

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno**

**“ELEMENTOS REGULATORIOS DE LA TRANSCRIPCIÓN  
DE LOS OPERONES REITERADOS DE LA NITROGENASA.  
Análisis en especies de *Rhizobium* nodulantes de frijol”.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**P R E S E N T A**  
**HUMBERTO PERALTA DÍAZ**

**DIRECTOR: DR. JAIME MORA CÉLIS**

**CUERNAVACA, MOR.**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis se desarrolló en el Programa de Ingeniería Metabólica del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (UNAM) con la dirección del Dr. Jaime Mora Célis, a quien agradezco su apoyo y sus enseñanzas que fueron esenciales para mi formación.

Agradezco a los integrantes de mi comité tutorial por sus consejos:

Dra. Gloria Soberón Chávez, IIB-UNAM  
Dr. Jaime Mora Célis, CIFN-UNAM  
Dr. Julio Collado Vides, CIFN-UNAM

Al comité de sinodales por sus comentarios en la revisión de la tesis:

Dr. Jesús Caballero Mellado, CIFN-UNAM  
Dr. Roberto Coria Ortega, IFC-UNAM  
Dr. Roberto Hernández Fernández, IIB-UNAM  
Dr. Jaime Mora Célis, CIFN-UNAM  
Dr. Rafael Palacios de la Lama, CIFN-UNAM  
Dra. Gloria Soberón Chávez, IIB-UNAM  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega, CIB-UAEM

A la Dra. Georgina Hernández Delgado, Directora del CIFN por su apoyo.

A mis profesores de los tópicos del Doctorado del CIFN y del Instituto de Biotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, que me apoyó con una beca de Ayudante de Investigador y con una Cátedra Patrimonial nivel II.

A los investigadores del INIFAP-SAGARPA Dr. Javier Castellanos, Dr. Jorge Acosta e Ing. Aurelio Barrera, que me ayudaron en los experimentos de campo. Al Dr. Leobardo Serrano (Planta Piloto-IBt) por el escalamiento de producción del biofertilizante.

Además otras personas colaboraron directamente en diversas etapas del trabajo. A todas ellas les agradezco su colaboración.

CIFN.

Victor Bustos, por 3 años me ayudó en el trabajo de Lab. Gracias Vic!

Yolanda Mora, Alfonso Leija, Ignacio Alvear, José Luis Zitlalpopoca, Pedro Alonso y Antonia Jaimes, me apoyaron en los experimentos de invernadero y en el análisis de nitrógeno de semillas y plantas.

Sandra Contreras, me ayudó en la secuenciación y en los ensayos con el Qubit.

Maricela Tejeda y Leslie Rincón, me ayudaron en los experimentos de campo.

Araceli Dávalos, realizó parte de la secuenciación y apoyó en la obtención del plásmido con la construcción *pr c nifHcDK*.

Emmanuel Salazar, me ayudó con los *Northern* y *dot blot*.

Gabriela Guerrero, con el análisis de secuencias.

Rosa Icela Santamaría y Patricia Bustos, me ayudaron en la secuenciación.

Dra. Carmen Vargas, realizó la caracterización metabólica de la cepa CIAT652.

Dr. Pedro Burgos, colaboró en la caracterización de la cepa CIAT652.

Drs. Brenda Valderrama y Alberto Mendoza, colaboraron en experimentos iniciales.

Dr. Michael Dunn, revisó el manuscrito.

Drs. Rafael Palacios, Guillermo Dávila, Susana Brom, Victor González y Sergio Encarnación me proporcionaron oligonucleótidos, cósmidos, cepas, secuencias y colaboró en la caracterización metabólica de la cepa CIAT652, respectivamente.

Instituto de Biotecnología.

Dr. Ruben Paul Gaytán, Eugenio López y Santiago Becerra, realizaron la síntesis de los oligonucleótidos.

## **DEDICATORIAS**

A Melitón Peralta y Jorge Calderón

*In memoriam*

También lo dedico a mi mamá Ignacia Díaz Abúndez, a mi esposa Leticia Neria y a mi hija Grecia Carolina, que han sido mi apoyo e inspiración

*Saber no es suficiente  
Debemos aplicar*

*Desear no es suficiente  
Debemos hacer*

Goethe

# CONTENIDO

<b>Resumen</b>	8
<b>Summary</b>	10
<b>Presentación</b>	11
<b>1 Introducción</b>	
1.1 Importancia del nitrógeno y la fijación biológica	12
1.2 Proceso y funcionamiento de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	14
1.3 La enzima nitrogenasa	16
1.4 Sensibilidad de la nitrogenasa a oxígeno	17
1.5 La transcripción dependiente del factor sigma 54 (RpoN)	18
1.6 La regulación de la fijación de nitrógeno	22
1.7 Los operones reiterados de la nitrogenasa <i>nifHDK</i> en <i>Rhizobium etli</i>	24
1.8 Los biofertilizantes y el mejoramiento de la capacidad fijadora de nitrógeno de <i>Rhizobium</i>	26
1.9 Funciones adicionales de NifH	29
<b>2 Objetivos</b>	32
<b>3 Resultados</b>	
3.1 Modificación de la transcripción de la nitrogenasa en <i>R. etli</i> CFN42	35
Artículo: Engineering the <i>nifH</i> promoter region and abolishing poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in <i>Rhizobium etli</i> enhance nitrogen fixation in symbiosis with <i>Phaseolus vulgaris</i>	37-46
3.2 Caracterización de la cepa de <i>Rhizobium</i> sp. CIAT652 simbiote de frijol, con alta capacidad fijadora de nitrógeno y sobreexpresión de la nitrogenasa	47

Fig 1. Hibridación de la cepa CIAT652 con cósmidos del pSim de CFN42	51
Fig. 2 Hibridación de <i>nifH</i> y <i>nifK</i> de CFN42 contra la cepa CIAT652	51
Fig. 3 Comparación de nitrogenasa de las cepas CFN42 y CIAT652	52
Tabla 1. Comparación de la eficiencia simbiótica entre CFN42 y CIAT652	53
Fig. 4 Actividad transcripcional de <i>nifHa</i> y <i>nifHc</i> en la cepa CIAT652	54
Fig. 5 Crecimiento de las cepas CFN42 y CIAT652 en medio mínimo	54
Fig. 6 Consumo de oxígeno de las cepas de <i>Rhizobium</i> en medio mínimo	55
Fig. 7 Crecimiento y producción de PHB de las cepas CFN42 y CIAT652	56
Fig. 8 Poza de ATP de las cepas CFN42 y CIAT652	57
Fig. 9 A) Agregación celular y B) Excreción de ácido glutámico de las cepas CFN42 y CIAT652	57
Fig. 10 Oxidación de la fuente de carbono por las cepas CFN42 y CIAT652	58
Fig. 11 Efecto de la inoculación de la cepa HP789 en frijol, A) Nitrogenasa, B) Peso de plantas, C) Rendimiento de semilla y D) Rendimiento de nitrógeno en semilla	59
Fig. 11E Fotografía del efecto simbiótico de la inoculación con la cepa HP789	60
<b>3.3 Efecto del exceso de poder reductor en el metabolismo de <i>Rhizobium</i> y la expresión de la nitrogenasa</b>	61
Tabla 2. Caracterización fisiológica de las cepas CFN42 y CIAT652 y las cepas derivadas <i>phb</i> -	64
Fig. 12 Ensayo de la fusión <i>nifHD-lacZ</i> en las cepas CFN42 y CIAT652 y las cepas derivadas <i>phb</i> -	65
Fig. 13 Ensayo de la fusión <i>nifA-gusA</i> en A) cultivos de vida libre y B) en simbiosis	65
Fig. 14 Efecto de la inoculación de la cepa HP652 en frijol, A) Nitrogenasa, B) Peso de plantas, C) Rendimiento de semilla y D) Rendimiento de nitrógeno en semilla	66
Fig. 14E Fotografía del efecto simbiótico de la inoculación con la cepa HP652	67
<b>3.4 Ensayos de campo con las cepas modificadas, evaluación de su estabilidad, transferencia de la construcción a cepas competitivas en</b>	68



nodulación y promoción de su uso como biofertilizantes.

Fig. 15 Fotografías de los ensayos de campo con las cepas modificadas	72
Tablas 3-II Resultados de los experimentos de campo con las cepas modificadas de <i>Rhizobium</i>	73-77
<b>4      Discusión y Perspectivas</b>	81
<b>5      Conclusiones</b>	85
<b>Anexo A.</b> Análisis de la activación transcripcional de <i>nifH</i> en <i>Rhizobium</i>	86
Fig. 16 Actividad de la fusión <i>nifH-lacZ</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en las cepas CFN42 y <i>R. tropici</i> CIAT899	88
Fig. 17 Actividad de las fusiones de <i>nifHa</i> y <i>nifHc</i> en <i>S. meliloti</i> 1021 y <i>R. tropici</i> CIAT899	88
<b>Anexo B.</b> Análisis comparativo de las regiones promotoras de <i>nifH</i> de <i>Rhizobium</i>	89
Fig. 18 Alineamiento de la región promotora del operon <i>nifHDK</i> de <i>R. tropici</i> CFN299	92
Fig. 19 Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de <i>nifH</i> de Rhizobiaceas	93
Fig. 20 Arbol filogenético de las regiones promotoras de <i>nifH</i> de Rhizobiaceas	94
<b>6      Referencias</b>	95
<b>7      Abreviaturas usadas</b>	103

## RESUMEN

Por medio de la fijación de nitrógeno algunos organismos procariotes reducen el nitrógeno atmosférico a amonio. Los fijadores simbióticos, como las bacterias *Rhizobium*, son de gran interés debido a que parte del nitrógeno fijado lo transfieren a las plantas leguminosas. Debido a la baja eficiencia del proceso y la alta competencia por nodulación de las cepas nativas del suelo, su uso es todavía limitado. *R. etli* es simbiote del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Mediante el estudio de la regulación de la fijación de nitrógeno de esta bacteria, se determinó que en la cepa tipo de *R. etli* CFN<sub>42</sub> los genes *nifHDK* que codifican la enzima nitrogenasa están presentes en dos reiteraciones, a y b, y una tercera reiteración de *nifH* (denominada c, Quinto *et al.*, 1985). La reiteración c se transcribe varias veces más que las otras dos, pero parece no aportar a la eficiencia simbiótica (Valderrama *et al.*, 1996).

En este estudio, en la cepa CFN<sub>42</sub>, modificamos la regulación transcripcional de la nitrogenasa al colocar uno de sus operones bajo el control regulatorio de la región promotora de la reiteración c. En experimentos de invernadero con frijol, la cepa con la construcción genética provocó incrementos significativos en actividad de nitrogenasa, peso de plantas, rendimiento de semilla, contenido de nitrógeno en semilla y plantas y rendimiento de nitrógeno en semilla. También se transfirió a otras cepas simbiotes de frijol y se ensayaron en invernadero y campo. En campo las cepas modificadas además presentaron incrementos notables en ocupación de los nódulos. Por este motivo, las cepas modificadas tienen potencial como biofertilizantes.

Por otra parte, se determinó que la cepa CIAT652, relacionada con CFN<sub>42</sub>, presentó regiones promotoras similares de los genes de la nitrogenasa, pero tuvo mayor capacidad fijadora de nitrógeno. Se planteó que ello puede deberse a sus características metabólicas. En comparación con *R. etli* CFN<sub>42</sub>, la cepa CIAT652 presentó mayores tasas de oxidación de fuentes de carbono y de pozas de ATP, una mayor cantidad de almacenamiento del polímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y una mayor agregación celular. Lo anterior indica una mayor tendencia a entrar en

un metabolismo parecido al de la simbiosis, lo que posiblemente es responsable de la mayor capacidad fijadora de nitrógeno, respecto a la cepa CFN<sub>42</sub>.

*Rhizobium* acumula PHB en vida libre y en simbiosis, como reservorio de poder reductor y carbono. Una cepa *phb*- derivada de CFN<sub>42</sub>, mostró ligeros incrementos en su capacidad fijadora de nitrógeno. Cuando en esta cepa se sobreexpresó la nitrogenasa, se obtuvo uno de los mayores incrementos en capacidad simbiótica. En cambio, la cepa *phb*- derivada de CIAT652, mostró un fuerte efecto inhibitorio en la fijación de nitrógeno. Se encontró inhibida la expresión del regulador general *nifA* y de los genes de la nitrogenasa. Al sobreexpresar la nitrogenasa en este fondo, se revirtió el efecto inhibitorio de la mutación *phb*-, al derivar el flujo de carbono excedente a la demanda energética de la fijación de nitrógeno y de esta manera se obtuvo una cepa con una de las mayores capacidades fijadoras de nitrógeno entre las reportadas en la literatura.

Para determinar la contribución de los elementos regulatorios de la nitrogenasa, se realizaron ensayos de expresión heteróloga de fusiones reporteras de *nifH* en *Sinorhizobium meliloti* y *R. tropici*. Se determinó que la activación de *nifH* dependió de la semejanza de los elementos presentes en las fusiones, con los del organismo de prueba. Adicionalmente, a partir de la comparación de las regiones promotoras de la nitrogenasa en especies de *Rhizobium* con reiteraciones, se determinó que existen dos tipos de regiones promotoras que principalmente difieren en la distancia entre el sitio de pegado de NifA y el promotor. El análisis reveló que la divergencia de las regiones promotoras se dio por inserciones-delecciones de segmentos cortos.

## SUMMARY

Most of the crops must be fertilized with nitrogen. Nitrogen fixing bacteria, as *Rhizobium*, benefit to the leguminous plants because transfer ammonium to them, avoiding the fertilization. However, the low efficiency of the process and the high nodule competing soil *rhizobia* cause a low utilization in the field.

*Rhizobium etli* strain CFN42, a common bean symbiont, presents two nitrogenase enzyme (*nifHDK*) operons, named a and b, and a third denominated *nifHc*. Reiteration c is transcribed several times more than the other two, but it does not contribute to the symbiotic efficiency.

In order to increase the fixing efficiency, a nitrogenase operon was located under the control of the reiteration c promoter region. In symbiosis with common bean, a strain containing that genetic construct produced an increase in nitrogenase activity, higher weight of plants, higher seed yield, higher nitrogen content in seed and plants and nitrogen yield. Additionally, in field tests strain showed an increased competitiveness for nodulation. When comparing strains with low or high nitrogen fixing abilities, factors as higher oxidation rates, ATP pool, storage of poly-beta-hydroxybutyrate polymer and cellular aggregation, were found important for a higher nitrogen fixing capacity.

We obtained a *Rhizobium* strain with increased nitrogen fixing capacity by overexpressing the nitrogenase enzyme, making possible use it as a biofertilizer, and also were assessed some of the metabolic factors influencing the nitrogen fixation.

## PRESENTACION

La fijación simbiótica de nitrógeno es uno de los fenómenos más interesantes en la naturaleza, debido a que un procariote reduce o fija el nitrógeno casi inerte de la atmósfera y lo convierte en amonio, metabolito que el eucariote hospedero (planta o árbol) recibe y asimila fácilmente, para proveerse del nutriente esencial; a su vez, éste sule a la bacteria con esqueletos de carbono, provenientes de la fotosíntesis y un nicho para desarrollar su función. La fijación del nitrógeno entre bacterias fijadoras y plantas leguminosas, cuyas semillas son ampliamente consumidas por aportar elementos nutritivos como las proteínas, representa una área fundamental de investigación. Desde que en 1888 Martinus Beijerinck obtuvo por primera vez un cultivo puro de *Rhizobium* aislado de nódulos, en esta área de investigación se han obtenido conocimientos importantes para entender este proceso biológico.

El proceso de fijación de nitrógeno es muy complejo y representa un alto costo energético para los microorganismos que lo llevan a cabo. En este proceso participan más de 20 proteínas, aunque el papel central de la catálisis en la reducción de nitrógeno es realizado por las tres proteínas que forman el complejo de la nitrogenasa (NifHDK). Uno de los objetivos fundamentales del área de investigación sobre fijación de nitrógeno es incrementar la capacidad fijadora de la bacteria en la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa.

Para avanzar hacia la aplicación de la investigación básica en el área, en este proyecto se hizo uso del conocimiento generado en el CIFN sobre los factores regulatorios de la transcripción de los operones de la nitrogenasa. El propósito fue modificar la transcripción de la enzima además de conocer mejor otros factores que pueden incidir en la eficiencia simbiótica de la bacteria.

## 1 INTRODUCCION

### 1.1 Importancia del nitrógeno y la fijación biológica

El nitrógeno tiene una participación fundamental en la composición de las biomoléculas. En los organismos vivos es un componente esencial de moléculas como amino ácidos, proteínas y nucleótidos, entre otras. El nitrógeno es abundante en el planeta y constituye el 79% de los gases de la atmósfera. Pero no obstante su abundancia, es el elemento limitante para el desarrollo de los seres vivos, ya que sus formas asimilables como nitratos, nitritos y amonio son muy escasas en la corteza terrestre y la gran mayoría de los organismos no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico. Por fijación o asimilación de nitratos, el nitrógeno pasa a organismos vivos y de éstos a su muerte, por amonificación, al suelo. Una fracción del nitrógeno regresa a la atmósfera por desnitrificación.

Una de las alternativas más eficientes para la incorporación de este elemento a los seres vivos es la fijación de nitrógeno, es decir, la reducción del dinitrógeno en amonio, proceso que realizan únicamente organismos procariotes como las bacterias y arqueas. Por la forma en que fijan nitrógeno, los organismos que realizan el proceso se han dividido en dos grupos: i) Los diazótrofos fijadores de vida libre como *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum* y *Azospirillum*, fijan nitrógeno en ausencia de cualquier otra fuente asimilable de este elemento, ya que este proceso demanda grandes cantidades de energía: se consumen 16 moles de ATP por mol de nitrógeno fijado. Ello representa un alto costo energético y reduce significativamente la eficiencia por lo que este grupo de fijadores aportan sólo una quinta parte del nitrógeno fijado biológicamente; y ii) los fijadores simbióticos que se asocian estrechamente con plantas, árboles o algas y el nitrógeno fijado beneficia preponderantemente al eucariote.

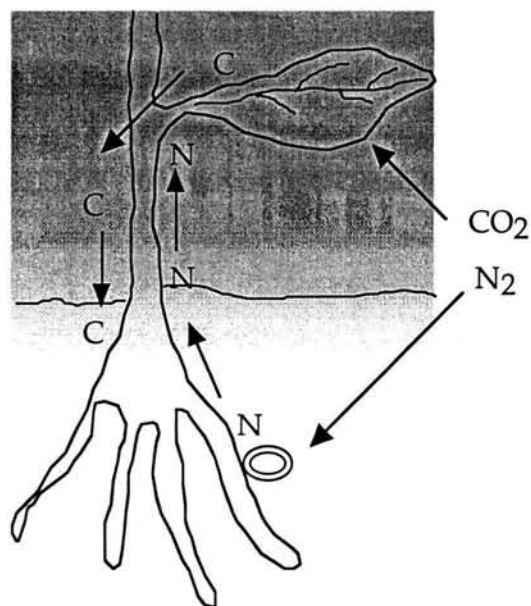
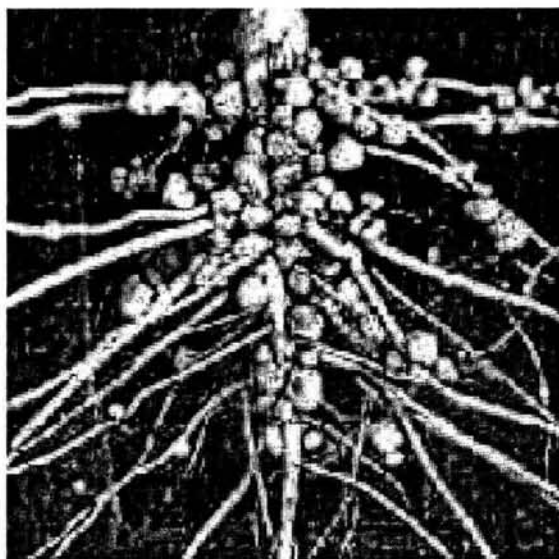


Fig. 1 Raíz de leguminosa nodulada y esquema de la fijación de nitrógeno.

Estos organismos contribuyen con la fracción mayoritaria del nitrógeno fijado biológicamente. La simbiosis más estudiada ha sido la de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* con las leguminosas. Estas bacterias pertenecen a las  $\alpha$ -proteobacterias con géneros como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* y se asocian a la familia de las plantas leguminosas, cuyas semillas se dan en vainas, colonizando formaciones nodulares en la raíz (Fig. 1). Recientemente se descubrieron especies de *Burkholderia* y *Ralstonia*, de la rama de  $\beta$ -proteobacterias, que fijan nitrógeno asociadas a plantas leguminosas (Chen *et al.*, 2003).

El nitrógeno que es suplido por el microorganismo a la planta puede constituir una alta proporción del nitrógeno que ésta requiere, sin embargo, algunas simbiosis, como la de *R. etli* con frijol, pueden ser poco eficientes. A su vez, la planta provee de esqueletos de carbono a la bacteria (que se convierte en bacteroide en el nódulo), manteniéndose entonces un flujo de metabolitos entre

los dos simbioses (**Fig. 1**). El proceso por el que se establece y mantiene la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ha sido ampliamente estudiado (Schubert, 1986).

