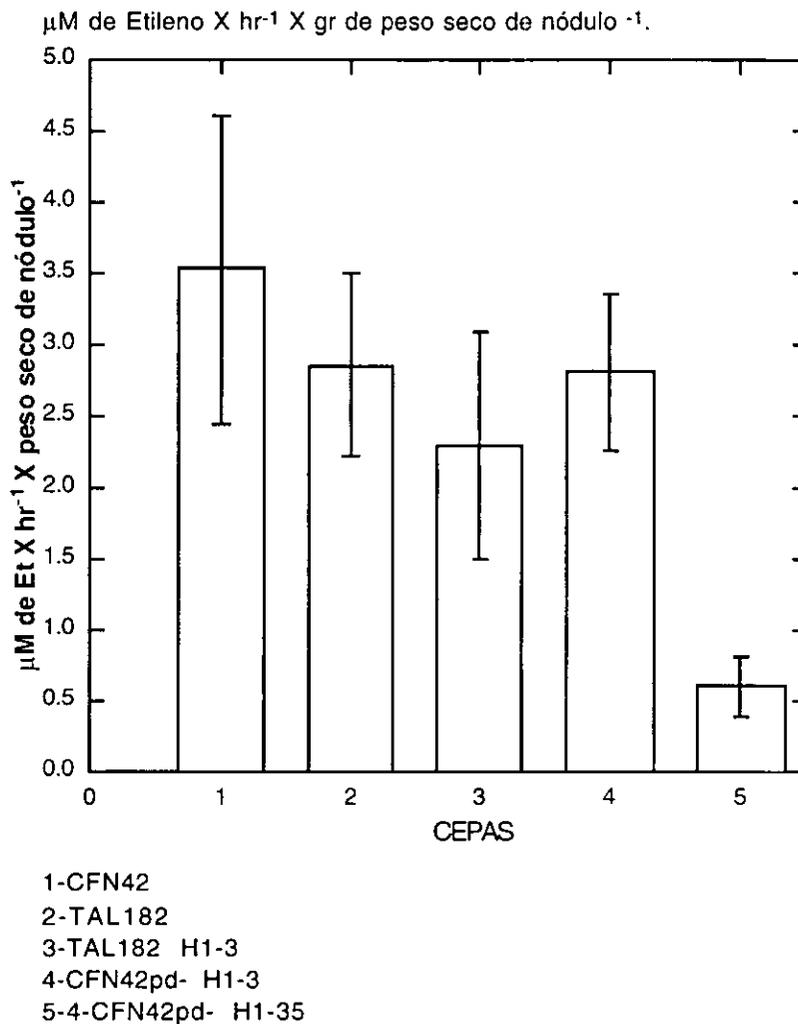


Figura 15

Reducción de acetileno promedio de 16 plantas de frijol medida a los 30 días post-inoculación, medida en µM de etileno reducido/hr/peso específico de nódulos.

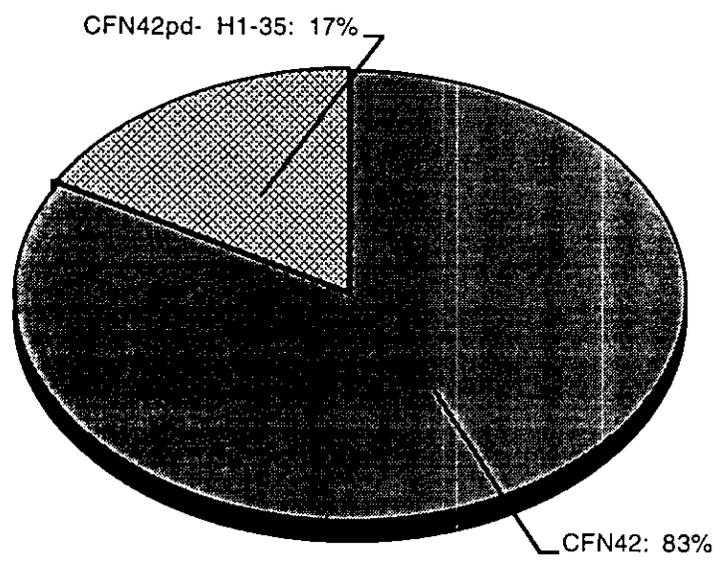
COMPETENCIA CFN42 VS CFN42pd-/pSimTAL182Tn5mob1-35

El análisis de los nódulos consistió en la selección del contenido de cada nódulo en placas de PYNal²⁰Km⁶⁰ Rif¹⁰⁰, PYNal²⁰ y PY. El crecimiento en PY indica que las bacterias de nódulo resistieron el tratamiento de esterilización de la superficie del nódulo, también se obtuvo el crecimiento de las bacterias de nódulo esperado en las placas de PYNal²⁰, ya que ambas cepas coinoculadas son resistentes naturales a Nal²⁰, mientras que en las placas que contenían el medio PYNal²⁰Km⁶⁰Rif¹⁰⁰ solo creció el contenido de los nódulos ocupados por la cepa CFN42pd- H1-35; mediante este método de análisis no es posible distinguir los nódulos mezclados con aquellos que sólo fueron ocupados por la cepa CFN42pd- H1-35.

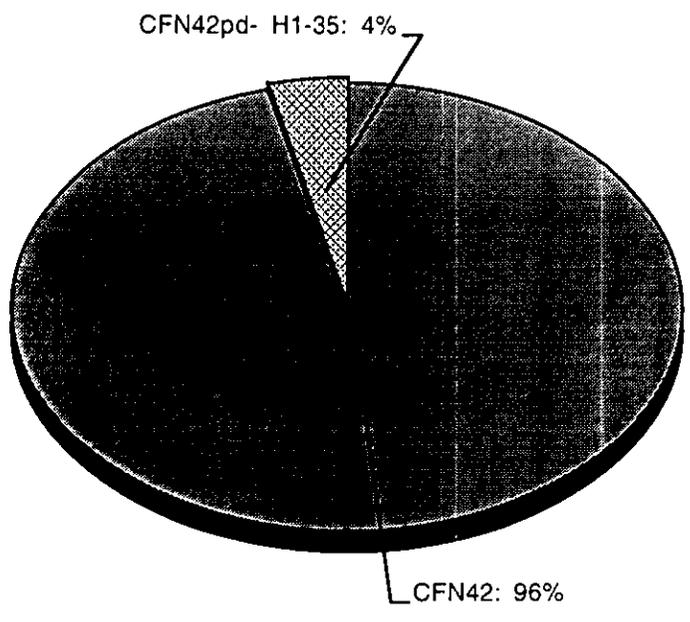
En todas las proporciones de inóculo evaluadas la cepa CFN42 ocupa los nódulos como se resume en la TABLA VIII y se esquematizan en la figura 16.