## **1.2 Proceso y funcionamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa**

La simbiosis es un proceso de comunicación química entre el procarionte y el eucariote que se puede dividir en varias etapas:

**Reconocimiento.** El proceso simbiótico entre *Rhizobium* y las plantas leguminosas inicia con la liberación de compuestos orgánicos, llamados exudados, por las raíces de las plantas. Los exudados son una gran variedad de metabolitos entre los cuales se encuentran flavonas, flavonoides, vitaminas, carbohidratos y otros. Los flavonoides, compuestos aromáticos, son quimioatrayentes para *Rhizobium*. En respuesta a los flavonoides, en la bacteria se induce la transcripción del gene *nodD*, cuyo producto, la proteína NodD, activa la transcripción de los genes que codifican las enzimas que sintetizan los factores de nodulación (Perret *et al.*, 1999). El factor de nodulación es un esqueleto de lipo-quitina-oligo-sacárido con 4 a 5 residuos de N-acetil glucosamina que en el azúcar terminal presenta una cadena de grupos acilo. Las modificaciones en esta estructura, como la longitud de la cadena, cambios en el grupo acilo, y sustituciones (“adornos”) con sulfato, acetato, fucosilo etc., parecen ser determinantes para el rango de infección al hospedero. *Rhizobium* excreta el factor de nodulación, que rápidamente induce una despolarización en la membrana de los pelos radicales de la planta, además se reorganiza el esqueleto de actinas y se detiene el crecimiento del pelo. Posteriormente el pelo se deforma y se inicia la proliferación de células del cortex (Downie y Walker, 1999) (**Fig. 2**).

**Infección.** *Rhizobium* se adhiere a los pelos radicales de la planta, degrada la pared celular y entra en contacto con la membrana plasmática. La planta produce una estructura membranal llamada hilo de infección por el cual la bacteria se introduce hasta el tejido del cortex, siendo liberadas dentro de una membrana peribacteroidal, que es parte del nódulo en formación (**Fig. 2**).



**Formación del nódulo.** El hilo de infección desemboca en el nódulo en formación. Se forma una vesícula en la que las bacterias quedan englobadas. En este punto las bacterias dejan de dividirse pero crecen de tamaño y adoptan formas variadas y entonces se denominan bacteroides (**Fig. 2**).

**Fijación de nitrógeno y senescencia.** Los bacteroides son rodeados por membranas vegetales llamadas peribacteroidales, a través de la que hay un intercambio de metabolitos y se produce el ambiente microaeróbico en el cual el procarionte puede fijar nitrógeno. Este ambiente es favorecido por una proteína de la planta llamada leghemoglobina. El bacteroide recibe compuestos carbonados, posiblemente ácidos dicarboxílicos, y transfiere el amonio, que es asimilado por células vegetales, es transformado en ureidos y llevado al resto de la planta. La fijación de nitrógeno sigue una cinética a través del tiempo y en etapas tardías (30 a 40 días posteriores a la infección) la viabilidad de los bacteroides disminuye, dejan de fijar nitrógeno y son destruidos por las proteasas del nódulo, pero las bacterias presentes en los hilos de infección son liberadas al suelo y así se incrementan sus poblaciones (Broughton y Perret, 1999; Debelle *et al.*, 2001; D’Haeze y Holsters, 2002; Schultze y Kondorosi, 1998; Oke y Long, 1999).

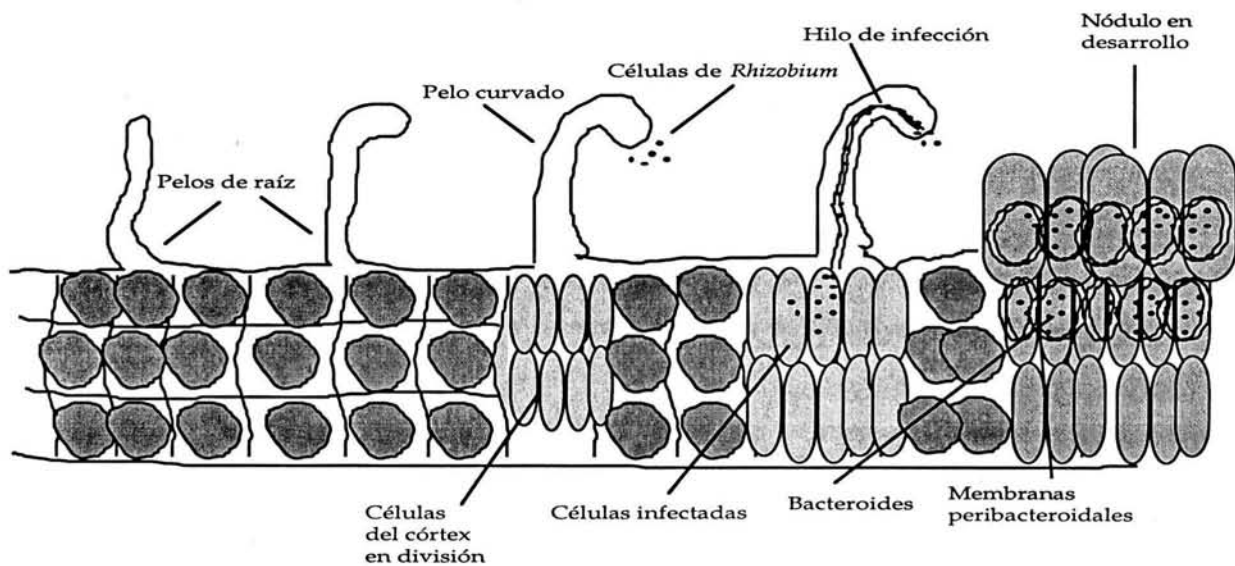


Fig. 2 Proceso de desarrollo del nódulo.

### 1.3 La enzima nitrogenasa

La enzima que cataliza la fijación de nitrógeno es la nitrogenasa, un complejo metalo-enzimático presente solamente en organismos procariotes. La reacción que cataliza es la siguiente:

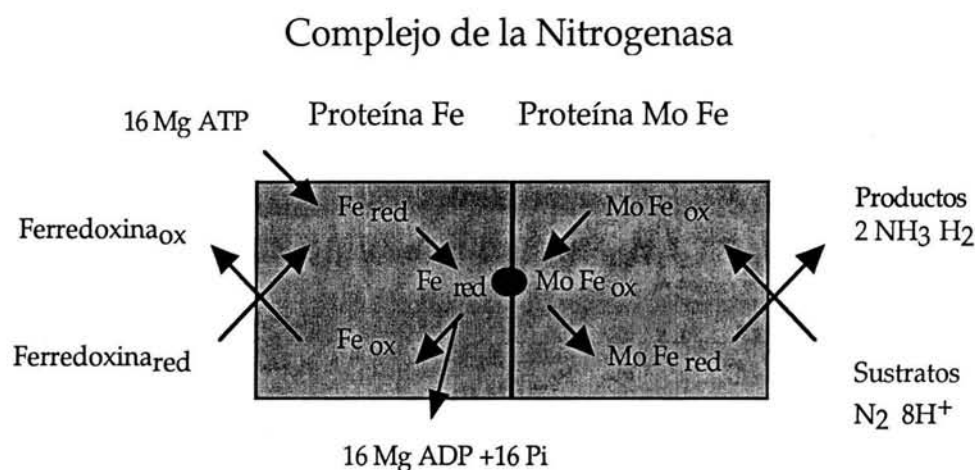
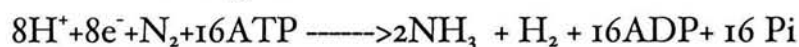


Fig. 3 Esquema de la reacción de la nitrogenasa.

En la **Fig. 3** se encuentra el esquema de la reacción. El complejo de la nitrogenasa está conformado por dos componentes: el componente I, llamado nitrogenasa o proteína hierro-molibdeno (FeMo), es un heterotetrámero de composición  $\alpha_2\beta_2$  con un peso aproximado de 220 000 daltones, como heteroátomos contiene 2 de molibdeno, 32 de hierro y 32 de azufre. Además, presenta dos tipos de centro de oxido-reducción: los centros P y el cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co). Cada molécula de la proteína contiene dos centros P (4Fe:4S) unidos entre sí. El cofactor FeMo consta de dos centros (4Fe:3S) y (1Mo:3Fe:3S) unidos entre sí que constituyen el sitio activo para la reducción del

sustrato. La subunidad  $\alpha$  es codificada por el gene *nifD* y la subunidad  $\beta$  por el gene *nifK*. El componente II, llamado dinitrogenasa reductasa o proteína hierro (Fe), provee específicamente de electrones al componente I y es un homodímero de 60 000 daltones. Entre las dos subunidades se sitúa un centro  $4\text{Fe}:4\text{S}$  que es el donador directo de los electrones. Es producto del gene *nifH* (Igarashi y Seefeldt, 2003). La estructura cristalina de la nitrogenasa, en sus dos componentes ya ha sido dilucidada (Georgiadis *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993).

Se han identificado cerca de 20 proteínas adicionales que participan en el proceso de fijación de nitrógeno. Las proteínas denominadas Nif fueron caracterizadas en *Klebsiella* que es un diazótrofo de vida libre y las proteínas con homólogos en Rhizobiaceas tienen la misma denominación. Empero, las proteínas con el prefijo Fix son exclusivas de este tipo de organismos. Los genes estructurales de la nitrogenasa *nifHDK* se transcriben como operón en varios microorganismos, en diazótrofos de vida libre como *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus*, *Clostridium pasteurianum*, y en fijadores simbióticos como *Sinorhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* y *R. etli* con excepción de *Bradyrhizobium japonicum* en el que *nifH* se encuentra separado del operón *nifDK* (Yun *et al.*, 1986).

#### **1.4 Sensibilidad de la nitrogenasa a oxígeno**

La reacción de la nitrogenasa depende absolutamente de la hidrólisis de ATP y de un ambiente microaeróbico. La enzima es una de las proteínas conocidas más lábiles a oxígeno y los organismos han desarrollado una serie de estrategias para evitar este daño (Gallon, 1981). *Clostridium*, por ejemplo, un anaerobio estricto fijador de vida libre, no crece en presencia de oxígeno y así se evita la degradación de la nitrogenasa. Pero *Azotobacter*, un aerobio estricto, presenta dos mecanismos para enfrentar el reto: *A. vinelandii* incrementa la tasa respiratoria cuando crece en  $\text{N}_2$  como única fuente de nitrógeno y el oxígeno es eliminado al reaccionar con una citocromo oxidasa (Poole, 1994; Poole y Hill, 1997) y en *A. chroococcum* la nitrogenasa oxidada forma un complejo con una flavoproteína para hacerla más estable (Robson, 1979). Las cianobacterias filamentosas, como *Anabaena*, también presentan dos estrategias: una especie como

*A. variabilis* siguen un proceso de diferenciación celular, en aproximadamente un décimo de las células del filamento, éstas células llamadas heteroquistes engrosan su pared celular para impedir el paso del oxígeno, inactivan el fotosistema II que evoluciona oxígeno y fijan nitrógeno, el cual transfieren al resto del filamento. Otras siguen un ciclo diurno para fotosintetizar y nocturno para fijar nitrógeno (Golden y Yoon, 2003). El caso de *Rhizobium* es también interesante, ya que son aerobios estrictos. En el nódulo, se disminuye en gran cantidad la difusión del oxígeno, pero se mantiene disponible mediante la participación de una proteína de la planta, la leghemoglobina (O' Brian y Maier, 1989). El oxígeno juega un papel principal en la regulación del proceso de fijación de nitrógeno (Fischer, 1994).

### 1.5 La transcripción dependiente del factor sigma 54 (RpoN)

Una unidad de transcripción (gene) consta de una secuencia conservada llamada promotor, un sitio de inicio de transcripción, una secuencia codificante y un sitio de terminación. La enzima polimerasa de ARN efectúa la transcripción, esto es, el paso de la información de ADN a ARN para su posterior traducción en cadenas de aminoácidos que conformarán las proteínas. La polimerasa requiere un promotor, que es una secuencia específica de ADN que el factor sigma reconoce y a la que la polimerasa se acopla.

El complejo enzimático de la polimerasa de ARN tiene la conformación  $\alpha_2 \beta \beta' \omega \sigma$ . La especificidad de enzima para iniciar la transcripción está dada por el factor sigma ( $\sigma$ ). El factor sigma vegetativo de *Escherichia coli*, conocido como  $\sigma_{70}$ , reconoce una secuencia promotora específica en la región -35/-10 con respecto del inicio de la transcripción:

-35 TTGACA-N<sub>16/18</sub>-TATAAT -10

Existe otra familia de factores sigma, tipo  $\sigma_{54}$  o  $\sigma_N$ , que es una proteína de 54 000 daltones en *E. coli*, que participa en la transcripción de los genes de la asimilación de amonio, la fijación de nitrógeno, la biosíntesis de flagelo, la degradación de compuestos aromáticos como tolueno y xileno, entre otras

funciones (Reitzer y Schneider, 2001). El gene que lo codifica, *rpoN*, se ha encontrado en bacterias Gram positivas y negativas (Debarbuille *et al.*, 1991) y reconoce el promotor:

-27 TGGCAC-N<sub>5</sub>-TTGCA -10

Las posiciones subrayadas GG (-24, -25) y G (-13) son invariables en todos los casos observados hasta ahora (Barrios *et al.*, 1999). Se ha comprobado que la enzima básica polimerasa de ARN o apoenzima presenta sitios de enlace a factores sigma específicos. El enlace de la apoenzima y el factor  $\sigma_{54}$  se denomina holoenzima y se simboliza E  $\sigma_{54}$ . Cuando E  $\sigma_{54}$  se acopla al promotor conforma un complejo de tipo cerrado y en éste, el complejo provoca una distorsión de la doble cadena de ADN en la posición -12 del promotor (Morris *et al.*, 1994). El complejo cerrado no se isomeriza al abierto de manera espontánea, sino que requiere estrictamente de la energía de la hidrólisis de ATP, mediada por una proteína activadora conocida como *enhancer*, de la familia de activadores NtrC. La energía proveniente de la hidrólisis al parecer se utiliza en promover un cambio conformacional en la holoenzima para formar el complejo abierto (Xu y Hoover, 2001). Con el complejo abierto se puede iniciar la transcripción. Los activadores de la familia NtrC usualmente son dependientes de fase, es decir, es importante la orientación del complejo activador respecto a la polimerasa de ARN localizada en el promotor (Pérez-Martin *et al.*, 1994; Molina-López, *et al.*, 1994) (**Fig. 4**).

El factor sigma 54 contiene tres regiones claramente conservadas; de éstas, la región carboxilo terminal contiene el motivo hélice-vuelta-hélice (HVH) involucrado en el reconocimiento del promotor. A diferencia de  $\sigma_{70}$ ,  $\sigma_{54}$  puede establecer un contacto estable con el promotor en ausencia de la apoenzima. Las funciones de contacto con el promotor y con la apoenzima están contenidas en dos dominios diferentes y separables en la región carboxilo terminal, ya que al deletar los residuos responsables de la unión a la polimerasa, la proteína resultante puede unirse todavía al ADN (Fischer, 1994).

En el grupo de proteínas *enhancers* o activadoras de promotores dependientes del factor  $\sigma_{54}$ , se encuentran NtrC (del par NtrB/NtrC), reguladora de la transcripción de genes de enzimas de asimilación de amonio en enterobacterias; DctD (del par DctB/DctD), reguladora de DctA que es la permeasa específica para el transporte de ácidos dicarboxílicos en *R. leguminosarum* y *S. meliloti* y NifA, reguladora de genes de proteínas participantes en la fijación de nitrógeno, entre otras (Fischer, 1994). Todas estas proteínas contienen dominios funcionales conservados: el dominio amino terminal presenta el módulo receptor de la señal en las proteínas que forman parte de un sistema de dos componentes sensor/activador, pero puede no existir como en el caso de NifA. El dominio central participa en la interacción con  $\sigma_{54}$ . El carboxilo terminal presenta una estructura semejante a hélice-vuelta-hélice involucrada en la unión específica a ADN (Morett y Segovia, 1993).

Las proteínas activadoras comparten el mecanismo para la isomerización del complejo cerrado al unirse a secuencias lejanas al promotor (en las posiciones -70 a -100 bases, anteriores al sitio de inicio de la transcripción), denominadas UAS o *upstream activator sequences*. Se ha comprobado que en la activación por *enhancers* participa una proteína denominada factor de integración al hospedador o *integration host factor* (IHF) que produce un dobléz de las cadenas en la región entre el complejo *enhancer*-UAS y la holoenzima  $E\sigma_{54}$  (Hoover *et al.*, 1990). La región de acoplamiento de IHF al ADN no presenta una secuencia consenso, sino que reconoce una estructura típica del ADN (Lynch *et al.*, 2003). Se considera a la proteína IHF como un regulador global.

El dobléz promovido por IHF se presenta en la mayoría de las activaciones de promotores dependientes de  $\sigma_{54}$  y se han encontrado secuencias de acoplamiento de IHF en las regiones analizadas. La interacción entre la proteína activadora y  $E\sigma_{54}$  se estabiliza mediante la unión específica de IHF. Este fenómeno incrementa la eficiencia de la iniciación de la transcripción de estos promotores de 10 a 30 veces al aumentarse la concentración local del activador o al inducirse una orientación adecuada de interacción. El papel de IHF y la

arquitectura del complejo cerrado, es al parecer, común entre todos los promotores dependientes de  $\sigma_{54}$  (Molina-López *et al.*, 1994) (**Fig. 4**).

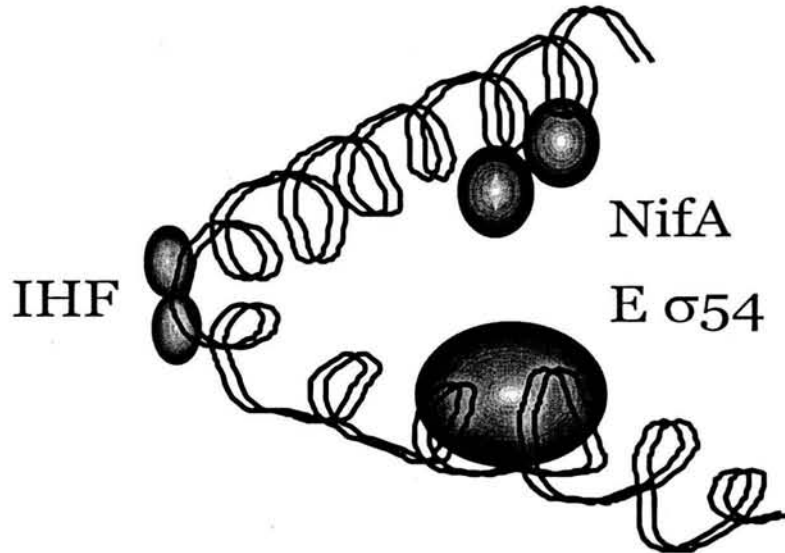


Fig. 4. Modelo para la activación de *nifH*.

NifA, el activador general de la fijación de nitrógeno, aunque no forma parte de un sistema de dos componentes por carecer del sitio de recepción del fosfato en su dominio amino, es completamente funcional. El dominio central contiene, al igual que en las otras proteínas de la familia, el sitio de enlace de ATP y los determinantes de activación. A diferencia de las proteínas NifA de otros organismos, las provenientes de Rhizobiaceas son sensibles a la pérdida de su función por oxidación. Se han localizado entre el dominio central y el carboxilo, cuatro cisteínas muy conservadas que participan en esta oxidación, probablemente al unir algún cofactor metálico aún no identificado. Este mecanismo permite la regulación de la actividad de NifA por oxígeno directamente. El motivo hélice-vuelta-hélice de reconocimiento de UAS se encuentra en su dominio carboxilo. En *Rhizobium* la expresión de los genes de la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) es reprimida en condiciones de oxígeno alto (Batut y Boistard, 1994). En *Klebsiella*,

diazótrofo de vida libre, NifA es inactivada por oxígeno y por la disponibilidad de otra fuente de nitrógeno (Fischer, 1994).

## 1.6 La regulación de la fijación de nitrógeno

El proceso de fijación representa un costo energético alto para la célula. Como se mencionó, *in vitro* se requieren alrededor de 16 moles de ATP por mol de nitrógeno reducido, pudiendo aumentar a cerca del doble *in vivo*. Es de esperarse que el funcionamiento de la fijación, por lo tanto, esté regulado. En fijadores de vida libre como *Klebsiella* y *Azotobacter* el sistema de asimilación de nitrógeno (*ntr*) es el principal regulador. NtrB es la proteína que recibe la señal de la relación Carbono/Nitrógeno de la célula (con la participación de otras proteínas como UT, UR y P<sub>II</sub>) y puede fosforilar a NtrC. La forma fosforilada de NtrC activa la transcripción de los genes de asimilación de nitrógeno y el operón *nifLA*. En condiciones de alto oxígeno, la proteína NifL ejerce un efecto negativo en la transcripción de *nifLA*. En condiciones de microaerofilia, se transcribe el operón *nifLA* y NifA puede acoplarse a regiones anteriores a promotores de los genes *nif* (entre ellos los estructurales de la nitrogenasa, *nifHDK*, entre otros) procediendo la fijación de nitrógeno (Jack *et al.*, 1999, Rudnick *et al.*, 2002). Adicionalmente, a nivel postraduccional NifL tiene un efecto antagonista sobre NifA (Schmitz *et al.*, 2002).

En *Rhizobium*, el principal factor de regulación es el oxígeno y no la disponibilidad de otras fuentes de nitrógeno. El modelo mejor estudiado ha sido el de *S. meliloti*. En este organismo FixL es una proteína transmembranal que recibe la señal del oxígeno y en condiciones microaeróbicas es capaz de fosforilar a FixJ. FixJ fosforilado promueve la transcripción del gene *nifA*, así como la de *fixK*. FixK es un regulador del tipo Fnr, que inhibe la transcripción de *nifA* y la propia, aunque a través de otra proteína denominada FixT (Foussard *et al.*, 1997). Adicionalmente, FixK activa la transcripción de genes como *fixNOQP*, que codifican para la citocromo oxidasa simbiótica Cbb<sub>3</sub>, de alta afinidad por oxígeno y esencial para la respiración del bacteroide. La transcripción de *nifA* en *S. meliloti* depende de dos



promotores, uno proximal, localizado inmediatamente arriba del gene que es dependiente de NifA, y uno localizado más arriba, ligado al operón *fixABCX* y que también depende de NifA. NifA en microaerobiosis activa los genes de fijación simbiótica *nif* (*nifHDK*, y otros) y *fix* (*fixABCX*, y otros) al acoplarse a las secuencias UAS, interaccionando con la holoenzima Eσ<sub>54</sub> para formar el complejo de inicio de la transcripción mediante la hidrólisis de ATP (Fischer, 1994).

En el caso de *R. etli* la regulación se vuelve más compleja, ya que aún cuando están presentes los reguladores FixLJ (un FixL híbrido en la cepa CFN<sub>42</sub>) (Girard *et al.*, 2000), éstos no regulan a *nifA*, y FixL no tiene la capacidad de sensor oxígeno al no contener secuencias para unir al grupo hemo (D'hooghe *et al.*, 1998). FixLJ regulan la expresión de las dos copias de *fixK*, que a su vez regulan la expresión de dos copias del operón *fixNOQP* (en los plásmidos p42d y p42f de la cepa CFN<sub>42</sub>) (Girard *et al.*, 2000). Un nuevo regulador, FnrN, controla la expresión de *fixGHIS*, *arcA* y *fixNOQP* en *R. etli* CNPAF512 (Moris *et al.*, 2004).

En *B. japonicum* se describieron dos nuevos reguladores que participan en la activación transcripcional de *nifA*, denominados RegSR (o RegAB) y que originalmente fueron descritos en *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus* y *Rhodospirillum rubrum* como reguladores maestros de la fijación de nitrógeno, de la fotosíntesis y la fijación de carbono y del funcionamiento de la hidrogenasa (Joshi y Tabita, 1996). En el caso de *B. japonicum*, al parecer una señal de poder reductor es transferida a través de FixNOQP a RegC (o SenC), situada en la membrana, y posteriormente a RegS, que es el factor que inicia la activación de RegR. RegR activa la transcripción de *nifA* y NifA también activa su propia transcripción. En este laboratorio demostramos que en *R. etli* existe el par *regSR* y que hay sitios similares a los que reconoce RegR en *B. japonicum*, en la región inmediatamente arriba de *nifA*, así como sitios de pegado de NifA en esta misma región (R. Díaz y H. Peralta, resultados no publicados). Hay que agregar que en estos dos organismos, NifA se expresa también en condiciones de aerobiosis, lo cual es muy inusual, ya que la proteína es inactivada por el alto oxígeno (Michiels *et al.*, 1994). Sin embargo, al parecer, la proteína producida de esta manera participa en la activación de su propio gene al cambiar las condiciones de aerobiosis a

microaerobiosis, como la propia de los nódulos. NifA también controla la expresión de *rpoN2*, esencial para la simbiosis (Michiels *et al.*, 1998).

### 1.7 Los operones reiterados de la nitrogenasa *nifHDK* en *Rhizobium etli*

CFN<sub>42</sub> es la cepa tipo de *Rhizobium etli* y presenta dos reiteraciones del operón *nifHDK* denominadas a y b (Quinto *et al.*, 1985). Una tercera reiteración está acoplada a un *nifD* truncado y se denomina *nifHc* (Valderrama *et al.*, 1996). Las tres regiones son idénticas por 1100 bases, que cubren el gene *nifH* y un fragmento de *nifD*. La identidad se pierde 6 bases arriba del promotor, ahí la reiteración *nifHc* diverge, mientras que *nifHa* y *nifHb* continúan idénticas por 150 bases más.

El promotor de los tres genes comparte la misma secuencia, siendo de la familia de los promotores dependientes de  $\sigma_{54}$ :

-TGGCACGGGTTTTGAA-

Como se mencionó, las posiciones -25, -24 y -13 (subrayadas) del promotor son invariables en 186 promotores analizados (Barrios *et al.*, 1999). Los cambios producidos en estas posiciones abaten completamente la función del promotor (Merrick, 1993). Los promotores de *nifH* en *R. etli* CFN<sub>42</sub> contienen una particularidad ya que se desvían de la secuencia consenso en la posición -12, al poseer A en vez de C (**Fig. 5**).

Esta composición se presenta también en los promotores de *nifH* de *R. trifolii*, *R. leguminosarum* biovares phaseoli y trifolii y *Rhizobium* sp. NGR234 y *nifN* de *S. meliloti*. Se sabe que cambios de la secuencia consenso en esta posición disminuyen la fuerza de la interacción con el complejo E $\sigma_{54}$  (Morett y Buck, 1989) y, por lo tanto, los promotores *nifH* de *R. etli* podrían ser sitios de baja afinidad para la polimerasa.

En el caso de *nifHa*, su expresión es activada por NifA al unirse a una UAS de secuencia consenso (TGT-N<sub>10</sub>-ACA) localizada en la posición -89 anterior al promotor (Quinto *et al.*, 1985) (**Fig. 5**). Las copias *nifHa* y *nifHc* se transcriben diferentemente, ya que *nifHc* presenta 2.3 veces mayor nivel de expresión que *nifHa* en condiciones de microaerobiosis (1% de oxígeno) y 8 veces más en simbiosis, en determinaciones de fusiones transcripcionales *lacZ* (Valderrama *et al.*, 1996).

Ambos tipos de reiteraciones reducen su transcripción al aumentar la concentración de oxígeno utilizada (Valderrama *et al.*, 1996). Romero *et al.*, 1988 y Valderrama *et al.*, 1996 reportaron que en cepas conteniendo una mutación de *nifHa* la actividad de nitrogenasa se reduce a la mitad, mientras que una cepa conteniendo una mutación en *nifHc* no presenta ninguna diferencia con el control silvestre.

De lo anterior podemos concluir que *nifHc* se expresa diferencialmente respecto a *nifHa* tanto en condiciones de microaerobiosis como en la simbiosis, y en ambas condiciones mantiene una alta expresión.

Comparando la secuencia de las dos regiones regulatorias se puede observar una diferencia en cuanto a su composición, mientras que en *nifHa* la UAS y el promotor están a 90 nucleótidos de distancia (aproximadamente 8.7 vueltas helicoidales), en *nifHc* están a 85 nucleótidos, lo que corresponde a aproximadamente ocho vueltas completas. Se ha sugerido que esta diferencia en distancia es la razón de la activación transcripcional diferencial (Valderrama *et al.*, 1996) (**Fig. 5**).

a TTTGTCTGATCGGCGACATTAGGTTTGGTTGGCAGTTTCTGTGGTGGTTCGGAG-TAACTTTCT  
 c TTTGGCGGTTTCGAGACAAGAG-TTTGTGATC---CCGCCTTCGAAAGTTCGGAATAAATAGCT

UAS

a GAAACCCAACAAAAGGATCTTTCCTTTGGCTCGATCGGCCACATGGCACGGGTTTTGAAGATTG  
 c GAAGATCAGCAAAACAGCTGTTTTATATGCTG---CTGCCACATGGCACGGGTTTTGAAGATTG

IHF

promotor  $\sigma_{54}$

a CCATGCGAGGCGGCGGAGCTGCCTGCCTTTTACTCAGCGATGGATGGAACGAAAGAAGGAAGGC  
 c CCATGCGAGGCGGGGCGAGCTGCCTGCCTTTTACTCAGCGATGGATGGAACGAAAGAAGGAAGGC

a GATATG 200

c GATATG 195



Fig. 5 Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de *nifHa* y *nifHc* ( la región de *nifHb* es idéntica a *nifHa*) de *R. etli* CFN<sub>42</sub>. UAS es el sitio de pegado del activador de la fijación NifA. IHF es el sitio de pegado de la proteína IHF que produce una doblez aguda en el ADN. El promotor  $\sigma_{54}$  muestra la desviación al consenso en la posición -12. La flecha indica el sitio del inicio de la traducción de *nifH*.

## 1.8 Los biofertilizantes y el mejoramiento de la capacidad fijadora de nitrógeno de *Rhizobium*

Los cultivos agrícolas deben ser fertilizados usualmente con nitrógeno, fósforo y potasio, pero en los suelos la escasez principal es de nitrógeno, como ya se mencionó.

La fertilización nitrogenada implica altos costos económicos para el agricultor, pero los efectos más serios de la fertilización masiva en el mundo son ambientales: el deterioro de los suelos, la contaminación ambiental por la fabricación de fertilizantes y la contaminación con productos nitrogenados de mantos acuíferos superficiales y subterráneos. La abundancia de compuestos nitrogenados en el agua produce el fenómeno denominado eutroficación que es el crecimiento anormal de bacterias que utilizan estas ricas fuentes. Con ello agotan el oxígeno disuelto en el agua y producen la muerte masiva de organismos como los

peces. Asimismo, el consumo de agua con alto contenido de compuestos nitrogenados como nitratos y nitritos produce severos daños a la salud humana.

Por lo anterior, uno de los retos más importantes para la agricultura es disminuir el empleo de fertilizantes nitrogenados y reducir su costo pero sin afectar la productividad del cultivo. Actualmente varios cultivos de importancia alimenticia para el hombre se han visto beneficiados con el uso de los biofertilizantes, es decir, el uso de organismos vivos o sus productos para mejorar las cualidades de los suelos que permitan incrementar las cosechas o la calidad de los cultivos. Algunas de las prácticas incluyen: adicionar algas secas al suelo, dejar el rastrojo del cultivo anterior para su degradación, adicionar guano a los suelos o inocular bacterias u hongos.

Entre los biofertilizantes más usados se encuentran los inoculantes en base a bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter*. En cuanto a *Rhizobium* y sus géneros relacionados (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*) su efecto benéfico como biofertilizante se da en las leguminosas, con cerca de 20 mil especies distribuidas en todo el planeta y algunas de interés agrícola como alimento humano o forraje: soya, chícharo, haba, lenteja, frijol, alfalfa, trébol, entre otras y hay reportes sobre efectos benéficos en no leguminosas como betabel, trigo, sorgo y maíz. A este respecto, el cultivo de leguminosas presenta ventajas muy importantes ya que su semilla contiene una alta proporción de proteínas y aminoácidos que pueden constituir el mayor aporte proteico como sucede en la población de México y el resto de América Latina, Africa, Asia y parte de Europa.

La utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno en los cultivos se denomina biofertilización o inoculación y se han usado desde la época del imperio Romano. En la actualidad, su empleo se está promoviendo en varios países. Por ejemplo, en Argentina y Brasil 34 millones de hectáreas de cultivo de soya se inoculan anualmente (J. Caballero, comunicación personal). No obstante, algunos inoculantes presentan baja eficiencia. En México, el frijol es la leguminosa de mayor importancia por la cantidad de consumo y por la calidad nutritiva de la

semilla (Castellanos, 1997) pero no existe un biofertilizante disponible para este cultivo.

Un objetivo importante para varios grupos de investigación ha sido obtener un biofertilizante para plantas con eficiencia mejorada en fijación de nitrógeno, ya que se lograrían beneficios muy importantes, tanto económicos y agrícolas como ambientales. El mejoramiento del proceso de fijación de nitrógeno pudiera ser obtenido mediante el uso de organismos como la bacteria *Rhizobium* modificada genéticamente. Sin embargo, a pesar de las variadas estrategias que se han llevado a cabo, los investigadores han reportado éxitos muy limitados. Entre estos intentos se encuentran los siguientes.

En *R. leguminosarum*, simbiote del chícharo y haba, y otras especies de *rhizobia* el grupo del Dr. Ruiz-Argüeso expresó el regulón de la toma de hidrógeno, uno de los operones que lo conforman es el de la hidrogenasa, con esta función se pretende recuperar parte de la energía que se escapa en la catálisis de la fijación en forma de hidrógeno (Bascones *et al.*, 2000). En *Sinorhizobium meliloti*, simbiote de la alfalfa, Spaink *et al.* (1989) construyeron y expresaron constitutivamente un gene híbrido *nodD* (con segmentos de *S. meliloti* y de *R. trifolii*) con la intención de incrementar la capacidad de nodulación y por ende de la fijación. También en *S. meliloti*, se incrementó el número de copias de los genes responsables del transporte de ácidos dicarboxílicos C<sub>4</sub>, denominados *dct* y la expresión del gene regulador de la fijación *nifA* con la intención de incrementar el flujo de entrada y el metabolismo de ácidos orgánicos como succínico y así aumentar la eficiencia fijadora (Bosworth *et al.*, 1994).

En *R. etli*, simbiote del frijol, se obtuvieron y probaron plásmidos simbióticos recombinantes para lograr conjuntar las mejores propiedades de nodulación y fijación que otorgaban cada uno de ellos por separado (Castillo M, Tesis de Maestría, CIFN). En *R. etli* también se modificó la expresión de los genes que codifican para la citocromo oxidasa simbiótica (*cbb3*) para incrementar la capacidad respiratoria de la bacteria dentro del nódulo (Soberón *et al.*, 1999). En este laboratorio, Cevallos obtuvo una cepa mutante derivada de *R. etli* en la síntesis

del polímero PHB (poli- $\beta$ -hidroxibutirato) con lo que se intentó derivar parte de la energía y poder reductor, no almacenado en el polímero PHB, para la nitrogenasa (Cevallos *et al.*, 1996).

Ninguno de los experimentos anteriores alcanzaron en invernadero un beneficio simbiótico mayor al 22% respecto a la utilización de las cepas de las que derivaron. Recientemente, se reportó la mutación del gene *ntrR* en *S. meliloti* que provocó un incremento del 24% en el nitrógeno en planta en ensayos de invernadero, respecto a la inoculación con la cepa de la que derivó (Olah *et al.*, 2001). Hay que destacar que solamente uno de los experimentos anteriores (Bosworth *et al.*, 1994), se realizó en campo en condiciones controladas. El resto de las cepas mencionadas no cumplen con los requisitos de bioseguridad para la liberación y prueba en campo de microorganismos modificados genéticamente, debido a contener material exógeno como marcadores de resistencia a antibióticos, genes provenientes de otros organismos o secuencias de vectores que no son permitidos para ensayarse en campo ni para usarse como biofertilizantes.

### **1.9 Funciones adicionales de NifH**

Además del papel principal de NifH de transferir los electrones al complejo I de la nitrogenasa (NifDK) para reducir el nitrógeno, la proteína tiene funciones adicionales: participa en la síntesis del cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co) y de su inserción en el complejo I y en la maduración de este mismo complejo (Rangaraj y Ludden, 2002; Rangaraj *et al.*, 1997; Ribbe *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 1987). Adicionalmente, en *A. vinelandii*, se mostró que NifH participa en la protección de la nitrogenasa ante el oxígeno (Thorneley y Ashby, 1989).

Posiblemente debido a lo anterior, en varios microorganismos hay un exceso de *nifH* respecto a *nifDK*. La mayor abundancia de genes de *nifH* respecto a *nifDK* no se ha explicado aún. En algunos organismos diazótrofos se ha determinado que existen copias múltiples de *nifH*, como en *Clostridium sp.*, por ejemplo, se han reportado hasta 5 genes *nifH*, que aún cuando presentan ligeras diferencias en la

región codificante y regulatoria, al parecer provienen de la duplicación del gene (Rosado *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1988).

En *Paenibacillus azotofixans*, dos de las tres copias de *nifH* no están acopladas a *nifDK* (Choo *et al.*, 2003). En fijadores simbióticos los hay con dos operones *nifHDK* (NGR234) (Freiberg *et al.*, 1997) y con tres reiteraciones de *nifH*, dos de ellas acopladas a *nifDK*, como en el caso de *R. trifolii* (Watson y Schofield, 1985), *R. etli* (Valderrama *et al.*, 1996) y *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (Michiels *et al.*, 1994).

Sin embargo, la presencia de reiteraciones no es la única forma de producir un exceso de *nifH*. *Trichodesmium*, una cianobacteria filamentosa, presenta una sola copia de *nifHDK*, y se encontró regulación postranscripcional debida a una estructura de atenuación de la transcripción entre *nifH* y *nifD*, lo cual hace que se produzca mayor cantidad de NifH respecto a NifD (Dominic *et al.*, 1998). También en *B. japonicum* se encontró que se transcribe el doble de *nifH* respecto a *nifDK*. En este organismo *nifH* está separado de *nifDK*, como se mencionó anteriormente (Yun *et al.*, 1986).

En *R. etli* la reiteración *nifHc* se expresa en mucho mayor cantidad que los operones *nifHDK*. La abundancia de NifH en *R. etli* posiblemente participe en la eficiencia fijadora de nitrógeno. Romero en 1988 mostró que la mutación de *nifHc* no tiene fenotipo simbiótico, pero en este Laboratorio, empleando los aparatos Morgan y Qubit para medir la actividad de nitrogenasa *in vivo* mediante electrodos de hidrógeno, determinamos que en días tempranos de la simbiosis, la cepa con la mutación de *nifHc* presentó una menor tasa de actividad de nitrogenasa (S. Contreras y H. Peralta, resultados no publicados). No obstante lo anterior, al parecer la abundancia de NifH, proveniente en gran proporción de la transcripción de *nifHc* no tiene relevancia en la eficiencia final de la simbiosis.

La abundancia del transcrito de *nifH* podría estar relacionado con la mayor demanda de esta proteína por participar en tal variedad de funciones. De manera que para incrementar la actividad de la enzima, al parecer, se requiere forzosamente de una sobreexpresión del resto de los componentes (NifD y NifK).



Postulamos que es necesario incrementar la transcripción de estos genes, que forman parte de la enzima para tener la capacidad de aumentar la actividad de nitrogenasa. Se propuso incrementar la transcripción del operón *nifHDK*, conservando la regulación natural, a través de acoplar los genes *nifHDK* a la región promotora de alta tasa transcripcional de la reiteración de *nifHc*.

En esta Tesis propusimos profundizar en las siguientes cuestiones:

¿Es posible incrementar la capacidad fijadora de nitrógeno de una cepa de *R. etli* a través de la modificación de la regulación transcripcional de *nifH*?

¿Cuál es el papel de las reiteraciones múltiples de la nitrogenasa en *rhizobia* que se asocian con frijol?

¿Cuáles son los determinantes genéticos principales para definir la eficiencia fijadora de nitrógeno entre *rhizobia* simbioses del frijol?

¿Que características comparten las regiones promotoras de *nifH* de *rhizobia* que presentan o no reiteraciones múltiples y son nodulantes de frijol?

Para responder a estas cuestiones se propuso la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos:

## HIPOTESIS

Optimizar la transcripción de la nitrogenasa hará posible obtener cepas de *Rhizobium etli* que mejoren la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo del frijol.

## 2 OBJETIVOS

### GENERAL.

Determinar los factores que intervienen en la transcripción de los operones reiterados de la nitrogenasa (*nifHDK*) y la capacidad fijadora de nitrógeno de bacterias *Rhizobium* que se asocian con frijol.

### PARTICULARES

#### **2.1 Modificar la regulación transcripcional de la nitrogenasa en *Rhizobium etli* CFN42**

A partir de los conocimientos generados en este laboratorio acerca de la regulación transcripcional de la nitrogenasa en la cepa de *R. etli* CFN42, se propuso modificar la expresión del complejo enzimático responsable de la catálisis de fijación de nitrógeno con la intención de mejorar la eficiencia simbiótica de *Rhizobium* con frijol. Se propuso conservar la regulación nativa de los genes y para controlar la transcripción del operón se empleó la región promotora del gene *nifHc*. De esta manera, la construcción genética resultante no presentaría material exógeno. Se propuso estudiar el efecto de esta construcción en cepas de *R. etli* y otras cepas relacionadas, que se asocian con frijol.

#### **2.2 Caracterizar la cepa de *Rhizobium* sp. CIAT652, simbiote de frijol, con una alta capacidad fijadora de nitrógeno y sobreexpresar la nitrogenasa**

La simbiosis de *Rhizobium etli* CFN42 con frijol se considera una de las menos eficientes. Sin embargo, existen otras cepas relacionadas con *Rhizobium etli* que presentan una alta capacidad fijadora de nitrógeno. No se conoce adecuadamente cuáles son los factores que determinan la capacidad fijadora de una

cepa. En este laboratorio se estudia integralmente a la cepa *Rhizobium* sp. CIAT652, una de las mejores cepas silvestres fijadoras de nitrógeno con frijol encontrada a la fecha. Se propuso participar en su caracterización fisiológica, filogenética y simbiótica, así como realizar un análisis de la regulación de la nitrogenasa e intentar aumentar su capacidad fijadora.

### **2.3 Estudiar el efecto del exceso de poder reductor en el metabolismo de *Rhizobium* y la expresión de la nitrogenasa**

Las bacterias *Rhizobium* acumulan el polímero carbonado poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en vida libre y/o en simbiosis. El PHB se considera como un reservorio de carbono y poder reductor. En este laboratorio, se determinó que con la supresión del almacenamiento del polímero PHB en la cepa de *R. etli* CFN42, el flujo de poder reductor y carbono se dirigió en parte hacia la catálisis de fijación de nitrógeno, ya que se observó una mayor actividad de nitrogenasa y un mayor contenido de nitrógeno en la semilla. Se propuso determinar el efecto de la modificación de la expresión de la nitrogenasa en las cepas mutantes *phb*- derivadas de las cepas CFN42 y CIAT652.

### **2.4 Ensayar en campo las cepas de *Rhizobium* simbiotes de frijol modificadas genéticamente para sobreexpresar la nitrogenasa**

Las cepas mejoradas de *Rhizobium* se presentan ante un gran reto cuando se ensayan en condiciones reales de cultivo. Un factor preponderante es la baja capacidad de nodulación de las cepas a ensayar, frente a las poblaciones nativas de *Rhizobium* del suelo. Adicionalmente, la eficiencia mostrada en experimentos de invernadero puede ser reducida importantemente por factores ambientales. Se propuso realizar ensayos de campo con las cepas modificadas obtenidas en este proyecto para evaluar su desempeño y determinar la factibilidad de emplearlas como biofertilizantes del cultivo de frijol.