TABLA VIII. COMPETENCIA CFN42 (1) VS CFN42pd- H1-35(2)

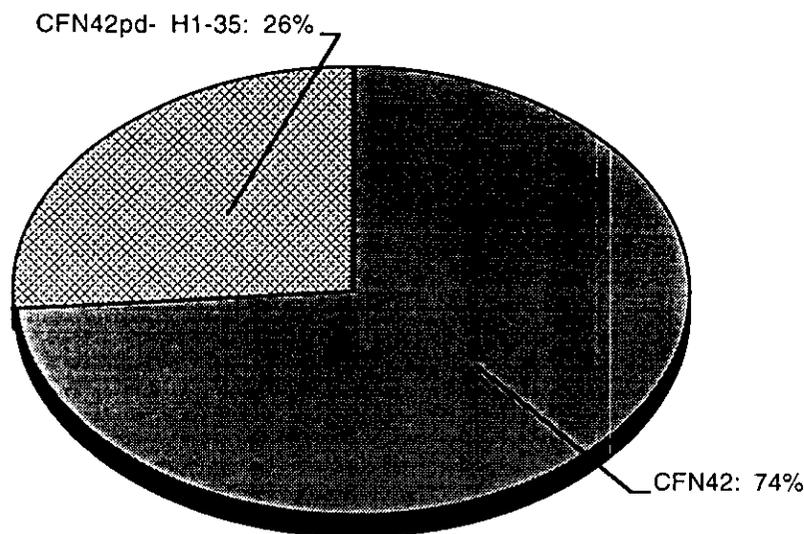
PROPORCIÓN	No. DE NÓDULOS	1 º REPETICIÓN (%)		No. DE NÓDULOS	2 º REPETICIÓN (%)		No. DE NÓDULOS	3 º REPETICIÓN (%)		PROMEDIO TOTAL
1:1	300	(1) 78.34 (2) 21.66		300	(1) 96.67 (2) 3.33		200	(1) 74.00 (2) 26.00		83.01 16.99
10:1	300	(1) 90.67 (2) 9.30		200	(1) 100.00 (2) 0.00		150	(1) 98.00 (2) 2.00		96.22 3.78
1:10	300	(1) 61.70 (2) 38.30		300	(1) 86.67 (2) 13.33		150	(1) 72.67 (2) 27.33		73.68 26.32



a)



b)



c)

Figura 16 Porcentaje promedio de nódulos, ocupados por las cepas CFN42 y CFN42pd- H1-35, coinoculaciones en proporción a) 1:1, b) 1:10 y c) 10:1. Los valores de los porcentajes están ajustados a números enteros.

De la competencia entre CFN42 y CFN42pd- H1-35, observamos que hay una tendencia de mayor ocupación de la cepa CFN42 lo que indica que bajo estas condiciones de experimentación esta cepa es más competitiva independientemente a la proporción de inóculo.

La superioridad de la cepa CFN42 en la ocupación de los nódulos puede explicarse:

1) como una mejor adaptación entre el fondo genético de CFN42 y el plásmido simbiótico endógeno,

2) o bien que los marcadores de selección (en este caso Rifampicina) afecten la competencia de la cepa CFN42pd- H1-35.

Bromfield et al (1985) reportaron que una mutación espontanea que confiere resistencia a Rifampicina afecta competencia. Dado este antecedente decidimos utilizar fondos genéticos equivalentes tanto en la resistencia a Rifampicina como en las inserciones en los plásmidos.

Se utilizó la cepa CFNX5 para comparar las condiciones de competencia entre dos plásmidos con inserciones sobre genes *nif*. La cepa CFNX5 es una derivada de CFN42 que contiene un "cassette" interrumpiendo el gene *nifHc*. De esta cepa se seleccionó una mutante espontánea que le confiere resistencia a Rif¹⁰⁰µg/ml.

Se hizo un ensayo de competencia en donde se analizaron las cepas CFNX5 Rif^r y CFN42pd- H1-35, en proporción 1:1.

La tabla IX y la Figura 17 resumen los resultados obtenidos en la competencia CFNX5 Rif^r VS CFN42pd- H1-35.

TABLA IX. COMPETENCIA CFNX5 Rif^r (1) VS CFN42pd- H1-35(2)

PROPORCIÓN	No. DE NÓDULOS	1º REPETICIÓN (%)		No. DE NÓDULOS	2º REPETICIÓN (%)		No. DE NÓDULOS	3º REPETICIÓN (%)		PROMEDIO TOTAL
1:1	300	(1)	53.67	298	(1)	60.73	300	(1)	64.00	59.47
		(2)	40.67		(2)	34.22		(2)	33.33	36.07
		(1 y 2)	5.66		(1 y 2)	5.05		(1 y 2)	2.67	4.46

La cepa CFNX5 Rif ocupó un promedio de nódulos de 59.47%, mientras que la cepa CFN42pd- H1-35 ocupó un promedio de 36.07% y la cantidad restante fue ocupada por ambas cepas (4.46%). La tendencia general de la ocupación de nódulos puede ser considerada equivalente, dado que ninguna de las cepas fue desplazada completamente por su coinoculante, sin embargo, en particular podemos observar que la cepa CFNX5 Rif muestra una ocupación de nódulos ligeramente superior a la cepa CFN42pd- H1-35.

Estos resultados pueden explicarse porque:

1) el pSim de CFN42 sobre su propio fondo genético es más competente dado que ha permanecido con el y pudiese haber un efecto cooperativo entre el plásmido y el fondo genético que favorezca la competencia

o bien,

2) el pSim de CFN42 es más competitivo que el pSim de TAL182, y el pSim de CFN42 en *Agrobacterium* contribuye en competencia de una manera menor a la real dada la inserción de *Tn5mob*.

Para descartar alguna de las hipótesis propuestas fue necesario evaluar la competencia de ambos plásmidos sobre el fondo genético de TAL182.

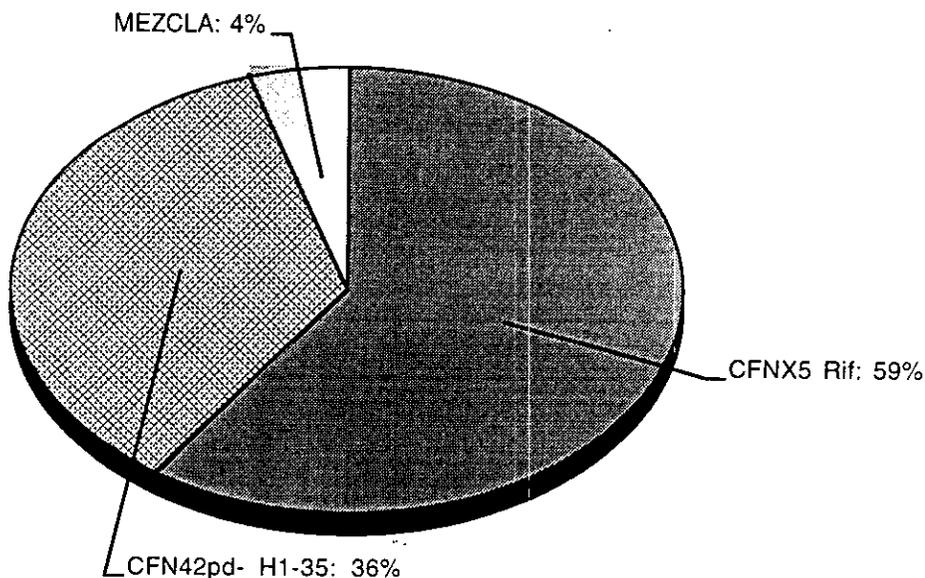


Figura 17

Porcentaje del promedio de nódulos, en la ocupación de nódulos de las cepas CFNX5 Rif VS CFN42pd- H1-35, en coinoculaciones en proporción 1:1. Los valores de los porcentajes son valores ajustados a números enteros.

TRANSFERENCIA DEL pSim DE CFN42 AL FONDO GENÉTICO DE *Rhizobium etli* TAL182.

Se transfirieron los plásmidos simbióticos de CFN42 tanto el pd::Tn5*mob* (usando como donadora a la cepa GMI9023/pd::Tn5*mob*), como el pd::GDYN (usando como donadora a la cepa CFNX5) a la cepa TAL182, utilizando como ayudador a HB101/pRK2013. Se hizo un análisis de los perfiles plasmídicos de las colonias transconjugantes, el cual muestra que se mantienen todos los plásmidos endógenos excepto el pSimTAL182 (figura18), también se analizaron las cepa transconjugantes mediante la hibridización (tipo "Southern") de los DNAs totales usando como detector un fragmento intragénico del gene *nifH*.

El pd::GDYN (CFN42) en ausencia de *mob* se transfirió a bajas frecuencias debido probablemente al efecto ayudador del plásmido a. (Brom S. comunicación personal).

Se realizó un ensayo de nodulación, para verificar que el pSim de CFN42 en el fondo genético de TAL182 formase nódulos, se inocularon 6 plantas de frijol con la cepa TALpd::Tn5*mob* y se observaron los nódulos producidos a los 30 días post-inoculación, estas mismas plantas fueron utilizadas para evaluar reducción de acetileno. En cuanto a la reducción de acetileno, podemos observar que la cepa TALpd::Tn5*mob* redujo acetileno de igual forma que la cepa TAL182 (Figura 19).

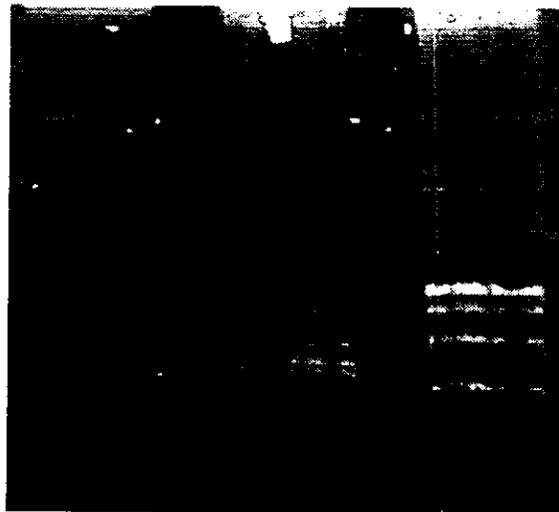


Figura 18. Perfiles plasmídicos.
1)TAL182
2)CFN42
3)TAL182 H1-35.