### **2.5 Realizar un análisis de la activación transcripcional de *nifH* en *Rhizobium***

Para definir la participación de los elementos regulatorios de la nitrogenasa, se propuso realizar un análisis de activación transcripcional empleando fusiones con genes reporteros en especies de *Rhizobium* con o sin reiteraciones de la nitrogenasa. *Sinorhizobium meliloti* es un simbiote de la alfalfa y presenta un operón de la nitrogenasa con un promotor consenso. *R. tropici* se asocia con frijol y tiene una capacidad fijadora similar a *R. etli*, pero no presenta reiteraciones de la nitrogenasa. De la misma manera, *Rhizobium* sp. CIAT652, relacionada filogenéticamente con la cepa CFN<sub>42</sub>, tiene tres reiteraciones de *nifH*, con similares regiones promotoras pero presenta una alta capacidad fijadora de nitrógeno. Se propuso realizar un análisis comparativo de la activación de la transcripción de *nifH* en estos organismos.

## **2.6 Realizar un análisis comparativo de las regiones promotoras de los genes *nifH* de *Rhizobium***

Para determinar si el modelo de activación transcripcional descrito en *Rhizobium etli* CFN<sub>42</sub> puede extenderse a otras especies de *Rhizobium*, que se asocian con frijol con o sin reiteraciones de la nitrogenasa (como *Rhizobium* sp. CIAT652 y *R. tropici*), se propuso llevar a cabo un análisis comparativo entre las secuencias de las regiones promotoras de estos genes. Otros organismos, como *R. trifolii* (simbiote del trébol), *R. leguminosarum* bv *viciae* (simbiote de chícharo y haba) y *Rhizobium* sp. NGR234 también presentan reiteraciones de la nitrogenasa y se incluyeron en el análisis.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Modificación de la transcripción de la nitrogenasa en *Rhizobium etli* CFN<sub>42</sub>

Para determinar si era posible incrementar la transcripción del operón de la nitrogenasa e influir en la eficiencia de la simbiosis entre *R. etli* y frijol, nos propusimos emplear los propios elementos regulatorios de la nitrogenasa en *R. etli*. Como se mencionó en la Introducción, en la cepa tipo de *R. etli* CFN<sub>42</sub> dos reiteraciones del operón de la nitrogenasa *nifHDK* presentan regiones promotoras idénticas, pero una tercera reiteración (*nifHc*) diverge de las dos anteriores y presenta un alto nivel de expresión, aunque su mutación no confiere fenotipo simbiótico notable.

Las tres reiteraciones tienen promotor idéntico y son activadas por NifA. A partir de estos conocimientos, se propuso construir un operón quimérico en el cual el promotor de alta capacidad de transcripción de *nifHc* se acoplara a un operón completo *nifHDK* y evaluar el desempeño de esta construcción en simbiosis con frijol. La construcción genética obtenida, denominada pr c *nifHcDK* consiste de un segmento de 300 bases que contiene la región promotora de *nifHc*, acoplado a un operón *nifHDK*, resultando en 4.5 kb en total.

Los resultados se muestran en el artículo de investigación que acompaña a esta Tesis **Engineering the *nifH* promoter region and abolishing poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*** por Humberto Peralta, Yolanda Mora, Emmanuel Salazar, Sergio Encarnación, Rafael Palacios y Jaime Mora, publicado en *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3272-3281 (junio de 2004).

Destacan los siguientes resultados: la construcción genética para modificar la expresión de la nitrogenasa (denominada pr c *nifHcDK*) se activó en bajo oxígeno

y en nódulo; la expresión de la construcción, ya sea en plásmido estable o incorporado al plásmido simbiótico, logró, en comparación a la inoculación con la cepa silvestre CFN<sub>42</sub> incrementos significativos en actividad de nitrogenasa, peso de plantas, producción de semilla, contenido de nitrógeno en semilla y plantas. Adicionalmente, la apariencia de las plantas reflejó la alta eficiencia fijadora de las cepas con la construcción genética mencionada.

Con este ensayo se confirmó que la sobreexpresión de los genes *nifDK* es clave para poder incrementar la actividad de la enzima. En el artículo se reportó que con la sobreexpresión de *nifH* o de *nifHDK* bajo sus propios promotores sólo se obtiene un efecto intermedio. La construcción para modificar la transcripción de la nitrogenasa se ensayó también en una cepa que no acumula el polímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato y se propuso que el exceso de poder reductor presente en esta cepa se derivó para hacer más eficiente la catálisis de la nitrogenasa.

Una aportación importante fue que para lograr la modificación transcripcional de *nifHDK* se mantuvo una regulación transcripcional propia de la cepa y por tanto la modificación no incorporó elementos genéticos extraños al genoma de *Rhizobium*.

## Engineering the *nifH* Promoter Region and Abolishing Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Accumulation in *Rhizobium etli* Enhance Nitrogen Fixation in Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*

Humberto Peralta,<sup>1</sup> Yolanda Mora,<sup>1</sup> Emmanuel Salazar,<sup>1</sup> Sergio Encarnación,<sup>1</sup>  
Rafael Palacios,<sup>2</sup> and Jaime Mora<sup>1\*</sup>

Departamento de Ingeniería Metabólica<sup>1</sup> and Dinámica del Genoma,<sup>2</sup> Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos CP62271, México

Received 8 December 2003/Accepted 8 March 2004

*Rhizobium etli*, as well as some other rhizobia, presents nitrogenase reductase (*nifH*) gene reiterations. Several *R. etli* strains studied in this laboratory showed a unique organization and contained two complete *nifHDK* operons (copies a and b) and a truncated *nifHD* operon (copy c). Expression analysis of *lacZ* fusion demonstrated that copies a and b in strain CFN42 are transcribed at lower levels than copy c, although this copy has no discernible role during nitrogen fixation. To increase nitrogenase production, we constructed a chimeric *nifHDK* operon regulated by the strong *nifHc* promoter sequence and expressed it in symbiosis with the common bean plant (*Phaseolus vulgaris*), either cloned on a stably inherited plasmid or incorporated into the symbiotic plasmid (pSym). Compared with the wild-type strain, strains with the nitrogenase overexpression construction assayed in greenhouse experiments had, increased nitrogenase activity (58% on average), increased plant weight (32% on average), increased nitrogen content in plants (15% at 32 days postinoculation), and most importantly, higher seed yield (36% on average), higher nitrogen content (25%), and higher nitrogen yield (72% on average) in seeds. Additionally, expression of the chimeric *nifHDK* operon in a poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-negative *R. etli* strain produced an additive effect in enhancing symbiosis. To our knowledge, this is the first report of increased seed yield and nutritional content in the common bean obtained by using only the genetic material already present in *Rhizobium*.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important crop in Mexico after maize and represents the main protein source for large sectors of the population. Bean plants tolerate a wide range of environments and are cultivated from tropical to temperate regions covering up to 2-million hectares in Mexico and 22-million hectares in the rest of the world. Their seeds are consumed either fresh or dry (7). Most of the fields used for their cultivation are fertilized with agrochemicals.

Biological nitrogen fixation is an exclusively prokaryotic process in which atmospheric dinitrogen is converted in an easily assimilable metabolite, ammonia. *Rhizobium* bacteria, and related genera, induce nodules and fix nitrogen in the roots of legumes in a complex regulated process (12). Given the current world food demand, increasing biological nitrogen fixation offers economic, agricultural, and environmental benefits. Improvement of this process can be obtained by the use of genetically manipulated *Rhizobium* bacteria. Historically, researchers have had limited success in trying to improve the *Rhizobium*-legume relationship in agronomically important crops. Strategies used to enhance symbiotic nitrogen fixation include: (i) transgenic expression of hydrogenase uptake in *Rhizobium* strains (1), (ii) construction and expression of a hybrid nodulation regulatory *nodD* gene (31), (iii) increasing

expression of NifA and C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport genes (3), and (iv) obtention of an acid-tolerant *R. leguminosarum* biovar trifolii strain (9). None of these strategies improved nitrogen fixation ability, compared with inoculation with the wild type, more than 20% for any parameter measured.

The common bean is nodulated by different species of *Rhizobium*; the majority of strains isolated from bean nodules in Mexican agricultural fields belong to *Rhizobium etli* (29). The *R. etli* type strain is CFN42. This strain contains three copies of the *nifH* gene (named a, b, and c) which code for the nitrogenase reductase component, two of them (a and b) are linked to the *nifDK* genes which code for dinitrogenase (23, 26). Reiteration c is linked to a truncated *nifD* homolog (*nifD\**) gene (35). The three *nifH* copies are actively expressed during symbiosis although the *nifHDK* operons are expressed at lower levels than the third *nifHc* copy. The nitrogenase activity is encoded by only the two complete *nifHDK* operons in a gene dosage-dependent manner (27). All these genes are located on a 371-kb symbiotic plasmid (pSym) (14).

Both operons a and b are preceded by identical RpoN ( $\sigma$ 54)-dependent promoters and canonical NifA (nitrogen fixation activator)-binding sites named upstream activator sequences located at 90 bp from the promoter (26). The third copy, *nifHc*, is preceded by an identical RpoN-dependent promoter and is activated by NifA bound to a nonconsensus-binding site 85 bp upstream (35). The asymmetric arrangement of regulatory elements could contribute to the *nifH* differential expression observed during symbiosis (35).

Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) is a poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate accumulated by a wide range of rhizobia as a carbon and

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Ingeniería Metabólica, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos CP62271, México. Phone: 52 (777) 3 13 99 44. Fax: 52 (777) 3 17 50 94. E-mail: jmora@cifn.unam.mx.

reductive power storage polymer in free life (32, 34) and/or in symbiosis (18, 19, 38). *R. etli* produces PHB not only in free life but also during symbiosis (8, 10). Although the role of PHB in symbiosis is not well understood, mutation of the *R. etli phaC* gene, the product of which catalyzes the PHB polymerization step, produced a mutant with increased nitrogenase activity and a slight increase in bean seed yield compared to those of the wild-type strain CFN42 (8). Physiological characterization showed that the PHB<sup>-</sup> strain excreted a huge quantity of metabolites, mainly from the tricarboxylic acid (TCA) cycle as fumarate, malate, and 2-oxoglutarate, suggesting that the mutant is unable to oxidize the carbon source present in the growth medium. The PHB<sup>-</sup> strain showed a lower NAD<sup>+</sup>/NADH ratio. The abundance of reduced cofactors is apparently related to the absence of a reductive power sink (PHB) (8). Encarnación et al. (10) proposed that in *R. etli*, PHB serves as a reductive power sequester, so that the TCA cycle continues functioning under microaerobic conditions. The PHB<sup>-</sup> strain shows an increased ability to fix nitrogen (at late stages of symbiosis), in contrast to the notion that PHB could help to prolong or sustain symbiotic nitrogen fixation as proposed by Bergersen et al. (2). In the case of *R. etli*, apparently part of the excess reducing power present in the PHB<sup>-</sup> strain is channeled to nitrogen fixation.

The main purpose of our work was to significantly improve the symbiotic efficiency in the *R. etli*-*P. vulgaris* relationship by an in vitro manipulation approach of the bacterial genetic material, specifically that which encodes nitrogenase enzyme production. In view of the previously mentioned knowledge about *nifH* transcriptional activation, we intended to improve nitrogen fixation efficiency by modifying the nitrogenase genes transcription rate. To increase this rate and at the same time to conserve NifA-dependent regulation, we constructed a chimeric complete nitrogenase *nifHDK* operon coupled to the strong *nifHc* promoter region and expressed it either on a stably inherited plasmid or in the symbiotic plasmid itself. We assessed the effects of such constructions on symbiosis with common bean plants in greenhouse experiments and compared them to those of inoculation with the parent strain. Additionally, the chimeric nitrogenase operon was expressed in a PHB<sup>-</sup> background to determine if the carbon and reducing power not stored in the polymer could be derived to fuel nitrogen fixation.

The improved symbiotic relationship obtained in this way is the highest reported for *R. etli* to date and involves the use of only genetic elements already present in the bacterial genome. Greenhouse experiments with the modified strains support their potential application to obtain better crop yields and more nutritive bean seeds.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and culture media.** Plasmids and strains used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani complex medium (28). *R. etli* strains were grown, as described elsewhere, in peptone-yeast extract (PY) or minimal medium containing 1.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM succinic acid, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.0005% FeCl<sub>3</sub>, with the pH adjusted to 6.8 (5). The following antibiotics were added to the indicated final concentrations (in micrograms per milliliter): kanamycin, 30; nalidixic acid, 20; carbenicillin, 100; and tetracycline, 6 or 10. Plasmids were conjugated into either wild-type *R. etli* CFN42<sup>T</sup> (or streptomycin-

resistant derived strain CE3) or strain SAM100 (*phaC*) by triparental mating with pRK2013 as a helper plasmid (11).

**DNA manipulations.** DNA manipulations, such as isolation, transformation, restriction analysis, agarose gel electrophoresis, and hybridization, were performed by standard procedures (28). DNA fragments were purified from agarose gels with the use of the GeneClean kit (Bio101 Inc., Buena Vista, Calif.) or Wizard PCR Resin (Promega, Madison, Wis.). The Eckhardt method as modified by Hynes and McGregor (17) was used to determine plasmid profiles.

**RNA isolation and dot blot hybridization.** RNA from 18 days postinoculation (dpi) nodules or free-living cells was isolated by phenol extraction (28) and purified with a MicroExpress kit (Ambion, Austin, Tex.) according to the manufacturer's instructions. For dot blot hybridization, the membrane was loaded with samples and fixed with UV light with a StrataLinker 1800 apparatus (Stratagene, La Jolla, Calif.). The *nifH* probe was a 300-bp fragment obtained by PCR with *nifH* forward and *nifH* reverse oligonucleotides (described below). A 16S rRNA gene probe was obtained by PCR with universal oligonucleotides fd1 and rd1 (37). The labeled probes were prepared with <sup>32</sup>P and a MegaPrime kit (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom). Membranes were hybridized at high stringency at 65°C, washed three times with 0.1% sodium dodecyl sulfate in 0.1 × SSC (1 × SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) at 60°C, and then exposed to standard film (28) or on a Phosphor Imager screen for signal quantification in a Molecular Dynamics (Amersham, United Kingdom) scanner.

**Construction of plasmid pHP55.** To produce a chimeric *nifHDK* operon controlled by the *nifHc* promoter region (hereafter referred as *pr c nifHcDK*), the promoter region of the *nifHDKb* operon contained in plasmid pCQ12 (26) was replaced by the *nifHc* promoter region as follows (see Fig. 1). A 1.5-kb fragment containing the *nifHc* promoter region and part of the *nifHc* gene was isolated by digesting pCQ23 (26) with BglII. pCQ12 was digested with BglII and BamHI to eliminate the *nifHDKb* promoter and part of the *nifHb* gene, resulting in loss of a 1.8-kb segment. The largest fragment of that digestion was ligated with the 1.5-kb BglII fragment and a plasmid with the correct orientation was chosen and named pHP40. Since the nucleotide sequence of both *nifHb* and *nifHc* genes are identical, the *nifH* gene formed by the joined fragments remains functional.

The 4.5-kb EcoRI fragment carrying the *pr c nifHcDK* construction from pHP40 was cloned into plasmid pIC20H (22) to produce pHP50. The 4.5-kb SpeI fragment containing *pr c nifHcDK* from plasmid pHP50 was cloned into the XbaI restriction site of the *Rhizobium* stably inherited vector, pTR101, (36) to produce pHP55.

Strain HP55 was obtained by triparental mating with *E. coli* HB101/pHP55 as donor, *E. coli* HB101/pRK2013 (11) as helper, and *R. etli* CFN42 as recipient. Selection was made on PY plates plus nalidixic acid and tetracycline (10 µg ml<sup>-1</sup>).

**Construction of strain HP310 containing the *pr c nifHcDK* chimeric operon.** To obtain double-recombinant *Rhizobium* strains containing the *pr c nifHcDK* construction, we ligated a suicide vector, pWS233 (30), digested with EcoRI, to the 4.5-kb EcoRI fragment carrying *pr c nifHcDK* from pHP40. The plasmid obtained was named pHP100. In the vector XbaI site, we cloned a 1.6-kb PstI-EcoRI fragment bordered by SpeI sites and containing a fragment of the *hemN* gene located downstream of *nifHcD\** genes (35). The plasmid obtained, pHP789, was conjugated to *R. etli* CFN42 with pRK2013 as helper by selection on PY plates with nalidixic acid and tetracycline (6 µg ml<sup>-1</sup>). Selected colonies were cultured overnight in liquid PY and again grown overnight in liquid PY with 10% sucrose, a condition under which cells containing vector sequences were lysed. Surviving cells were plated onto PY plates with nalidixic acid, and a colony was chosen and named HP310.

A *nifH-lacZ* fusion was obtained by cloning the *lacZ-kan* cassette from pKOK6 (20), digested with BamHI, into the BglII site of pHP789. A plasmid with the correct orientation was chosen and named pHP789 lac. Incorporation into HP310 was done by triparental conjugation by selection with tetracycline (6 µg ml<sup>-1</sup>) and kanamycin (30 µg ml<sup>-1</sup>), and colonies selected by growth in liquid PY with 10% sucrose. Surviving cells were selected on PY plates with nalidixic acid and kanamycin (30 µg ml<sup>-1</sup>). A colony showing the incorporation of the cassette into the *nifHb* reiteration by a hybridization assay (data not shown) was chosen and named HP310 lac.

**PCR assays and DNA sequencing.** PCR assays were performed with a GeneAmp PCR kit (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.) following the manufacturer's instructions. Primers used were *nifHc* EcoRV forward (5'-GGC CGG ATA TCG CCT GAG A), *nifHa* forward (5'-CCG TCT GTC GGC TTT GTC TG), *intra-nifH1* reverse (5'-GTA AAA TGC GAT TTG ACG C), *intra-nifH* forward (5'-GAG GAC GTG CTC AAG GCC GGC TAC), *end-nifH* reverse (5'-CAG CAC GCC GAG CTC AGG AAG ATG), *nifD* forward (5'-GGC GTG ATG ACG ATC CG), *nifD* reverse (5'-GCA TTC CGA CTG CAC GC), *nifK* forward (5'-CCA GGC TCT TCC CAT CG), *nifK* reverse



TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<i>R. etli</i>		
CFN42	Wild-type strain, Sm <sup>r</sup> NaI <sup>r</sup>	5
DEM153	CFN42 with a <i>nifHa-lacZ</i> reporter fusion in pSym, Km <sup>r</sup>	35
DEM233	CFN42 with a <i>nifHc-lacZ</i> reporter fusion in pSym, Km <sup>r</sup>	35
SAM100	CFN42 derivative, <i>phaC</i> Km <sup>r</sup>	8
HP55	CFN42 containing pHP55 plasmid, Tc <sup>r</sup>	This work
HP310	CFN42 derivative containing chimeric operon <i>pr c nifHcDK</i> in pSym	This work
HP210	CFN42 derivative containing pHP210 plasmid (pTR101, <i>nifHc</i> with its own regulatory region), Tc <sup>r</sup>	This work
HP220	CFN42 derivative containing pHP220 plasmid (pTR101, <i>nifHDKb</i> with its own regulatory region), Tc <sup>r</sup>	This work
HP310 lac	HP310 derivative containing a <i>nifH-lacZ</i> fusion in the chimeric operon <i>pr c nifHcDK</i> in pSym, Km <sup>r</sup>	This work
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>-</sup> <i>hsd S20-recA</i> 13	4
Plasmids		
pAM341	pTR101, with a fragment containing the <i>nifHc</i> promoter region cloned into the <i>Xba</i> I site, Tc <sup>r</sup>	24
pRK2013	Helper plasmid, ColE1, <i>mob</i> <sup>+</sup> Tra <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	11
pCQ12	pBR328, with a 4.5-kb EcoRI fragment containing the <i>R. etli nifHDKb</i> operon, Tc <sup>r</sup>	26
pCQ23	pBR328, with a 4.2-kb EcoRI fragment containing the <i>R. etli nifHc</i> gene, Tc <sup>r</sup>	26
pTR101	pTR100 (mini-RK2), with a 0.8-kb stability locus, Tc <sup>r</sup>	36
pIC20H	Cloning vector, Amp <sup>r</sup>	22
pKOK6	pSUP202, with a <i>lacZ-kan</i> cassette	20
pWS233	Mobilizable replicon ColE1, Gm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> <i>sacRB</i>	30
pHP40	pCQ12, <i>pr c nifHcDK</i> construction in a 4.5-kb EcoRI fragment	This work
pHP50	pIC20H, with a 4.5-kb EcoRI fragment containing the <i>pr c nifHcDK</i> construct	This work
pHP55	pTR101, containing the <i>pr c nifHcDK</i> construct in a 4.5-kb fragment cloned on an <i>Xba</i> I site	This work
pHP100	pWS233, with a 4.5-kb EcoRI fragment containing the <i>pr c nifHcDK</i> construct cloned into the EcoRI site	This work
pHP789	pHP100, with a 1.6-kb PstI-EcoRI fragment from pCQ23, cloned downstream of the <i>pr c nifHcDK</i> construct	This work
pHP210	pTR101, with a 4.5-kb EcoRI fragment containing the <i>nifHc</i> gene with its own regulatory region	This work
pHP220	pTR101, with a 5-kb EcoRI fragment containing <i>nifHDKb</i> operon with its own regulatory region	This work

(5'-GGC CGG GTT CAC GAC C), and 238 reverse (5'-CGT TCC TGG TTG ATA TCG AGC CAA GGT GTC) located downstream to *nifK*. DNA sequencing of the *pr c nifHcDK* construct in pSym from strain HP310 was done on a 5-kb product obtained with primers *nifHc* EcoRV forward and 238 reverse with HP310 total DNA as template and then with all of the mentioned oligonucleotides as primers to obtain the sequence of the product with a PerkinElmer DNA sequencer.