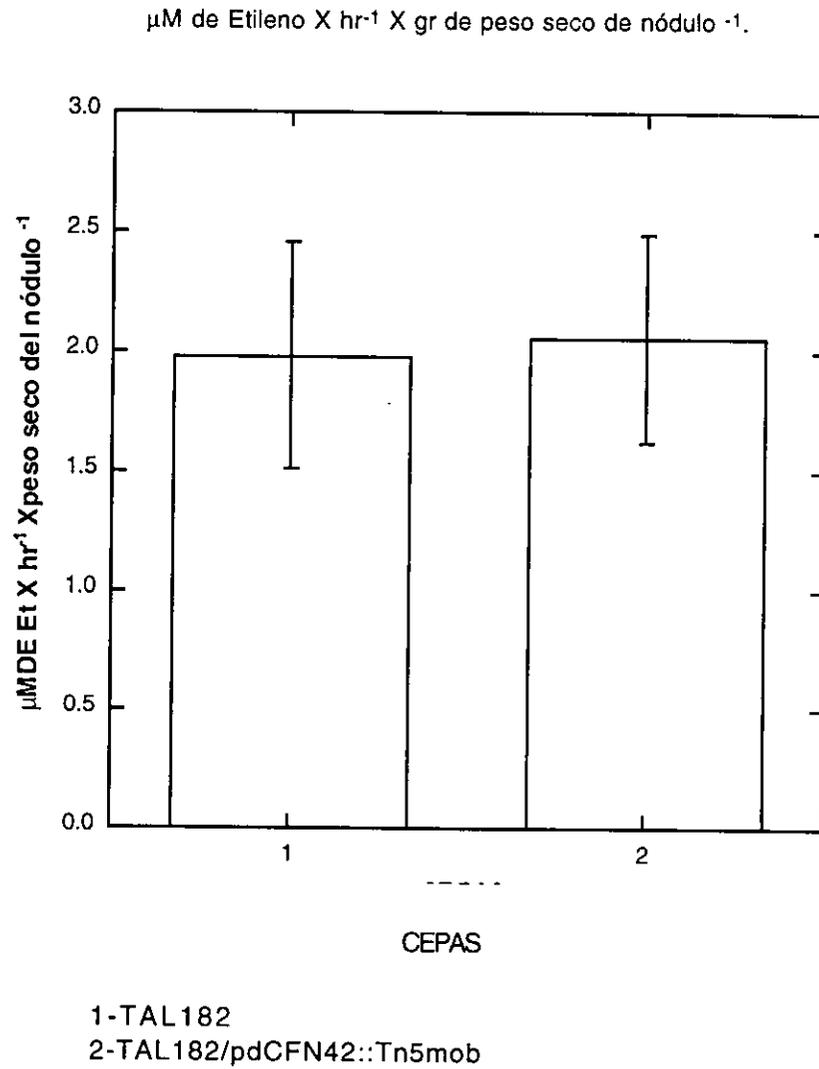


FIGURA 19 REDUCCION ESPECIFICA DE ACETILENO EVALUADA EN 16 PLANTAS A LOS 30 DIAS POST-INOCULACION.

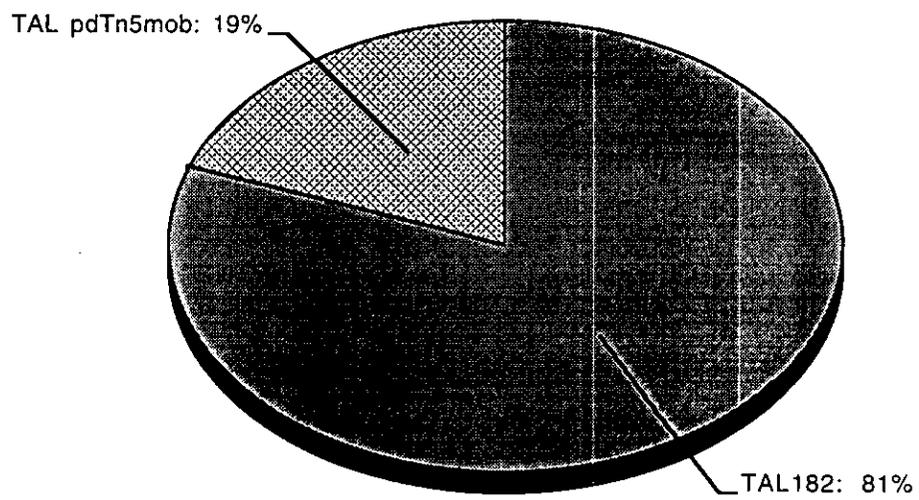
COMPETENCIA TAL182 VS TALpdCFN42

Las competencias fueron evaluadas en dos diferentes lotes de plantas, seis plantas por lote, 50 nódulos por planta. Las cepas se coinocularon en proporción 1:1, 10:1 y 1:10. La ocupación de los nódulos por la cepa TALpdCFN42 fue revelada por su crecimiento en el medio PYNal²⁰ Km⁶⁰.

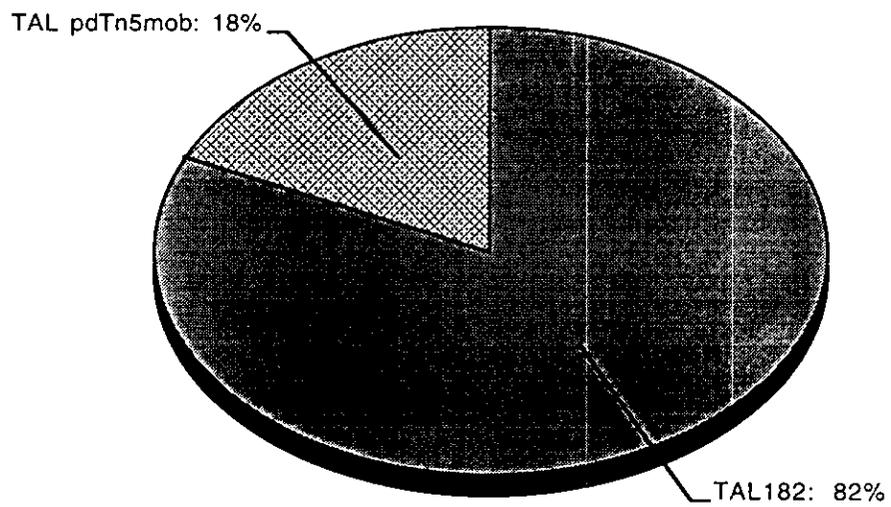
Los resultados obtenidos se muestran en la tabla X y se resumen en la figura 20.