**Nodulation test, nitrogenase activity, and nitrogen content determination in bean plants and seeds.** Seeds of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa were surface sterilized and germinated as previously reported (5). *R. etli* strains used for inoculation were grown overnight in PY complex medium, washed twice with a 0.85% NaCl solution, and diluted to an  $A_{540}$  of 0.05. Seedlings were planted in groups of five in autoclaved pots containing vermiculite as support material, and then each one was inoculated with 1 ml of bacterial suspension (approximately  $10^6$  cells per plant). As controls, experiments included noninoculated plants fertilized with 10 mM KNO<sub>3</sub>-2 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> or without added nitrogen. Plant growth and watering were carried out under aseptic conditions in a greenhouse.

Greenhouse conditions included temperature of 22 to 28°C and relative humidity of 50 to 60%. Groups of 10 plants for each experimental condition were harvested at 18, 25, and 32 dpi, and the nodule dry weight, nitrogenase activity, total plant dry weight, and nitrogen content were determined for each plant including the noninoculated (control) plants. Bacteria were isolated from nodules, and their identities verified by their antibiotic resistance patterns. Nitrogenase specific activity (expressed as  $\mu$ moles of ethylene h<sup>-1</sup> g of nodule dry weight<sup>-1</sup>) was determined by incubating the detached root with 1/80 (vol/vol) acetylene. Ethylene production was estimated with a model 3300 gas chromatograph (Varian, Middelburg, The Netherlands). Plants or seeds were dried in an oven at 60°C for 3 days. Total nitrogen content of samples from dry plants or seeds was determined with a nitrogen analyzer (model ANTEK 9000; Antek Instruments, Inc., Houston, Tex.) and reported as milligrams of nitrogen per gram of dry plant or per gram of powdered seed. Nitrogen yield was calculated by multiplying the nitrogen content in seed times the yield and is expressed as milligrams of N in seed plant<sup>-1</sup>. Statistical analysis was performed according to the method of Steel and Torrie (33).

**$\beta$ -Galactosidase activity determination in *R. etli* cultures and plant nodules.** Cultures of *R. etli* strains were grown overnight in PY medium, collected, and washed with minimal medium as described above. Flasks containing minimal

medium were inoculated at an initial  $A_{540}$  value of 0.05. Aliquots (20 ml) were injected into 150-ml bottles sealed with rubber stoppers, flushed with several volumes of 1% oxygen-99% argon mixture (analytical grade; Linde, Mexico City, Mexico), and incubated at 30°C with shaking at 200 rpm. Replicas of the cultures were simultaneously incubated in cotton-stoppered flasks to evaluate aerobic conditions. After 8 h, 1-ml samples were withdrawn, centrifuged at  $10,000 \times g$  at 4°C, and resuspended in 1 ml of cold Z buffer for  $\beta$ -galactosidase activity determination as described elsewhere (28). Replica 1-ml samples were pelleted and resuspended in 5% TCA, and their protein content was determined by the method of Lowry et al. (21). Specific activities were reported as nmoles of *o*-nitrophenol minute<sup>-1</sup> milligram of protein<sup>-1</sup>.

Nodules from single plants were crushed in 1 ml of cold Z buffer (28) and centrifuged at 4°C for 5 min at  $8,000 \times g$  in a benchtop centrifuge, and a 0.05-ml aliquot of clear supernatant was transferred to a tube containing 0.95 ml of Z buffer and thoroughly mixed with 2 drops of chloroform.  $\beta$ -Galactosidase activity was measured in a Beckman DU7500 spectrophotometer at 420 nm as recommended by the manufacturer (28). Additional aliquots of the nodule extract (0.05 ml) were precipitated with 0.5 ml of 5% TCA, and the protein content was measured by the method of Lowry et al. (21). Specific activities were reported as nmoles of *o*-nitrophenol minute<sup>-1</sup> milligram of protein<sup>-1</sup>.

**Strain deposition.** The chimeric *pr c nifHcDK* construct, strains containing it, and other relevant sequences have been submitted for patents. Strain HP310 was deposited under accession no. NRRL B-30606 in the Culture Collection of the USDA Agricultural Research Service, Peoria, Ill.

## RESULTS

**Construction and transcriptional expression analysis of the chimeric *pr c nifHcDK* operon.** *R. etli* contains three copies of *nifH* that encode nitrogenase reductase (26, 27, 35). One of these, *nifHc*, is expressed at higher levels than the other two and is induced during nodule development in a NifA-dependent manner (35). Its regulatory region contains an unusual NifA-binding site upstream of the RpoN-dependent promoter,

which differs from the canonical NifA-binding site located upstream from the *nifHa* and *nifHb* copies (35). To construct a chimeric *pr c nifHcDK* operon, the *nifHDKb* genes lacking their promoter were cloned downstream of the *nifHc* promoter and subcloned into the stable vector plasmid pTR101 or the suicide plasmid pWS233 for conjugation, as described in Materials and Methods (Fig. 1). The construct was cloned into plasmid pTR101, which is stably inherited in *R. etli*, and the plasmid obtained was named pHP55 and introduced to CFN42 by a triparental mating. To integrate the construct into the pSym of CFN42, a mating was made with *E. coli* cells containing suicide plasmid pHP789 with the construct. Recombinant cells were grown on PY plates with tetracycline and then grown in PY liquid medium plus sucrose for positive selection of double recombinants, presumably containing no vector sequences. A colony was chosen and named HP310.

To determine the expression of the chimeric *pr c nifHcDK* construct in *R. etli* CFN42, a *nifH-lacZ* fusion was created by inserting a *lacZ-kan* cassette into the BglII site of pHP789 and then introduced by triparental mating into strain HP310.  $\beta$ -Galactosidase activity of the strain containing this fusion, named HP310 lac, was determined in free-living cultures under a low-oxygen atmosphere (1% oxygen, 99% argon) and in symbiosis. This fusion presented a 4.4-fold induction respect to aerobic conditions. Low oxygen is a well-known physiological condition for the NifA-mediated induction of *nifH* (35). For comparison, strains DEM153 (*nifHa-lacZ* in pSym) and DEM233 (*nifHc-lacZ* in pSym) were used (35), and as described above, the *nifHc-lacZ* fusion was more highly expressed (21-fold induction) than the *nifHa-lacZ* fusion (6.5-fold induction) under microaerobic conditions relative to aerobic conditions (Table 2).

$\beta$ -Galactosidase activity from nodules formed by *R. etli* strains carrying the reporter gene fused to *nifH* under the transcriptional control of *pr c* (HP310 lac and DEM233 strains) had the highest values during the early days of symbiosis (11 and 18 dpi). For the latter day, two independent experiments were conducted which gave similar results, and one is shown in Table 2. Activity of the fusion in strain HP310 lac was similar to that of DEM233 at 18 dpi (Table 2).

**Construction and genetic characterization of strains containing the *pr c nifHcDK* chimeric operon.** The chimeric *pr c nifHcDK* operon contained on pHP55 plasmid was transferred to *R. etli* CFN42 and SAM100 (*phaC*) (8) as described in Materials and Methods. Plasmid DNA was extracted from the transconjugants, and the BamHI digestion profile was found to be identical to that of pHP55 (data not shown). An *R. etli* strain with the chimeric operon incorporated into pSym was made by a triparental mating with *E. coli* HB101/pHP789 as donor, *E. coli* HB101/pRK2013 as helper, and *R. etli* CFN42 as recipient, as described in Materials and Methods.

To confirm genetic exchange, we carried out a PCR assay with an upper oligonucleotide designated *nifHc EcoRV* forward, which specifically hybridizes with the *nifHc* promoter region, and a lower oligonucleotide, *nifD* reverse, corresponding to the 3' end of *nifD*. This segment is absent in the wild-type *nifHcD\** reiteration. Only the pHP789 plasmid (Fig. 2A) and strains derived from the mating mentioned contained the expected 1.8-kb fragment; one of these, designated HP310, was selected (Fig. 2A). In contrast, strain CFN42 did not produce

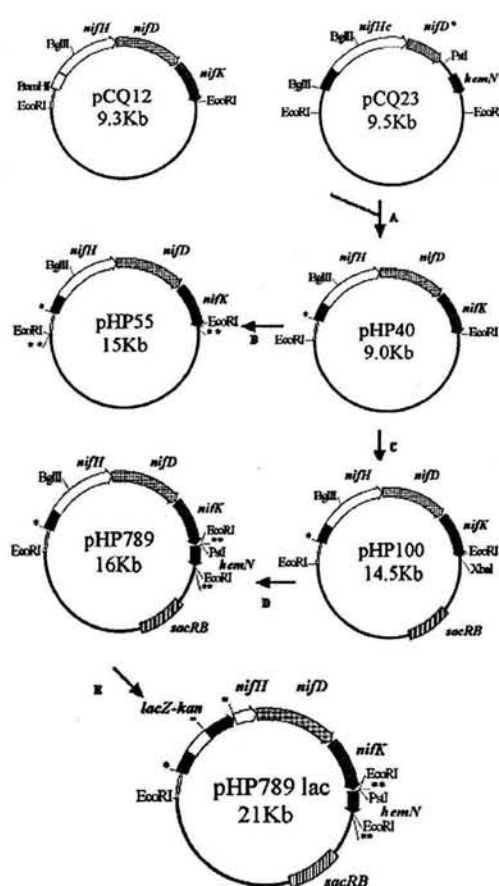


FIG. 1. Scheme of plasmid construction. (A) pCQ12 was digested with BamHI and BglII; the largest fragment was ligated to a 1.8-kb BglII fragment from pCQ23. The promoter region of *nifHDKb* (pr b) is represented by an open box, and the promoter region of *nifHc* (pr c) is represented by a closed box. (B) pHP40 was digested with EcoRI, and the fragment containing pr c *nifHcDK* was cloned into the EcoRI site of pIC20H, which was then digested with SpeI, and the fragment of interest was cloned into the XbaI site of pTR101. (C) pHP40 was digested with EcoRI, and the 4.5-kb fragment containing pr c *nifHcDK* was cloned into the EcoRI site of pWS233, generating pHP100 plasmid. (D) pHP100 was digested with XbaI and ligated into a 1.6-kb SpeI fragment containing part of the *hemN* gene from pCQ23 digested with PstI and EcoRI, obtaining pHP789 plasmid. (E) pHP789 was digested with BglII and ligated to a 5-kb BamHI fragment containing *lacZ-kan* genes. \*, site formed by BamHI-BglII joining; \*\*, site formed by XbaI/SpeI joining; plasmids are not drawn to scale.

a PCR product with this oligonucleotide combination (Fig. 2A). The 1.8-kb fragment was sequenced on both ends, and adequate priming was confirmed (data not shown). The recombinant *nifHDK* operon was obtained by PCR with strain HP310 DNA as template with *nifHc EcoRV* forward and 238 reverse (located downstream of *nifK*) oligonucleotides, and its nucleotide sequence was obtained. The sequence revealed that the *nifHDK* operon was coupled to an intact *nifHc* promoter region (data not shown).

To determine the genetic modifications in *nifHDKb* operon caused by the double-recombination process with plasmid pHP789, we hybridized total DNA digested with BamHI from

TABLE 2. Transcriptional activity of *nifH-lacZ* fusions in free-living cultures and nodules

Strain	Sp act of $\beta$ -galactosidase (nmol of ONP min <sup>-1</sup> mg of protein <sup>-1</sup> ) in <sup>a</sup> :			
	Free living cultures		Nodules	
	1% O <sub>2</sub>	20% O <sub>2</sub>	11 dpi	18 dpi
CFN42	7 ± 2	9 ± 2	NA	65 ± 15
HP310 lac ( <i>nifHc-lacZ</i> )	363 ± 75	82 ± 10	492 ± 137	929 ± 136
DEM153 ( <i>nifHa-lacZ</i> )	136 ± 25	20 ± 3	276 ± 57	372 ± 190
DEM233 ( <i>nifHc-lacZ</i> )	426 ± 40	21 ± 5	1,005 ± 143	1,158 ± 358

<sup>a</sup> Data from free-living cultures are the averages of three different experiments. Nodules from five plants per strain per day were analyzed. Values are means ± standard deviations. NA, not analyzed; ONP, *o*-nitrophenol.

HP310 and CFN42 against *nifH* and *nifK* probes. With BamHI digestion, strain CFN42 presents three *nifH* signals of approximately 9.0, 6.3 and 4.5 kb (26). The first two correspond to *nifHDK* nitrogenase operons a and b. However, in strain HP310, the *nifH* hybridization showed that the wild-type *nifHDKb* band (6.3 kb) was absent and instead the strain contained a 4.8-kb band, very close to the 4.5-kb band corresponding to wild-type *nifHc* (Fig. 2B). A *nifK* hybridization demonstrated that the 4.8-kb band was a complete *nifHDK* operon (Fig. 2B).

Incorporation of the chimeric construct in the *nifHDKb* reiteration was not unexpected because plasmid pHP789 was constructed based on the *nifHDKb* reiteration and a 300-bp fragment belonging to region b remained upstream of the pr c *nifHcDK* construct (Fig. 1). It is possible that this 300-bp segment participated in the recombination process. All isolates obtained by mating with pHP789 and analyzed by hybridization showed the chimeric construct always incorporated into the *nifHDKb* reiteration (data not shown). Furthermore, we hybridized total DNA digested with BamHI from HP310 and CFN42 against a cosmid collection which covers the entire CFN42 pSym sequence (13). In strain HP310 we observed a band of 4.8-kb instead of the 6.3-kb band in the *nifHDKb* region, while the rest of the symbiotic plasmid appeared intact (data not shown). By sequencing downstream of the end of *nifKb*, a single change of one base, which created a BamHI site, was found and was not present in the wild-type sequence (data not shown). The latter explained the reduction in band length.

*R. etli* CFN42 contains six high-molecular-weight plasmids (with DNA sizes of 150 to 600 kb), named p42a to p42f. The symbiotic plasmid is p42d (371 kb) (14). Plasmids p42b and p42a have similar sizes (150 kb) and appear as a doublet (Fig. 2C). Eckhardt plasmid profile analysis revealed that the symbiotic plasmid of HP310 was similar in size to that of CFN42, but that p42a was absent (Fig. 2C). However, the rest of the plasmids appeared intact. Curing of p42a could be due to additional recombination events originated by reiterated identical sequences shared by both replicons p42a and p42d. It has been previously shown that curing of p42a from the wild-type strain does not alter its symbiotic properties (6). A 7-kb fragment of the symbiotic plasmid, upstream of pr c *nifHcDK* in strain HP310, was sequenced and found to be identical to that reported for CFN42 pSym (14), except for a 20-bp deletion located close to a transposase (data not shown). This 7-kb sequence is also present in p42a (G. Dávila and V. González, unpublished data).

**Symbiotic performance of an *R. etli* strain overexpressing nitrogenase.** The nitrogenase expression-enhanced pr c *nifHcDK*

operon harbored on plasmid pHP55 was introduced into strain CFN42, and its symbiotic effectiveness was evaluated on bean plants (Fig. 3). A control CFN42 strain harboring plasmid pAM341 (strain AM341 [24]), containing only the *nifHc* promoter region (pr c) cloned into pTR101, was included in all experiments, and no differences were observed in comparison

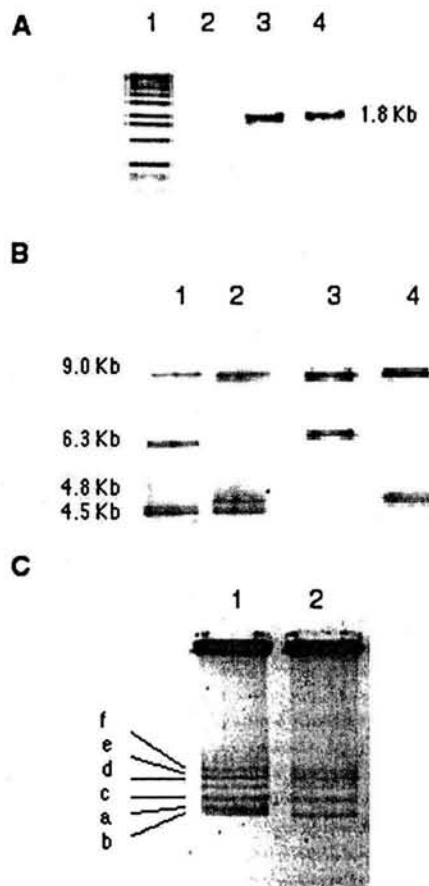


FIG. 2. Genetic characterization of strain HP310. (A) PCR with oligonucleotides *nifHc* EcoRV forward and *nifD* reverse. Lanes: 1, DNA size marker; 2, CFN42; 3, HP310; and 4, plasmid pHP789. (B) Southern hybridization using as probes an intra-*nifH* PCR product (lanes 1 and 2) and an intra-*nifK* PCR product (lanes 3 and 4). Lanes: 1 and 3, CFN42; 2 and 4, HP310. (C) Eckhardt plasmid profile of strains CFN42 (lane 1) and HP310 (lane 2). a to f, plasmids p42a to p42f, respectively.

with CFN42 (data not shown). Three independent assays with each modified strain were performed in the greenhouse. Data presented correspond to a representative experiment. There were no differences between strains with regard to number of nodules and internal (determined by optical microscopy) or external morphology (data not shown). Plants inoculated with HP55 had increases of about 23, 38, and 120% in nitrogenase activity at 18, 25, and 32 dpi, respectively, compared with plants inoculated with the parent strain CFN42, although it was only significantly different at 32 dpi ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3A).

Correlating with the higher nitrogenase activity observed in bean plants inoculated with strain HP55, there was an increase of 25% in plant weight (mean  $\pm$  standard deviation,  $0.56 \pm 0.11$  and  $0.70 \pm 0.13$  g plant<sup>-1</sup> for CFN42 and HP55, respectively) at 32 dpi. For nitrogen content in plants, HP55 had an increase of 15% ( $24.5 \pm 5.9$  mg of N plant<sup>-1</sup>) with respect to CFN42 ( $21.3 \pm 4.7$  mg of N plant<sup>-1</sup>) at 32 dpi. A major difference was observed when seed yields were compared. Plants inoculated with strain HP55 produced a significant increase of 39% (at  $P < 0.05$ ) in seed yield ( $1.49 \pm 0.16$  g of seed plant<sup>-1</sup>) compared with plants inoculated with the parent strain CFN42 ( $1.07 \pm 0.21$  g of seed plant<sup>-1</sup>) (Fig. 3B). Furthermore, it is noteworthy that not only was seed yield increased by the expression of the recombinant *pr c nifHcDK* operon but also the nitrogen content of seeds was increased by 16% (from  $43 \pm 2$  to  $50 \pm 3$  mg of N g of seed<sup>-1</sup> in plants inoculated with strains CFN42 and HP55, respectively) (Fig. 3C). As a result of the increase in yield and nitrogen content in seeds, an increase of 62% in nitrogen yield was obtained with strain HP55 ( $74.5$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>) compared to that with CFN42 ( $46.0$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>). The growth responses of *P. vulgaris* plants (45 dpi) inoculated with strain HP55 compared with plants inoculated with wild-type strain CFN42 are shown in Fig. 3D. More than 99% of the bacteria isolated from strain HP55-induced nodules retained the pHP55 plasmid after 25 or 32 dpi.

**Symbiotic contribution of *nifHc* or *nifHDKb* overexpression in *R. etli*.** To determine the contribution to symbiotic performance of overexpression of *nifHc* or *nifHDK*, and to compare with that produced by *pr c nifHcDK*, we cloned into plasmid pTR101 the respective reiterations of strain CFN42. The plasmids obtained, pHP210 (pTR101, *nifHc*) and pHP220 (pTR101, *nifHDKb*), were incorporated by triparental mating into CFN42 strain and assayed in the greenhouse. The numbers of nodules and the morphology formed by all these strains appeared normal and were similar to those for the wild-type strain CFN42 (data not shown). A dot blot hybridization was made with mRNA extracted from 18-dpi nodules, showing that the *nifH* transcript was more abundant in nodules obtained for HP210 and HP55 inoculation (122 and 106%, respectively) than those formed by CFN42. HP220 presented 25% more *nifH* transcript than CFN42 (Fig. 4). The relative intensity signal was calibrated with use of the 16S rRNA gene.

Nitrogenase activity in bean plants produced by inoculation with strains HP210 and HP220 was slightly increased by 20 and 13%, respectively, while strain HP55 had a significant increase of 68% (at  $P < 0.05$ ), compared with that for strain CFN42 at 18 dpi (Table 3). In plant weight determination (at 32 dpi), HP210 and HP220 produced increases of 39 and 22%, respectively, compared with CFN42. HP55 produced a significant

increase of 50% against CFN42. In regard to seed yield, HP210 and HP220 had increases of 21 and 9%, respectively, compared to CFN42 (Table 3). However, HP55 inoculation produced  $2.50 \pm 0.23$  g plant<sup>-1</sup>; this is a significant increase of 75% compared to that of CFN42. As expected, nitrogen-fertilized plants produced the highest value ( $2.60 \pm 0.48$  g plant<sup>-1</sup> [Table 3]). With regard to nitrogen content in seed, HP220 had higher values than HP210. In this parameter, strain HP55 had an increase of 29% compared to CFN42 strain and 21% more than the nitrogen-fertilized plants. With regard to nitrogen yield, strains HP220 and HP210 had increases of 11 and 33% ( $64.6$  and  $54.0$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>, respectively) compared with CFN42 ( $48.5$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>), while HP55 increased 125% ( $109.0$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>) compared to CFN42 and 16% above nitrogen-fertilized plants ( $93.9$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>). As observed, symbiotic overexpression of *pr c nifHcDK* (HP55) in *R. etli* produced the highest increases in all parameters measured in comparison with results for overexpression of *nifHDKb* (HP220) or *nifHc* (HP210).