TABLA X. COMPETENCIA TAL182 (1) VS TALpdCFN42 (2)

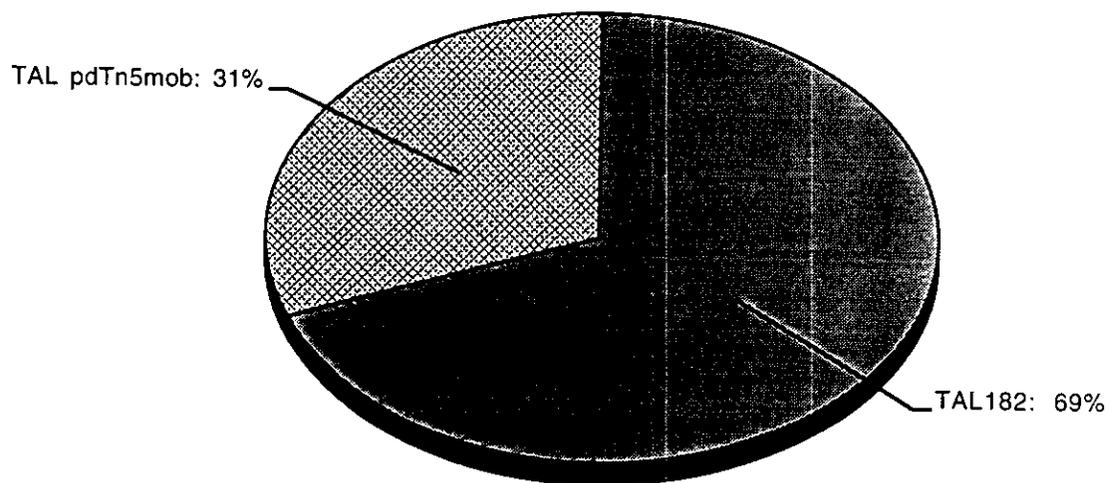
PROPORCIÓN	No. DE NÓDULOS	1 ^º REPETICIÓN		No. DE NÓDULOS	2 ^º REPETICIÓN		PROMEDIO TOTAL
1:1	300	(1)	77.33	300	(1)	84.33	80.83
		(2)	22.67		(2)	15.67	
10:1	300	(1)	78.33	300	(1)	86.00	82.16
		(2)	21.67		(2)	14.00	
1:10	300	(1)	72.67	300	(1)	65.33	69.00
		(2)	27.33		(2)	34.67	



a)



b)



c)

Figura 20

Porcentaje promedio de ocupación de nódulos por las cepas TAL182 y TALpdTn5mob, coinoculadas en proporción a) 1:1, b) 1:10 y c) 10:1 (valores de los porcentajes son ajustados a números enteros).

Los resultados muestran que la cepa TAL182 ocupa mayoritariamente los nódulos en todas las proporciones de inoculación evaluadas, por ello podemos sugerir que la competencia en el fondo genético de TAL182 se ve favorecida hacia la cepa TAL182 con el pSim propio, sin embargo, como se evaluó anteriormente conocemos que el Tn5mob de el pdCFN42 afecta competencia, por ello fué necesario evaluar la capacidad competitiva utilizando plásmidos simbióticos con inserciones equivalentes en fondos genéticos también equivalentes, así que, de igual forma que las competencias en el fondo de CFN42, se hicieron competencias donde las cepas fueron Rif^r y con inserciones en *nifH*, utilizando las cepas TAL182 Rif^r H1-35 (TALRif H1-35) y TALpd::GDYN.

COMPETENCIA TALRif H1-35 VS TALpd::GDYN

Para la competencia TALpd::GDYN contra TALRif H1-35, se analizaron 10 nódulos de 5 plantas (para un total de 50 nódulos), a cada cepa proveniente de nódulos se le hizo un análisis electroforético tipo Eckhardt.

En los nódulos analizados encontramos que la cepa TALpd::GDYN ocupó un 90% de los nódulos, mientras que el 10% restante fue ocupado por la cepa TALRif H1-35. Estos resultados pueden ser explicados de la siguiente manera:

1) en la competencia donde se utilizan las cepas TALRif H1-35 y TALpd::GDYN se evalúa la competencia de manera equivalente y por lo tanto el pd de CFN42 confiere mayor capacidad competitiva que el pSim de TAL182.

2) o bien que el fondo genético la cepa TAL182 confiere mayor capacidad competitiva independientemente de el plásmido simbiótico que contenga.

Para la evaluación de estas hipótesis se hicieron los siguientes ensayos de competencia:

TAL H1-35 VS CFN42pd- H1-35

TALpd::GDYN VS CFNX5Rif

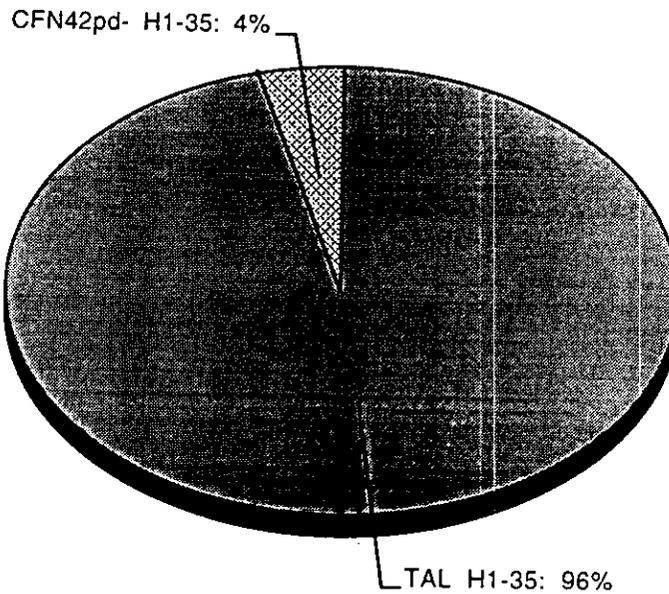
TALpd::GDYN VS CFN42pd- H1-35

Las competencias fueron evaluadas en tres diferentes lotes de plantas, se evaluaron seis plantas para cada lote, la única proporción de inóculo evaluada fue 1:1.

Las competencias TAL H1-35 VS CFN42pd- H1-35 y TALpd::GDYN VS CFNX5Rif se analizaron mediante la observación de los perfiles plasmídicos de las cepas recuperadas de nódulos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla XI y la figura 21.

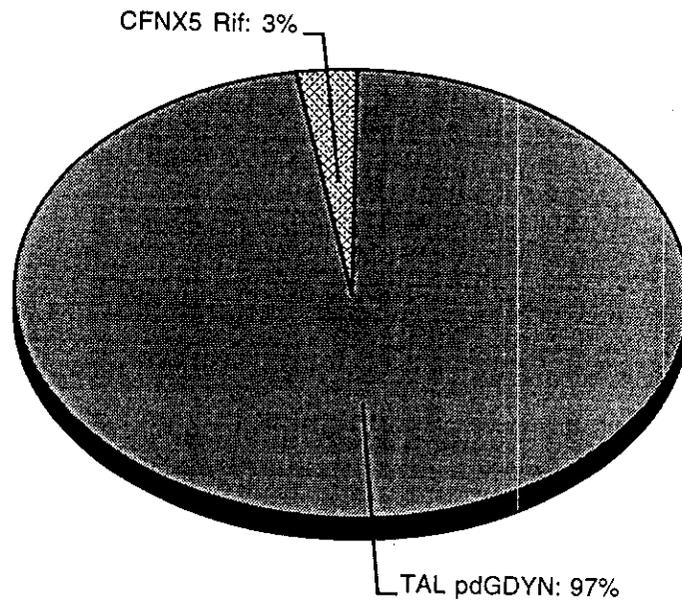
TABLA XI. COMPETENCIAS TAL H1-35 VS CFN42pd- H1-35 y TALpd::GDYN VS CFNX5Rif

COMPETENCIA 1:1	No. DE NÓDULOS	1ª REPETICIÓN	No. DE NÓDULOS	2ª REPETICIÓN	PROMEDIO TOTAL
TAL H1-35(1) VS CFN42pd- H1-35 (2)	171	(1) 94.73	154	(1) 97.40	96.06
		(2) 5.27		(2) 2.60	3.94
TALpd::GDYN (1) VS CFNX5Rif(2)	170	(1) 98.82	171	(1) 95.90	97.36
		(2) 1.18		(2) 4.10	2.64



a)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



b)

Figura 21 Porcentaje promedio de nódulos, ocupados por cada cepa en las competencias a) TAL H1-35 VS CFN42pd- H1-35 y b) TALpd::GDYN VS CFNX5Rif, coinoculaciones en proporción 1:1 (valores de porcentajes son ajustados a números enteros).

Para la competencia TALpd::GDYN contra CFN42pd- H1-35, se analizaron 10 nódulos de 5 plantas (para un total de 50 nódulos), a cada cepa proveniente de nódulos se le hizo un análisis electroforético tipo Eckhardt. El análisis mostró que la cepa TALpd::GDYN ocupó un 100% de los nódulos.

Los resultados antes mencionados muestran que el fondo genético de TAL182 es más competitivo que el fondo genético de la cepa CFN42. En cuanto a los plásmidos simbióticos podemos decir que el pSim CFN42 es más competitivo que el pSimTAL182, de tal forma que la cepa más competitiva es la cepa cuyo fondo genético es el de TAL182 y el pSimCFN42 (TALpd::GDYN).

DISCUSIÓN

Los resultados de la cinética de nodulación de diferentes cepas de *Rhizobium etli* nos revelan que las cepas evaluadas poseen características equivalentes en cuanto a la acumulación de nódulos; esto sugiere que las cepas evaluadas no son hipernodulantes.

Las competencias entre las diferentes cepas silvestres de *Rhizobium etli* evaluadas nos muestran que la cepa CFN42 es equivalente en competencia a la cepa TAL182, y dada esta característica seleccionamos a estas cepas para analizar por separado la participación de sus plásmidos y de sus fondos genéticos en el fenómeno de competitividad para la nodulación.

Para poder transferir al pSim de TAL182 fue necesario mutagenizar dicho plásmido, de 10 mutantes obtenidas 10 produjeron melanina, nodularon y 9 fijaron nitrógeno, sin embargo, sólo la cepa TAL H1-35 mostró capacidad competitiva igual a la cepa TAL182.

El análisis de las mutantes nos permitió demostrar que la cepa TAL182 H1-35, contiene el Tn5*mob* insertado en la reiteración *nifHb*, esta inserción anula la fijación de nitrógeno evidenciado por la clorosis y baja reducción de acetileno de las plantas inoculadas con ella. Romero et al, 1988. propone que ambas regiones *nifHa* y *b* que contienen al operón completo *nifHDK* actúan de manera conjunta, contribuyendo aproximadamente cada una con la mitad del total de la actividad de la nitrogenasa. En la cepa TAL H1-35 no se observó esa contribución puesto que no obtuvimos actividad de nitrogenasa, al parecen en nuestra cepa no hay funcionalidad de la reiteración *nifHa* y la fijación de nitrógeno de esta cepa es únicamente dada por la reiteración *nifHb* que en este plásmido está interrumpida por la inserción, si bien la fijación de nitrógeno se vio afectada no así la nodulación ni la competencia; tal como ha sido descrito en el trabajo de Oliveira y Graham (1990). En base a estos resultados y a los antecedentes previos se decidió tomar la cepa TAL182 H1-35 como referencia para posteriores experimentos de competencia.

La competencia dada por los plásmidos simbióticos en *Agrobacterium* es equivalente, sin embargo el pSim de CFN42::Tn5mob es menos competitivo con respecto al silvestre, lo cual nos permiten sugerir que dichos plásmidos son diferentes en cuanto a su capacidad de competir ya que la inserción de Tn5mob afecta competencia sobre CFN42 y suponemos también está afectada en *Agrobacterium*. Sugerimos que el pSim de la CFN42 es más competitivo. El análisis de la secuencia donde se insertó el Tn5mob nos permite demostrar que no es una región directamente involucrada en nodulación, sin embargo, ya que observamos un retraso en la nodulación de las cepas que contienen dicho plásmido es posible que la inserción afecte algún gene involucrado en competencia, el análisis genético por complementación permitiría determinar si la alteración es debida únicamente al efecto del Tn5mob o bien a otro tipo de alteración.

Para el análisis de la capacidad competitiva de los pSim evaluados fue necesario transferir ambos plásmidos al fondo genético tanto de CFN42 (para el caso de el pSim TAL182) como al fondo genético de TAL182 (para el caso de pSim CFN42). La transferencia de el pSim de TAL182 a CFN42 (y derivadas de CFN42) nos permitió conocer: que difieren en tamaño, ambos plásmidos simbióticos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad y que en la cepa TAL182, al igual que en la cepa CFN42 los determinantes para la producción de LPS se encuentran en una entidad genética diferente al pSim.