**Symbiotic performance of an *R. etli* PHB<sup>-</sup> strain expressing the *pr c nifHcDK* construction.** A PHB<sup>-</sup> *R. etli* strain showed 5- to 21%-higher nitrogenase activity compared with that for wild-type strain CFN42 in late stages of symbiosis with *P. vulgaris* (8). Additionally, increases in seed yield (8%) and nitrogen content in seed (15%) were observed (8). To determine if an additive effect could be obtained by combining the expression of the chimeric *pr c nifHcDK* construct and a PHB<sup>-</sup> background, plasmid pHP55 containing *pr c nifHcDK* was introduced by conjugation into strain SAM100 (8). Strain SAM100 had increases of 29, 13, and 87% in nitrogenase activity at 18, 25, and 32 dpi (Fig. 3A), 4% in plant weight ( $0.58 \pm 0.11$  g plant<sup>-1</sup>), 34% in nitrogen content per plant ( $28.6 \pm 6.6$  mg of N plant<sup>-1</sup>), 60% in seed yield ( $1.71 \pm 0.34$  g plant<sup>-1</sup>), 12% in nitrogen content in seed (Fig. 3C), and 46% in nitrogen yield ( $78.7$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>) with respect to its parent strain CFN42. Nitrogenase activities in bean plants inoculated with SAM100/pHP55 were higher than and significantly different (at  $P < 0.05$ ) from those in plants inoculated with its parent strain SAM100 at 25 and 32 dpi by 82 and 42%, respectively (Fig. 3A). Furthermore, increases of 19% in plant weight ( $0.69 \pm 0.09$  g plant<sup>-1</sup>), 12% in nitrogen content per plant ( $31.7 \pm 5.5$  mg of N plant<sup>-1</sup>), 18% in seed yield (Fig. 3B), 19% in nitrogen content in seed (Fig. 3C), and 32% in nitrogen yield ( $104.3$  mg of N in seed plant<sup>-1</sup>) were observed for SAM100/pHP55 inoculation compared to SAM100 inoculation.

**Symbiotic effect of an *R. etli* strain with the *pr c nifHcDK* construct incorporated into pSym.** We assessed the symbiotic effect on bean plants inoculated with strain HP310, which contains the *pr c nifHcDK* construct in pSym. In the greenhouse, plants inoculated with HP310 had increases of 25, 97, and 44% in nitrogenase activity at 18, 25, and 32 dpi, respectively, compared with plants inoculated with parent strain CFN42 (Fig. 5A), with significant differences obtained at 25 and 32 dpi ( $P < 0.05$ ). HP310 had a significant increase of 38% in plant weight ( $0.76 \pm 0.08$  g plant<sup>-1</sup>) compared with CFN42 ( $0.55 \pm 0.06$ ) (Fig. 5B) at 32 dpi. For comparison, results for noninoculated ( $0.47 \pm 0.08$ ) and fertilized ( $1.11 \pm 0.21$  g plant<sup>-1</sup>) plants are shown in Fig. 5B. Seed yield of plants inoculated with strain HP310 produced a significant increase

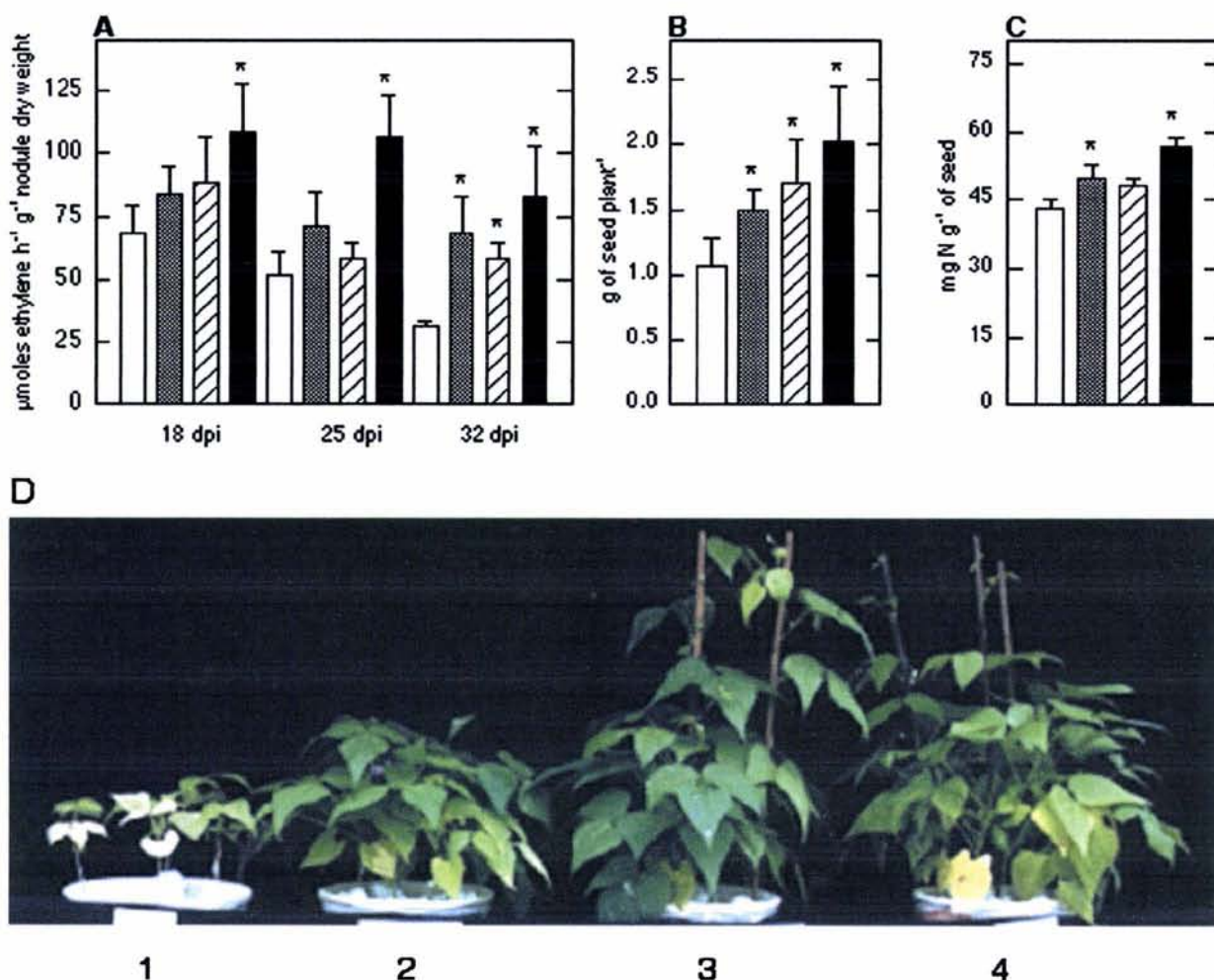


FIG. 3. Symbiotic performance of *R. etli* strains with modified nitrogenase expression construct in greenhouse experiments. (A) Specific nitrogenase activity □ Strains. □, CFN42; ▤, HP55 (pTR101, pr *c nifHcDK*); ▨, SAM100 (*phaC*); ■, SAM100/pHP55 (*phaC*, pTR101, pr *c nifHcDK*). Values are means  $\pm$  standard deviations of a representative experiment with 10 *P. vulgaris* plants for each condition and time ( $n = 30$ ). (B) Seed yield from 10 plants. (C) Nitrogen content in seeds from five plants. Asterisks indicate that the means of the samples are different at ( $P$  of  $<0.05$ ) with respect to CFN42. (D) Growth response of *P. vulgaris* plants (45 dpi) inoculated with *R. etli* strains in the greenhouse. Images: 1, Noninoculated nonfertilized; 2, inoculated with CFN42; 3, inoculated with HP55; 4, noninoculated fertilized with 10 mM  $\text{KNO}_3$ -2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

( $P < 0.05$ ) of 33% ( $1.34 \pm 0.3$  g of seed plant<sup>-1</sup>) compared with that in plants inoculated with the parent strain CFN42 ( $1.01 \pm 0.2$  g of seed plant<sup>-1</sup>). In this case, nitrogen content in seed produced by HP310 was significantly increased by 34% compared with that produced by wild-type strain CFN42 ( $59 \pm 3$  and  $44 \pm 2$  mg of N g of seed<sup>-1</sup>, respectively). Nitrogen yield obtained with HP310 was 81% higher than that obtained with CFN42 (79 and 44 mg of N in seed plant<sup>-1</sup>, respectively). Plants inoculated with HP310 had an appearance similar to those inoculated with HP55 (data not shown).

#### DISCUSSION

Functional analysis of the elements located upstream of the reiterated *nifH* genes in *R. etli* CFN42 revealed an asymmetric arrangement of the regulatory regions of the two *nifHDK* operons (copies a and b) and the third reiterated *nifH* copy (35). Copies a and b are activated by NifA bound to a canonical

binding site, while *nifHc* is activated by NifA bound to a divergent site. This asymmetric arrangement involves a dissimilar facing of the NifA-binding sites located in these promoter regions, which may imply a particular initiation complex architecture resulting in different transcription levels (35). By sequence alignment, a similar arrangement can be found in the reiterated *nifH* regulatory regions of *R. leguminosarum* biovars phaseoli and trifolii and *Rhizobium sp.* strain NGR234, where the NifA binding site in one copy differs by about a half helical turn in distance to its promoter with respect to another copy(ies) (G. Guerrero and J. Mora, unpublished results).

We have found that all strains of *R. etli* analyzed to date carry three *nifH* reiterations, two of them in *nifHDK* operons and the third reiteration linked to a truncated *nifD\** gene (35; B. Valderrama, unpublished results). The third *nifH* gene has been analyzed in two strains closely related to *R. etli* isolated from bean nodules, and the corresponding upstream region

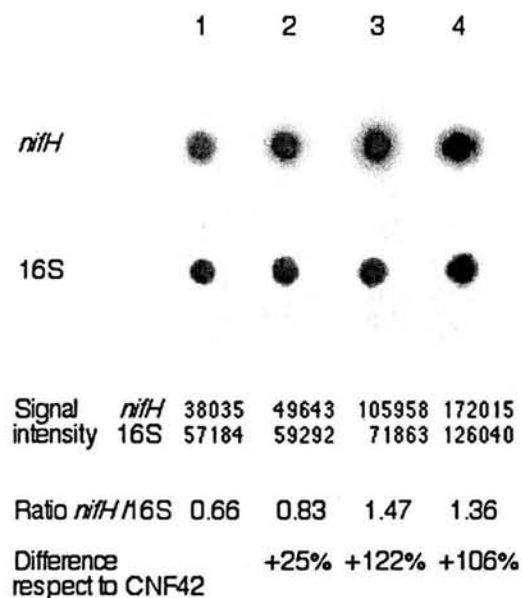


FIG. 4. Dot blot hybridization of mRNA extracted from *P. vulgaris* nodules inoculated with *R. etli* strains at 18 dpi. Lanes: 1, CNF42; 2, HP220; 3, HP210; 4, HP55. Hybridization was done with an intra *nifH* PCR product or 16S DNA as a probe. Intensity signal (in counts) was obtained by exposure in a PhosphorImager screen.

sequence highly resembles that from CNF42 (data not shown). It is important that polar insertions in *nifHc* have no obvious symbiotic phenotype (35).

*Rhizobium* bacteria undergo a complex differentiation process once they infect legume roots. Bacteroids present a particular structural and physiological adaptation to the nodule environment. One of these physiological changes is nitrogenase induction, mediated by the regulatory protein NifA. It has been shown that NifA is produced constitutively even under ex planta conditions, but since it is intrinsically oxygen-sensitive, it is active only under microaerobic or symbiotic conditions (25).

In order to acquire higher expression levels of nitrogenase while preserving its NifA-dependent regulation, we modified such expression by placing one of the reiterated *nifHDK* operons under the control of the stronger *nifHc* promoter region. It

is important that all sequences used in this work are derived from *R. etli*'s own symbiotic plasmid and that no exogenous DNA other than that of the vector was added.

As reported above, the chimeric construct *pr c nifHcDK* was functional under the tested conditions of a low-oxygen atmosphere and in symbiosis (Table 2). It is important that the *nifH* sequence was not altered by the substitution of the promoter region (Fig. 1).

The expression of the chimeric *pr c nifHcDK* operon, either on a *Rhizobium* stably replicating plasmid or incorporated into pSym, produced a better symbiotic performance with *P. vulgaris* plants. The parameters used to assess the symbiosis were nitrogenase activity, dry plant weight, seed yield, and nitrogen content in plants and seeds as described above (Fig. 3 and 5). Furthermore, plant appearance confirmed the enhancement of the symbiotic ability of modified strains HP55 (Fig. 3D) and HP310 (data not shown).

The role of PHB in rhizobial symbiosis is still controversial. The symbiotic relationship between *S. meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) is very successful, given that the plant derives 80% of its nitrogen requirement from symbiotic nitrogen fixation (15). Since *S. meliloti* does not accumulate PHB in symbiosis (16), reductive power not used for PHB synthesis could be used for nitrogen fixation. However, *R. etli* produces PHB in free life and also in symbiosis (8, 10). An *R. etli* PHB<sup>-</sup> mutant produced increased nitrogenase activity in symbiosis and a moderate augmentation in seed yield in comparison with wild-type strain CNF42 (8). Apparently, in this case, part of the reducing power present in the strain was channeled to nitrogenase. By this token, in order to further increase the symbiotic performance of an *R. etli* strain expressing the *pr c nifHcDK* construct, we intended to derive the reducing power excess, produced by the *phaC* mutation, to energize nitrogenase catalysis. As observed above, by combining the latter two characteristics, we obtained a strongly enhanced symbiotic relationship, which gave the highest values of nitrogen fixation reported to date in *R. etli* (Fig. 3). Apparently, this nitrogen fixation effectiveness is the sum obtained by nitrogenase over-expression plus the *phaC* mutation.

According to the results presented, carbon supply to the bacteroid is always in excess under normal nitrogenase activity. The rest of the processes involved in the synthesis of the

TABLE 3. Symbiotic performance of *R. etli* strains with modified nitrogenase expression constructs in greenhouse experiments<sup>a</sup>

Strain or treatment	Nitrogenase activity <sup>b</sup>	Plant dry wt (g plant <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Seed yield (g plant <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	N content in seed (mg of N g <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>
CFN42 (wild type)	64.5 ± 9.2A	0.54 ± 0.13A	1.43 ± 0.13A	33.9 ± 2.3A
HP220(pTR101, <i>nifHDKb</i> )	72.7 ± 12.0A	0.66 ± 0.21AB	1.56 ± 0.32AB	41.4 ± 7.5B
HP210(pTR101, <i>nifHc</i> )	77.3 ± 18.5A	0.75 ± 0.29AB	1.73 ± 0.24A	31.2 ± 3.1A
HP55(pTR101, <i>pr c nifHcDK</i> )	108.2 ± 8.9B	0.81 ± 0.16B	2.50 ± 0.23B	43.6 ± 9.1B
With added N		1.22 ± 0.22C	2.60 ± 0.48B	36.1 ± 2.3AB

<sup>a</sup> Values are means ± standard deviations. Different letters represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Nitrogenase activity is expressed as micromoles of ethylene hour<sup>-1</sup> gram of nodule<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> Dry weight was measured at 18 dpi. Ten plants were dried and weighed at 32 dpi.

<sup>d</sup> Seed yield from 10 plants (80 days old).

<sup>e</sup> Seeds from 5 plants were evaluated.

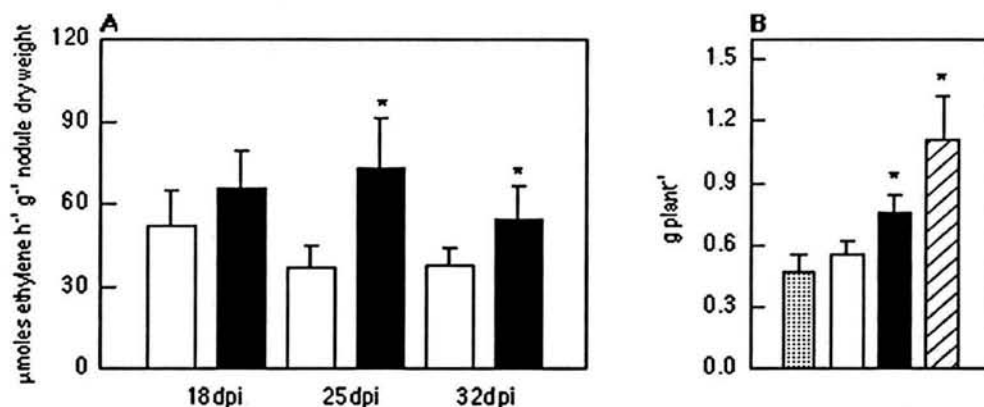


FIG. 5. Symbiotic performance of an *R. etli* strain with a modified nitrogenase expression construct incorporated into pSym. (A) Specific nitrogenase activity of *P. vulgaris* plants inoculated with CFN42 or HP310; (B) plant weight at 32 dpi. Values are means  $\pm$  standard deviations for 10 plants for each condition and time ( $n = 30$ ). Asterisks indicate that the means of the samples are different at  $P < 0.05$ . □, inoculation with CFN42; ■, inoculation with HP310; ▨, noninoculated fertilized with 10 mM  $\text{KNO}_3$ –2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

nitrogenase structural proteins and their assembly are not limited. In addition, it is possible to derive carbon and reductive power to obtain energy for nitrogenase catalysis by abolishing the synthesis of the polymer PHB.

Field testing of the modified strains presented in this work may determine their potential use as a biofertilizer, which could reduce the cost incurred with the application of chemical fertilizers.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants 3309PB, 29025B and 33575N from CONACYT-México. H.P. was the recipient of a Cátedra Patrimonial II award from CONACYT.

B. Valderrama and A. Mendoza participated in initial experimental planning. We thank M. Dunn for critical reviewing of the manuscript; A. Dávalos for help in constructing the pHP789 plasmid; V. Bustos, I. Alvear, and J. L. Zitalpopoca for support in laboratory and greenhouse work; and A. Leija for light microscopy observations. We acknowledge S. Contreras, R. Santamaría, and P. Bustos for support with sequencing and P. Gaytán and E. López (IBT-UNAM) for oligonucleotide synthesis.

#### REFERENCES

- Bascones, E., J. Imperial, T. Ruiz-Argueso, and J. M. Palacios. 2000. Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel *hup* minitransposon. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4292–4299.
- Bergersen, F. J., M. B. Peoples, and G. L. Turner. 1991. A role for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 245:59–64.
- Bosworth, A. H., M. K. Williams, K. A. Albrecht, R. Kwiatkowski, J. Beynon, T. R. Hankinson, C. W. Ronson, F. Cannon, T. J. Wacek, and E. W. Triplett. 1994. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3815–3832.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459–472.
- Bravo, A., and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980–984.
- Brom, S., A. Garcia-de los Santos, L. Cervantes, R. Palacios, and D. Romero. 2000. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* 44:34–43.
- Castellanos, J. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol *Phaseolus vulgaris* en México. *Arch. Latinoam. Nutr.* 47:163–167.
- Cevallos, M. A., S. Encarnación, A. Leija, Y. Mora, and J. Mora. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178:1646–1654.
- Chen, H., A. E. Richardson, E. Gartner, M. A. Djordjevic, R. J. Roughley, and B. G. Rolfe. 1991. Construction of an acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2005–2011.
- Encarnación, S., M. Dunn, K. Willms, and J. Mora. 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177:3058–3066.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648–1652.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394–401.
- Girard, M. L., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 173:2411–2419.
- González, V., P. Bustos, M. A. Ramírez-Romero, A. Medrano-Soto, H. Salgado, I. Hernández-González, J. C. Hernández-Céles, V. Quintero, G. Moreno-Hagelsieb, L. Girard, O. Rodríguez, M. Flores, M. A. Cevallos, J. Collado-Vides, D. Romero, and G. Dávila. 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol.* 4:R36. [online posting date, 13 May 2003.]
- Hardarson, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil* 152:1–17.
- Hirsch, A. M., M. Bang, and F. M. Ausubel. 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif::Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 155:367–380.
- Hynes, M. F., and N. F. McGregor. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4:567–574.
- Kadouri, D., S. Burdman, E. Jurkevitch, and Y. Okon. 2002. Identification and isolation of genes involved in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2943–2949.
- Karr, D. B., J. K. Waters, F. Suzuki, and D. W. Emerich. 1984. Enzymes of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 75:1158–1162.
- Kokotek, W., and W. Lotz. 1989. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* 84:467–471.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- Marsh, J. L., M. Erfle, and E. J. Wykes. 1984. The *pIC* plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32:481–486.
- Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779–1786.
- Mendoza, A., B. Valderrama, A. Leija, and J. Mora. 1998. *NifA*-dependent expression of glutamate dehydrogenase in *Rhizobium etli* modifies nitrogen partitioning during symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:83–90.
- Morett, E., H. M. Fischer, and H. Hennecke. 1991. Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* *NifA* regulatory protein. *J. Bacteriol.* 173:3478–3487.

26. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, M. de L. Girard, E. Calva, and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1170-1174.
27. Romero, D., P. W. Singleton, L. Segovia, E. Morett, B. B. Bohlool, R. Palacios, and G. Dávila. 1988. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. 54:848-850.
28. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
29. Segovia, L., J. P. W. Young, and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:374-377.
30. Selbitschka, W., S. Niemann, and A. Pühler. 1993. Construction of the gene replacement vectors for gram negative bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:615-618.
31. Spaink, H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, T. Tak, L. Goosen-de Roo, E. Pees, A. A. N. van Brussel, and B. J. J. Lugtenberg. 1989. Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid *nodD* product. J. Bacteriol. 171:4045-4053.
32. Stam, H., W. de Vries, A. H. Stouthamer, and H. W. van Verseveld. 1986. Utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. FEMS Microbiol. Lett. 35:215-220.
33. Steel, R. G., and J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y.
34. Tombolini, R., and M. P. Nuti. 1989. Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. FEMS Microbiol. Lett. 60:299-304.
35. Valderrama, B., A. Dávalos, L. Girard, E. Morett, and J. Mora. 1996. Regulatory proteins and *cis*-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. J. Bacteriol. 178:3119-3126.
36. Weinstein, M., R. Roberts, and D. Helinski. 1992. A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in planta inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. J. Bacteriol. 174:7486-7489.
37. Weisburg, W., S. Burns, D. Pelletier, and D. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.
38. Wong, P. P., and H. J. Evans. 1971. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. Plant Physiol. 47:750-755.



### **3.2 Caracterización de la cepa de *Rhizobium* sp. CIAT652, simbiote de frijol, con alta capacidad fijadora de nitrógeno y sobreexpresión de la nitrogenasa**

No se conoce adecuadamente qué factores son preponderantes para determinar la mayor o menor capacidad fijadora de nitrógeno de cepas de *Rhizobium*. La cepa tipo de *R. etli*, la cepa CFN42, presenta una baja eficiencia fijadora. Sin embargo, otras cepas de *Rhizobium*, como la cepa *Rhizobium* sp. CIAT652 también simbiote del frijol, tienen una alta capacidad fijadora. Para definir los factores que son determinantes en el proceso de fijación de nitrógeno, realizamos la caracterización filogenética, metabólica y simbiótica de la cepa de *Rhizobium* sp. CIAT652 y la comparamos con la cepa CFN42.

La cepa de *Rhizobium* sp. CIAT652 fue aislada en Palmira, Colombia, en 1974 y forma parte de la colección de cepas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colombia). Se emplea como inoculante de frijol en Costa Rica, junto con otras cepas, como CIAT151, CIAT613, relacionadas con *R. etli* y CR436 y CR477, relacionadas con *R. tropici*.

#### **A) Caracterización genética.**

La secuencia del gene 16S ribosomal de la cepa CIAT652 presentó un 99% de identidad en comparación con la cepa de *R. etli* CFN42, por lo que podría considerarse como perteneciente a la especie. La secuencia está depositada en la base de datos de NCBI con el número de acceso AF313906 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sin embargo, al analizar la expresión de proteínas del organismo mediante geles de 2 dimensiones (2D-PAGE) se encontró que tenían un coeficiente de correlación de 0.42, esto es, solamente el 42% de las proteínas son similares en los dos organismos. Adicionalmente, al realizar el perfil de 13 enzimas metabólicas por la técnica de electroferotipos (Wang *et al.*, 1998), se obtuvo una correlación de 0.55. Por tanto, se consideró que es cercanamente relacionada a *R. etli*. Una característica especial de los géneros *Rhizobium* es que presentan una gran cantidad de material genético en plásmidos. La cepa CFN42 tiene 6 plásmidos, denominados p42a a p42f, con rangos de tamaño de 150 a 600

kb. La cepa CIAT652 presentó 3 plásmidos, uno de 700 kb y dos de 450 kb. Uno de los plásmidos de 450 kb es el pSim ya que hibridó contra una sonda del gene *nifH*. Se hibridó también contra la colección de cósmidos cGD (ver artículo), que cubren el pSim de la cepa CFN42 y se encontró que los 16 cósmidos están representados en el pSim de la cepa CIAT652 (**Fig. 1**). En esta etapa participaron el Dr. Pedro Burgos y la Dra. Esperanza Martínez.

La cepa CIAT652 también presentó 3 reiteraciones del gene *nifH*, dos de ellas están acopladas a los genes *nifDK*, formando operones completos y la tercera reiteración está trunca, de una forma similar a la cepa CFN42 (**Fig. 2**). Las regiones promotoras de los genes *nifH* mostraron elementos similares a los presentes en la cepa CFN42, con niveles de 97% de identidad, en promedio. Los promotores y las secuencias UAS son idénticas y las últimas están localizadas a la misma distancia del promotor, que en las reiteraciones *nifH* de la cepa CFN42. La secuencia de la región promotora de *nifHc* de la cepa CIAT652 se depositó en la base de datos de NCBI con el número de acceso AF314051.

## **B) Caracterización simbiótica.**

En la simbiosis con frijol, la cepa CIAT652 presentó cerca de 10 veces mayor abundancia en hilos de infección, respecto a la cepa CFN42, lo cual puede ser importante en la eficiencia simbiótica observada. Presentó una mayor actividad de nitrogenasa en los cultivares de frijol ensayados como Negro Jamapa, Flor de Mayo, Pinto Villa y Flor de mayo Elisa (**Fig. 3**). La cepa CIAT652 presentó una cinética fijadora diferente a la cepa CFN42, en cuanto a que en etapas tardías de la simbiosis presentó nuevos picos de actividad de nitrogenasa (**Fig. 3**). También, las plantas rindieron más semilla y al analizar el nitrógeno en la semilla se observó una mayor concentración de nitrógeno en comparación con la semilla producida por plantas inoculadas con la cepa CFN42 (**Tabla 1**). El rendimiento de nitrógeno representa el contenido de nitrógeno multiplicado por la producción y pueden verse diferencias notables entre los cultivares. En el cultivar Flor de Mayo Elisa la cepa CIAT652 mostró el mayor incremento en este parámetro respecto a la cepa CFN42, pero en la variedad Negro Jamapa se obtuvieron los más altos rendimientos de nitrógeno. Por otro lado, la cepa CIAT652 es menos competitiva

en nodulación que la cepa CFN<sub>42</sub> en pruebas de invernadero 1:1, ya que ocupó solamente 33% de los nódulos, en promedio, en los cultivares analizados. Esta parte del trabajo fue desarrollado por la Q. Yolanda Mora, el M. C. Alfonso Leija y el Dr. Pedro Burgos. En ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales *nifH-lacZ* de *R. etli* CFN<sub>42</sub> en vida libre a bajo oxígeno, se encontró que en la cepa CIAT652, la fusión de la reiteración *nifHc* se expresó cerca del doble a como lo hace en la cepa CFN<sub>42</sub>, mientras que la fusión de la reiteración *nifHa* se expresó en niveles similares en ambas cepas (**Fig. 4**).

### C) Caracterización metabólica.

Al subcultivar la cepa CFN<sub>42</sub> en medio mínimo, deja de crecer al tercer subcultivo (Encarnación *et al.*, 1995). Este comportamiento también lo presentó la cepa CIAT652. Otras cepas de *R. etli* muestran el mismo fenotipo. Al parecer ello es un indicio de que la bacteria entra en un metabolismo tipo fermentativo, que es semejante al de los bacteroides en la simbiosis. Tanto en medio mínimo con los ácidos succínico o piruvico como fuentes de carbono, la cepa CIAT652 mostró un crecimiento menor que la cepa CFN<sub>42</sub> (**Fig. 5**). En experimentos previos con otras cepas de *Rhizobium* se encontró que el consumo de oxígeno está en relación directa con la velocidad de crecimiento. Para determinar si esto sucedía también en la cepa CIAT652, se determinó el consumo de oxígeno en medio mínimo suplementado con ácido succínico y se encontró que en estas condiciones era menor (**Fig. 6**). Es interesante notar que en medio mínimo suplementado con succínico o piruvico, la producción de PHB por la cepa CIAT652 fue mayor, respecto a la cepa CFN<sub>42</sub> (**Fig. 7**). Además, la cepa CIAT652 mostró menor actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa, que es clave en el metabolismo aeróbico (ver Tabla 2, sección siguiente). La cepa CIAT652 presentó mayores pozas de ATP (**Fig. 8**), y oxidó más rápidamente el ácido succínico (**Fig. 10**). En este ensayo se empleó el método descrito por Encarnación y colaboradores (1998) con (1, 4 <sup>14</sup>C)-ácido succínico marcado radiactivamente. Las pozas de reductantes, como NADH y NADPH, fueron menores, en comparación con la cepa CFN<sub>42</sub>. Además, presentó una mayor agregación celular y excreción de ácido glutámico en subcultivos de medio mínimo (**Fig. 9**). Esta etapa fue realizada por el Dr. Sergio Encarnación y la Dra. Carmen Vargas.

En comparación con la cepa CFN42, la cepa CIAT652, creció menos pero acumuló mayores pozas de ATP y de PHB y entró en fermentación más fácilmente. Un indicio de este metabolismo fue la mayor excreción de ácido glutámico que es responsable de la agregación celular.

De estos resultados se puede observar que aún cuando ambas cepas comparten un fondo genético similar, que están cercanamente relacionadas filogenéticamente, que presentan similares elementos regulatorios de la nitrogenasa y material genético de plásmido simbiótico, existen diferencias claves en la capacidad metabólica de la cepa CIAT652, posiblemente esto le permite tener un mejor desempeño en la fijación de nitrógeno. Estos resultados se publicarán en el trabajo en preparación **Proteomic and symbiotic characterization of *Rhizobium* strains used in Central America as *Phaseolus vulgaris* L. inoculants**, por Y. Mora, P. Burgos, S. Encarnación, M. del C. Vargas, H. Peralta, E. Martínez-Romero, A. Leija, J. Castellanos y J. Mora.

Para evaluar la posibilidad de modificar la regulación de la nitrogenasa en esta cepa, se empleó la construcción quimérica pr c *nifHcDK* en plásmido estable o incorporada en el pSim de la cepa CIAT652. Con ambas estrategias se obtuvieron resultados similares. Se muestran los resultados obtenidos con la incorporación al pSim. La cepa resultante se denominó HP789. La expresión de la construcción logró incrementos de 20% en la actividad de nitrogenasa, de 20% en peso de plantas y de 15% en producción y en el contenido de nitrógeno en la semilla (**Fig. II, A, B, C y D**). En la fotografía de la **Fig. II E** puede observarse el efecto benéfico de la simbiosis con la cepa HP789.

La cepa CIAT652 ya es una buena fijadora de nitrógeno pero con la presencia de la construcción pr c *nifHcDK* se logró aumentar la eficiencia simbiótica de la cepa. Como se muestra en la fotografía, y en los resultados obtenidos, la presencia de la construcción influyó en el aspecto y peso de las plantas y el rendimiento de semilla.

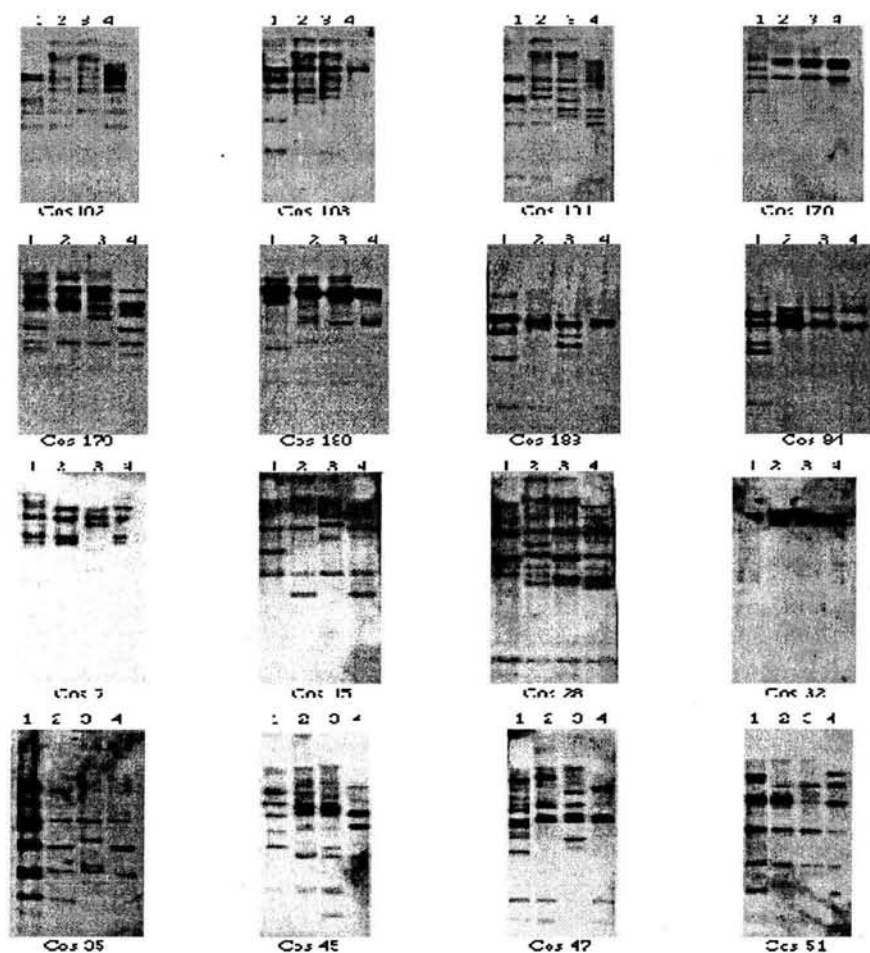


Fig 1. Hibridación de la colección de cósmidos que cubren el pSim de la cepa de *R. etli* CFN<sub>42</sub>, contra digestión total de ADN de la cepa *Rhizobium* sp. CIAT652. Carriles: 1, CFN<sub>42</sub>. 4, CIAT652. Digestión con *Bam*HI.

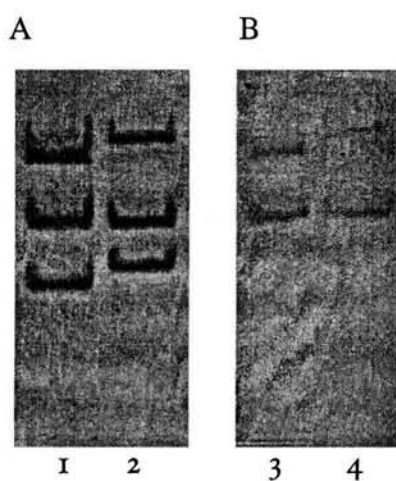


Fig 2. Hibridación con sondas de A) *nifH* y B) *nifK* de *R. etli* CFN<sub>42</sub> contra la cepa *Rhizobium* sp. CIAT652. Carriles: 1 y 3 CFN<sub>42</sub>, 2 y 4 CIAT652. Digestión con *Bam*HI.

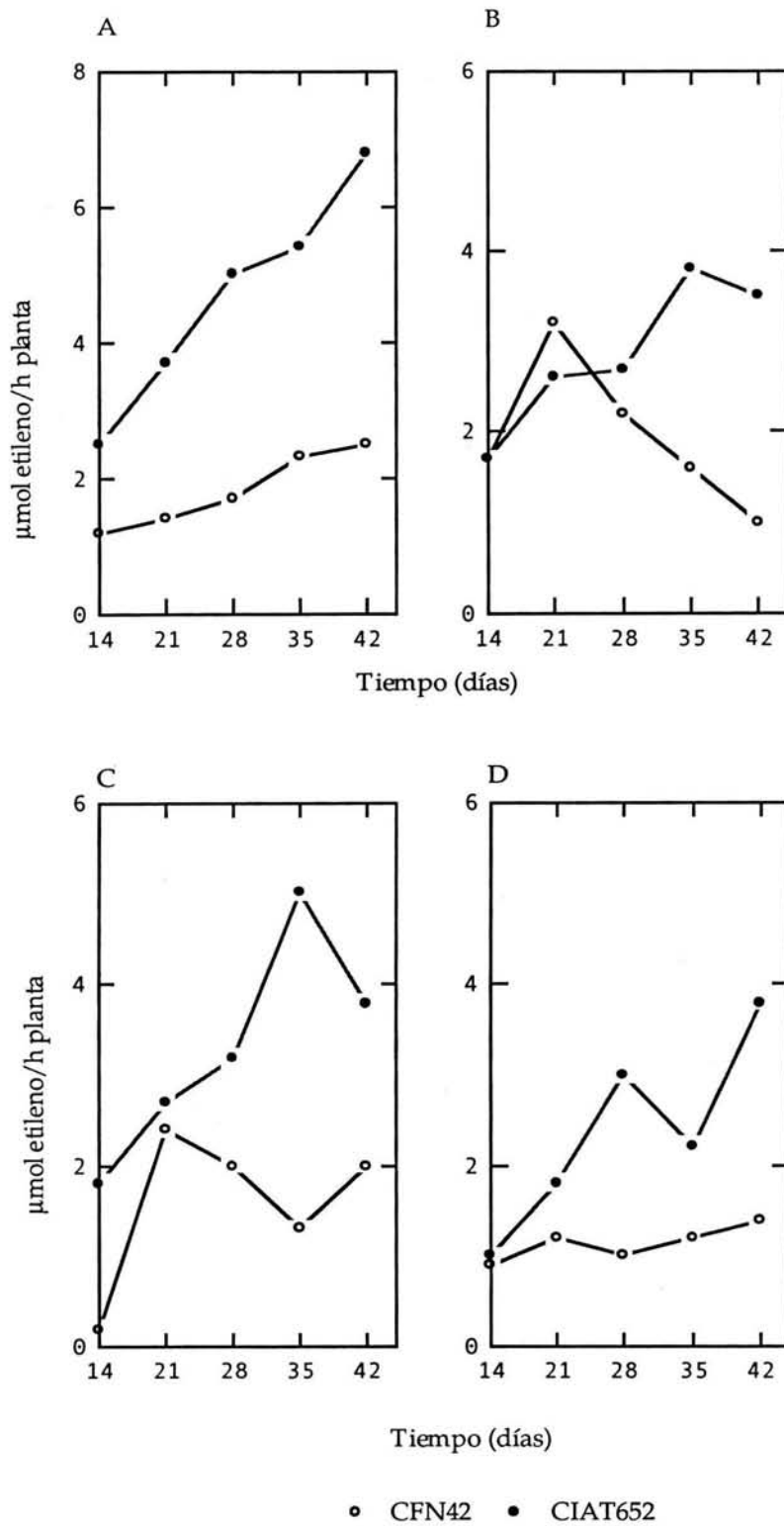


Fig 3. Comparación en actividad de nitrogenasa de las cepas CFN42 y CIAT652, en cultivares de frijol en experimentos de invernadero. A. Negro Jamapa. B. Flor de Mayo M38. C. Pinto Villa. D. Flor de Mayo Elisa. Se determinaron 10 plantas para cada fecha.

Tabla 1. Comparación de la eficiencia simbiótica entre las cepas de *Rhizobium etli* CFN<sub>42</sub> y *Rhizobium* sp. CIAT652, en experimentos de invernadero.

Cepa/Cultivar	N en semilla		Rendimiento de N/planta <sup>a</sup>	
	mg N/g peso seco	%	mg N en semilla/planta	%
Negro Jamapa				
CFN <sub>42</sub>	72±5		155	
CIAT652	94±6*	+31	183	+18
Pinto Villa				
CFN <sub>42</sub>	69±9		80	
CIAT652	91±10*	+34	119	+49
Flor de Mayo Elisa				
CFN <sub>42</sub>	73±6		100	
CIAT652	95±8*	+32	163	+63

Se analizaron semillas de 5 plantas.

<sup>a</sup> Es resultado de multiplicar el nitrógeno en semilla por la producción.

\* Significativamente diferente (con  $P < 0.05$ ) respecto a la cepa CFN<sub>42</sub>.

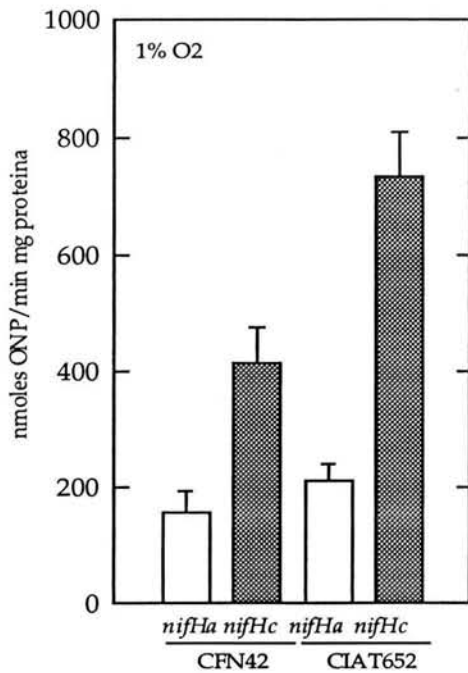


Fig. 4 Actividad transcripcional de las fusiones de *nifHa* y *nifHc* de la cepa de *R. etli* CFN42 en la cepa de *Rhizobium* sp. CIAT652, en condiciones de vida libre en bajo oxígeno.

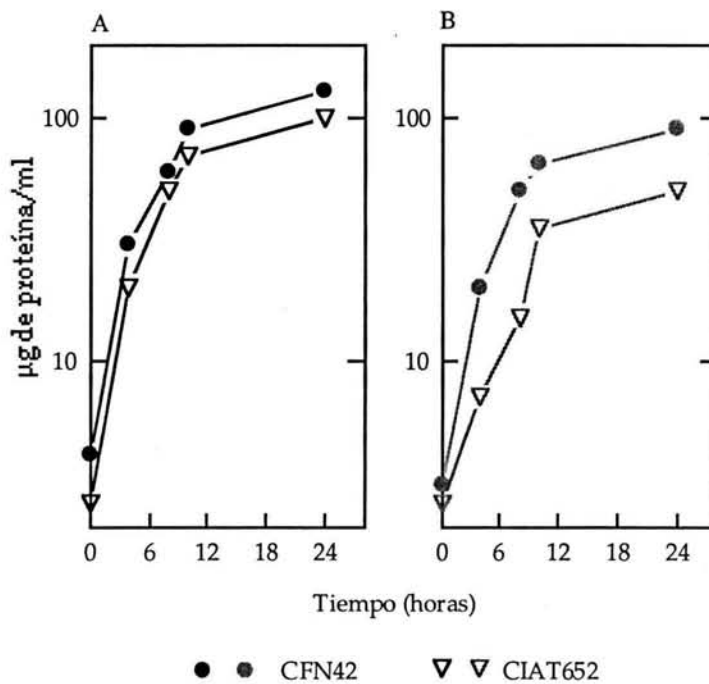


Fig. 5 Crecimiento de las cepas CFN42 y CIAT652 en medio mínimo suplementado con A) ácido succínico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM o B) ácido piruvico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM.