La tendencia a ocupar un mayor número de nódulos por las cepas CFN42 en competencia con la cepa CFN42pd- H1-35 y de la cepa CFNX5Rif en competencia con la cepa CFN42pd- H1-35 es explicada como una mejor adaptación entre el fondo genético y el plásmido que la contiene, es decir que el pSim de CFN42 es más competitivo en su propio fondo genético.

Los resultados de las competencias en el fondo genético de TAL182 muestran que la cepa TAL182 es más competitiva cuando se hace competir contra la cepa TAL182pd::Tn5mob, sin embargo, es desplazada en la competencia contra la cepa TAL182pd::GDYN, estos datos sugieren que el fondo genético de TAL182 provee de mayor capacidad de competir, pero es aún mejor cuando contiene el pSim de CFN42.

Los análisis de competencias entre cepas cuyos plásmidos son iguales pero los fondos genéticos pertenecen a las dos cepas aquí evaluadas muestran que el fondo genético participa fuertemente en competencia y confiere atributos que permiten hacer gradaciones de capacidades competitivas.

CONCLUSIONES

El análisis de la competencia de los plásmidos simbióticos en el fondo de CFN42 Y TAL182 nos revela que el pSimCFN42 es más competitivo que el pSim TAL182 aún cuando se encuentra en un fondo genético no propio.

El análisis de la competencia de los fondos genéticos de TAL182 y CFN42 conteniendo el mismo plásmido mostraron que el fondo genético de la cepa TAL182 es superior al de la cepa CFN42.

Como conclusión general podemos decir que hay una actividad cooperativa entre los fondos genéticos y los plásmidos simbióticos, aún cuando se encuentren en un fondo genético no propio. Las interacciones plásmido-cromosoma proveen de mayores ventajas en cuanto a competencia y el recambio de estas entidades conduce a tener una amplia gama de cepas con diversas capacidades competitivas.

Los resultados de las competencias en el fondo genético de TAL182 muestran que la cepa TAL182 es más competitiva cuando se hace competir contra la cepa TAL182pd::Tn5mob, sin embargo, es desplazada en la competencia contra la cepa TAL182pd::GDYN, estos datos sugieren que el fondo genético de TAL182 provee de mayor capacidad de competir, pero es aún mejor cuando contiene el pSim de CFN42.

Los análisis de competencias entre cepas cuyos plásmidos son iguales pero los fondos genéticos pertenecen a las dos cepas aquí evaluadas muestran que el fondo genético participa fuertemente en competencia y confiere atributos que permiten hacer gradaciones de capacidades competitivas.

CONCLUSIONES

El análisis de la competencia de los plásmidos simbióticos en el fondo de CFN42 Y TAL182 nos revela que el pSimCFN42 es más competitivo que el pSim TAL182 aún cuando se encuentra en un fondo genético no propio.

El análisis de la competencia de los fondos genéticos de TAL182 y CFN42 conteniendo el mismo plásmido mostraron que el fondo genético de la cepa TAL182 es superior al de la cepa CFN42.

Como conclusión general podemos decir que hay una actividad cooperativa entre los fondos genéticos y los plásmidos simbióticos, aún cuando se encuentren en un fondo genético no propio. Las interacciones plásmido-cromosoma proveen de mayores ventajas en cuanto a competencia y el recambio de estas entidades conduce a tener una amplia gama de cepas con diversas capacidades competitivas.

LITERATURA CITADA

- Araujo, R.S., E.A. Robleto, y Handelsman (1994) A Hydrophobic Mutant of *Rhizobium etli* Altered in Nodulation Competitiveness and Growth in the Rhizosphere Appl. Environ. Microbiol. 60(5):1430-1436.
- Bittinger, M.A., J.L. Milner, B.J. Saville y J. Handelsman (1997) *rosR*, a Determinant of Nodulation Competitiveness in *Rhizobium etli*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10(2):180-186.
- Borthakur, D., J.W. Lamb y A.W.B. Johnston. (1987) Identification of Two Classes of *Rhizobium phaseoli* Genes Required for Melanin Synthesis, one of Which is Required for Nitrogen Fixation and Activates the Transcription of the Others. Mol. Gen. Genet. 207:155-160.
- Brewin, N.J., E.A. Wood y J.P.W. Young. (1983) Contribution of the Symbiotic Plasmid to the Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 129:2973-2977.
- Brom, S., A. García de los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, G. Dávila, D. Romero, y R. Palacios (1992) Different Plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* Are Required for Optimal Symbiotic Performance. J. Bacteriol. 174(16):5183-5189.
- Bromfield, E.S.P., D.M. Lewis y L.R. Barran. (1985) Cryptic Plasmid and Rifampicin Resistance in *Rhizobium meliloti* Influencing Nodulation Competitiveness. J. Bacteriol. 164(1):410-413.
- Dénarié, J., F. Debellé, y J-C Promé (1996) *Rhizobium* lipo-Chitinooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. Annu. rev. Biochem. 65:503-535.
- Dowling, D.N. y W. J. Broughton. (1986) Competition for Nodulation of Legumes Annu. Re. Biochem. 40:131-157.
- Eckhardt, T. (1978) A Rapid Method for the Identification of Plasmid Deoxyribonucleic Acid in Bacteria. Plasmid 1:584-588.
- Figurski, D.H. y D. R. Helinski. (1979) Replication of an Origin-Contain Derivative of plasmid RK2 Dependent on a Plasmid Fuction Provide in *trans*. Proc. natl. Acad. Sci. 76:1648-1652.

- Fáharæus, G. (1957) The Infection of Clover Root Hair by Nodule Bacteria Studied by Simple Glass Slide Technique. J. Gen. Microbio. 16:374-381.
- Fisher, R.F. y S. R. Long (1992) *Rhizobium*-Plant Signal Exchange. Nature 357:655-659.
- Flores, M., V. Gonzalez., S. Brom., E. Martínez., D. Piñero., D. Romero., G. Dávila. y R. Palacios. (1987) Reiterated Sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. J. Bacteriol. 169:5782-5788.
- García-de los Santos, A. y S. Brom. (1997) Characterization of Two Plasmid-borne *lps* β Loci of *Rhizobium etli* Required for Lipopolysaccharide synthesis and for Optimal Interaction With Plants. Mol. Plant-Microbe. Interact. 10(7):891-902.
- Jímenez-Zurdo, J.I., P. van Dillewijn, M.J. Soto, M.R. de Felipe., J. Olivares y N. Toro. (1995) Characterization of *Rhizobium meliloti* Proline Dehydrogenase Mutant Altered in Nodulation Efficiency and Competitiveness on Alfalfa Roots. Mol. Plant-Microbe. Interact. 8(4):492-498.
- Leemans, J., G. Soberon., M.A. Cevallos., L. Fernandez., M.A. Pardo., H. de la Vega., M. Flores., C. Quinto. y r. Palacios. (1984) General Organization of *Rhizobium phaseoli nif* Plasmids, p.170 In C. Veeger and V.E. Newton (eds) Advances in Nitrogen Fixation Research. Nijhoff, Hunk and Pudoc, The Hage, The Netherlands.
- Levin, B.R. (1993) The Accesory Genetic Elements of Bacteria: Existence Condition and (co)Evolution. Curr. Opi. Genet. Develop. 3:849-854.
- Maier, R.J. y E.W. triplett. (1996) Toward More Productive, Efficient and Competitive Nitrogen-Fixing Symbiotic Bacteria. Crit.rev.Plant. Sci. 15(3):191-234.
- Martínez, E. y M. Rosenblueth. (1990) Increased Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Nodulation Competitiveness of Genetically Modified *Rhizobium* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 56(8):2384-2388.
- Martínez, E., D. Romero. y R. Palacios. (1990) The *Rhizobium* Genome. Plant Sci. 9:59-93.
- Oliveira, L.A. y P.H. Graham. (1990) Evaluation of Strain Competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv.*phaseoli* Using a *nod*⁺ *fix*⁻ Natural Mutant. Arch. Microbiol. 153:305-310.

- Piñero, D., E. Martínez y R.K. Selander. (1988) Genetic Diversity and Relationship Among Isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Appl. Environ. Microbiol. 54:2825-2832.
- Poyton, R.O. y J.E. McEwen. (1996) Crosstalk Between Nuclear and Mitochondrial Genomes. Annu. Rev. Biochem. 65:563-607.
- Quinto, C., H. de la Vega., M. Flores., L. Fernandez., T. Ballado., G. Soberon. y R. Palacios. (1982) Reiteration of Nitrogen Fixation Gene Sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299:724-726.
- Romero, D., P.W. Singleton., L. Segovia., E. Morett., B.B. Bohlool., R. Palacios. y G. Dávila. (1988) Effect of Natural Ocurring *nif* Reiterations on Symbiotic Effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. Appl Environ. Microbiol. 54(3):848-850.
- Romero, D., S. Brom., J. Martínez-Salazar., M.L. Girard., R. Palacios y G. Dávila. (1991) Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli* J. Bacteriol. 173:2435-2441.
- Simon, R. (1984) High Frecuency Mobilization of gram-negative Bacterial Replicons by the *in vitro* Constructed Tn5-Mob Transposon. Mol. Gen. Genet. 196:413-420.
- Smit, G., S. Swart., B.J.J. Iugtenberg y J. W. Kijne. (1992) Molecular Mechanisms of Attachment of *Rhizobium* Bacteria to Plants Roots. Mol. Microbiol 6(20):2897-2903.
- Soberón, M., G.R. Aguilar. y F. Sánchez. (1993) *Rhizobium phaseoli* cytochrome c-deficient mutant induces empty nodules on *phaseolus vulgaris* L. Mol. Microbiol. 8(1):159-166.
- Soto, M.J., A. Zorzano., J. Mercado-Blanco., V. Lepek., J. Olivares. y N. Toro. (1993) Nucleotide Secuence and Characterization of *Rhizobium meliloti* Nodulation Competitiveness Genes *nfe*. J. Mol. Biol. 229:570-576.
- Soto, M.J., A. Zorzano., F.M. García-Rodríguez., J. Mercado-Blanco., I.M. López-Lara., J. Olivares. y N. Toro. (1994) Identification a Novel *Rhizobium meliloti* Nodulation Efficiency *nfe* Gene homolog of *Agrobacterium* Ornithine Cyclodeaminase. Mol. Plant-Microbe. Interact. 7(6):703-707.

- Sprent, I.J. y P. Sprent. (1990) Nitrogen Fixing Organism Ed Chapman and Hall UK. pp. 1-29.
- Streeter, J.G. (1994) Failure of Inoculant Rhizobia to Overcome the Dominance of Indigenous Strains for Nodule Formation. Can. J. Microbiol. 40:513-522.
- Souza, V., L. Eguiarte., G. Avila., R. Cappello., C. Gallardo., J. Montoya. y D. Piñero. (1994) Genetic Structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* Associated with Wild and Cultivated Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 60(4):1260-1268.
- Toro, N. (1996) Nodulation Competitiveness in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. World J. Microbiol. Biotec. 12:157-162
- Triplett, E.W. (1990) The Molecular Genetics of Nodulation Competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3(4):199-206.
- Triplett, E.W. y M.J. Sadowsky (1992) Genetics of Competition for Nodulation of Legumes. Annu. Rev. Microbiol. 46:399-428.
- Ueda, T., Y. Suga., N. Yahiro. y T. Matsuguchi. (1995) Phylogeny of Sym Plasmids of Rhizobia by PCR-Based Sequencing of a *nodC* Segment. J. Bacteriol. 177(2):468-472.
- van rhijn y J. Vanderleyden (1995) The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. Microbiol. Rev. 59(1):124-142.
- Young, J.P.W. y A.W.B. Johnston. (1989) The evolution of Specificity in the Legume-*Rhizobium* Symbiosis. TREE 4(11):341-349.