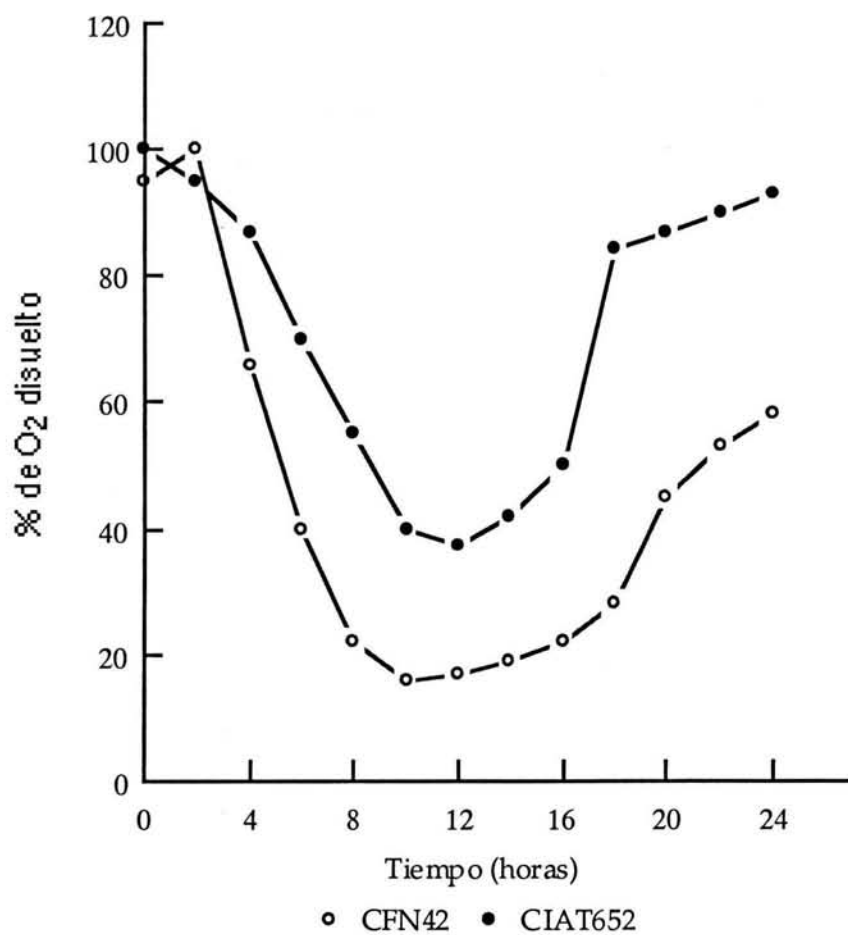


Fig. 6 Consumo de oxígeno de las cepas CFN<sub>42</sub> y CIAT<sub>652</sub> crecidas en medio mínimo suplementado con ácido succínico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM.

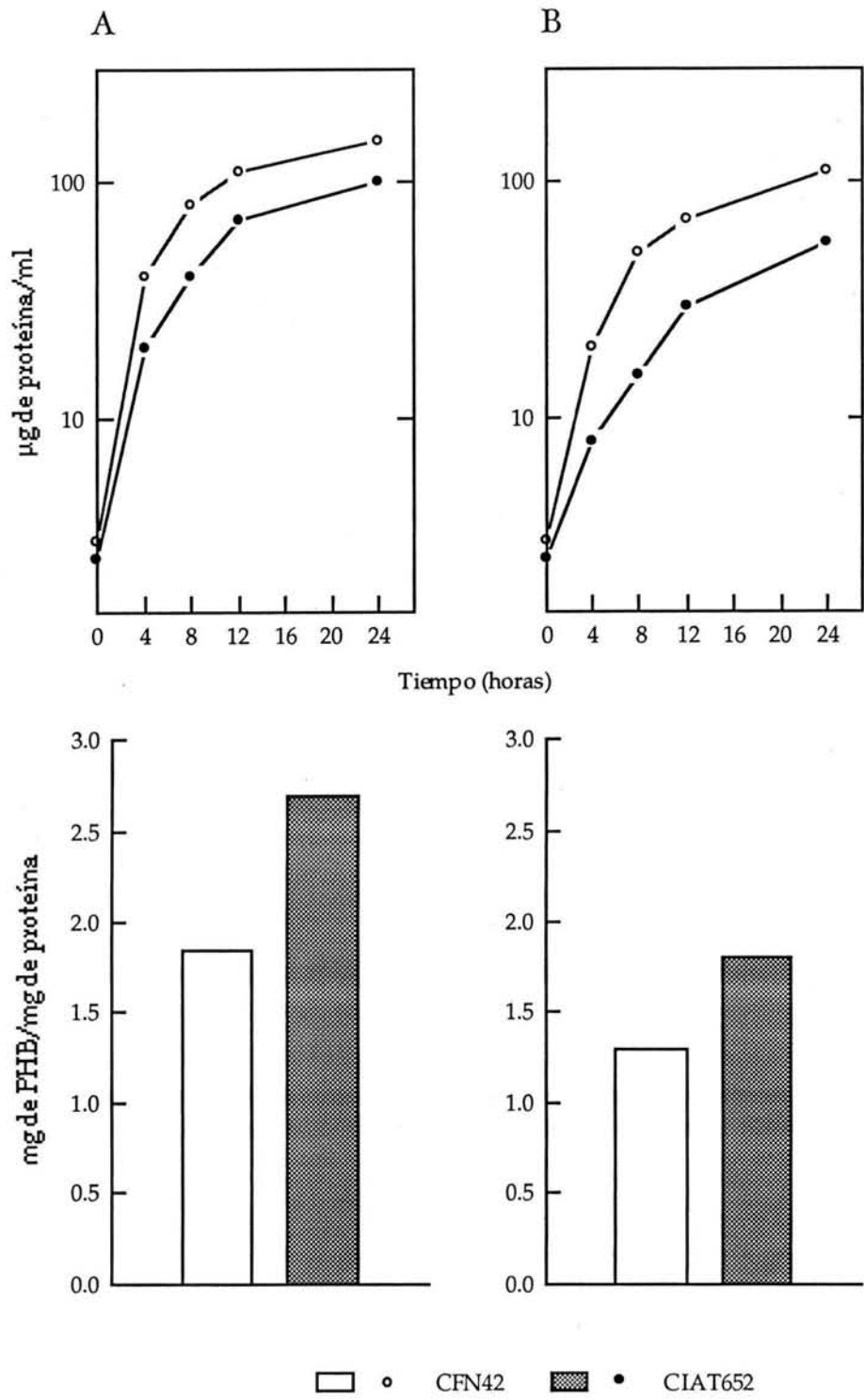


Fig. 7 Crecimiento y producción de PHB de las cepas CFN<sub>42</sub> y CIAT<sub>652</sub> en medio mínimo suplementado con A) ácido succínico 30 mM-cloruro de amonio 10 mM, o B) ácido piruvico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM.

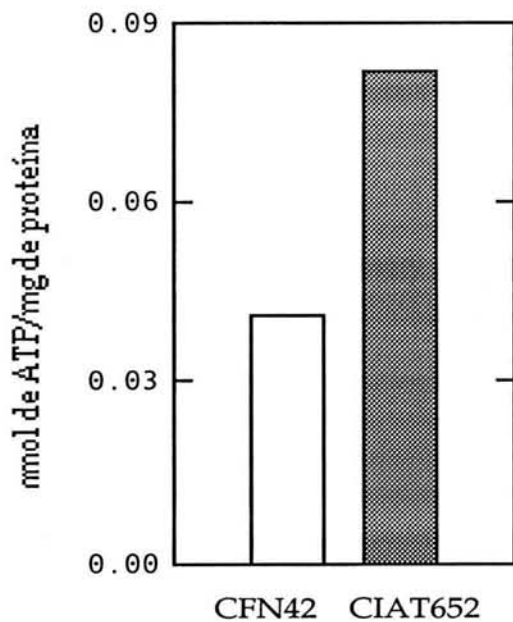


Fig. 8 Poza de ATP de las cepas CFN<sub>42</sub> y CIAT<sub>652</sub> crecidas en medio mínimo suplementado con ácido succínico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM por 6 h.

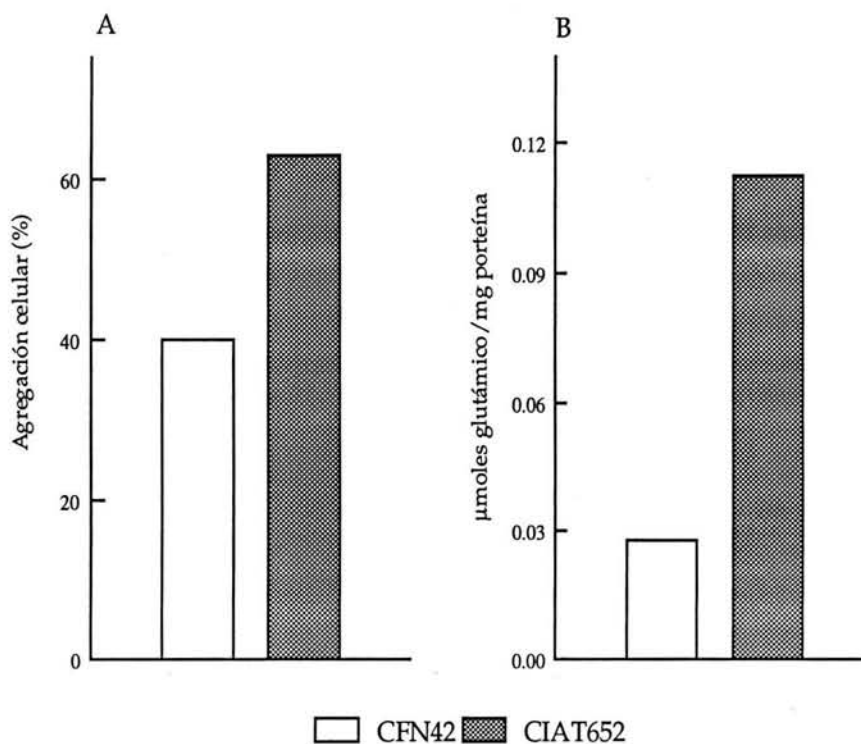


Fig. 9 A) Agregación celular y B) Excreción de ácido glutámico al crecer las cepas CFN<sub>42</sub> y CIAT<sub>652</sub> en medio mínimo suplementado con ácido succínico 30 mM-cloruro de amonio 10 mM por 24 horas.

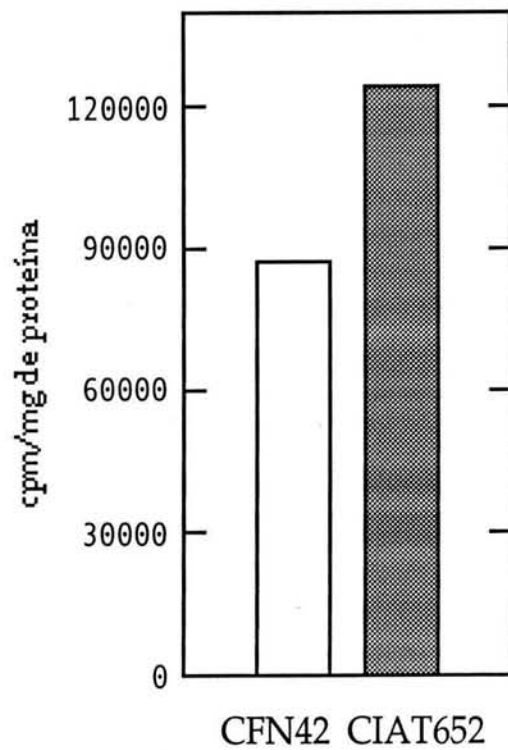


Fig. 10 Oxidación de la fuente de carbono por las cepas CFN42 y CIAT652 crecidas en 20% de oxígeno en medio mínimo suplementado con ácido succínico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM por 6 h. Se empleó (1, 4  $^{14}\text{C}$ )-succínico radiactivo según el protocolo descrito por Encarnación (1998).

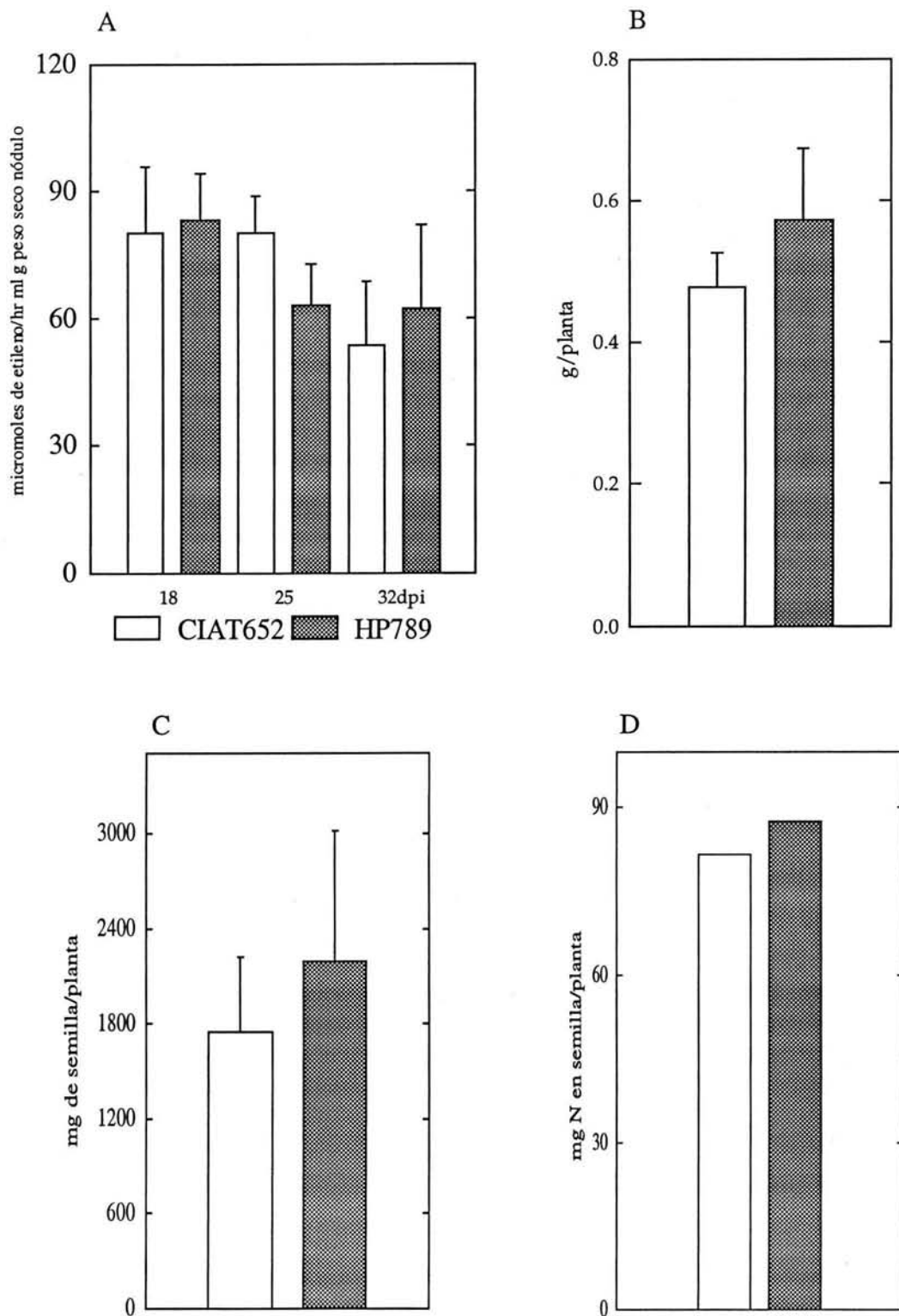


Fig. II Efecto de la inoculación con la cepa de *Rhizobium* sp. HP789 en plantas de frijol, comparado con la cepa silvestre CIAT652. A) Actividad de nitrogenasa a los 18, 25 y 32 días post inoculación (dpi). Se analizaron 10 plantas por fecha. B) Peso de plantas de 32 dpi. (n=10). C) Rendimiento de semilla (n=10). D) Rendimiento de nitrógeno en semilla (n=5).



I

2

3

4

Fig. 11E Efecto simbiótico de la inoculación con la cepa HP789 (derivada de CIAT652) con la construcción para modificar la expresión de la nitrogenasa (pr c *nifHcDK*). Plantas de 45 días post inoculación.

1. Plantas sin inoculación y sin fertilización.
2. Plantas inoculadas con la cepa silvestre CIAT652
3. Plantas inoculadas con la cepa HP789.
4. Plantas sin inoculación y fertilizadas con nitrógeno (2 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -10 mM  $\text{KNO}_3$ ).

### 3.3 Efecto del exceso de poder reductor en el metabolismo de *Rhizobium* y la expresión de la nitrogenasa

*Rhizobium etli*, como otros *rhizobia*, acumula el polímero carbonado poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en vida libre y en simbiosis. El PHB es un reservorio de carbono y poder reductor. En este laboratorio, se determinó que con la supresión del almacenamiento del polímero PHB en la cepa CFN42, el flujo de poder reductor y carbono se dirigió en parte hacia la catálisis de fijación de nitrógeno, ya que se observó mayor actividad de nitrogenasa y contenido de nitrógeno en la semilla (Cevallos *et al.*, 1996). Para determinar si el fenotipo otorgado por la construcción genética *pr c nifHcDK* podía lograr un efecto aditivo en otros fondos genéticos, se empleó la cepa *phb-* SAM100, derivada de CFN42 (Cevallos *et al.*, 1996).

La cepa con las dos modificaciones genéticas (*phb-*, *pr c nifHcDK*) logró una de las mayores eficiencias simbióticas reportadas a la fecha en *Rhizobium etli*, demostrando que era posible potenciar el efecto del exceso de carbono y poder reductor y emplearlo en la fijación de nitrógeno. Estos resultados se reportan también en el artículo que acompaña a esta Tesis.

Se intentó repetir este fenómeno en la cepa *Rhizobium* sp. CIAT652. Para ello, se construyó una deleción del gene *phbC* a partir del plásmido pWSB1 con el gene silvestre de *R. etli* CFN42 (obtenido por Carmen Vargas). Se obtuvo una deleción *XhoI-SmaI* y con el plásmido resultante, denominado pHP250, se obtuvo la cepa recombinante *phb-* de CIAT652, que se denominó AM652. Fue una sorpresa encontrar que la cepa AM652 mostró una reducción en su crecimiento en medio mínimo con ácido succínico como fuente de carbono y una actividad de piruvato deshidrogenasa aún menor que la ya baja actividad de la cepa silvestre CIAT652 (**Tabla 2**).

La cepa AM652 mostró serios defectos en la simbiosis. La nodulación se retrasó por 10 días, los nódulos fueron blancos (no fijadores) y los nódulos fijadores aparecieron desfasados en cerca de 20 días, la actividad de nitrogenasa fue nula o

muy baja a los 18 días y a los 25 y 32 días apareció en patrón desfasado respecto a la cepa silvestre. Las plantas fueron de tamaño pequeño, con hojas amarillas y en algunos experimentos no produjeron semilla. Al parecer, el poder reductor en esta cepa fue de tal magnitud que inhibió la actividad de la nitrogenasa. Para determinar si el efecto inhibitorio fue directamente sobre la transcripción de los genes de la nitrogenasa, se realizaron ensayos con una fusión transcripcional *nifHcD-lacZ* del plásmido pHP70 (ver artículo) en cultivos de vida libre en bajo oxígeno. En la cepa AM652 se encontró disminuida la expresión de *nifHc*, lo que no sucedió en la cepa *phb*- derivada de la cepa CFN42 (**Fig. 12**).

Para determinar si la reducción en la activación de *nifH* se debía a una inhibición sobre el activador de la fijación *nifA*, se ensayó la activación de una fusión transcripcional *nifA-gusA* de la cepa CFN42 en bajo oxígeno y en nódulo. La fusión de *nifA* en la cepa AM652 presentó una menor activación en ambas condiciones (**Fig. 13**). En cambio, en la cepa *phb*- derivada de CFN42, la actividad transcripcional del gene fue mayor. De esta manera, se relacionó el fenotipo simbiótico con la inhibición de *nifA* y *nifH* en la cepa *phb*- derivada de la cepa CIAT652. En este laboratorio se determinó también que en una cepa *phb*- de *Azorhizobium caulinodans*, simbionte de la acacia, el exceso de poder reductor inhibió la expresión del regulador general de la fijación NifA (Mandon *et al.*, 1998).

Para intentar que se gastara el exceso de poder reductor y corregir el defecto simbiótico, se construyó una cepa en la que además de no sintetizar el PHB se sobreexpresara la nitrogenasa, lo que se logró al introducir la construcción *prc nifHcDK* en la cepa AM652. La cepa obtenida con estas características se denominó HP652. En ensayos de invernadero, la cepa HP652 revirtió el defecto observado en la cepa AM652 (**Fig. 14, paneles A, B, C y D**). Presentó un fenotipo semejante al silvestre y en algunos experimentos se determinó que la actividad de nitrogenasa era mayor al de CIAT652, producía más semilla, con mayor contenido de nitrógeno y las plantas eran más grandes y verdes que con la inoculación de la cepa silvestre. En la fotografía de la **Fig. 14E** puede observarse el efecto de la inoculación con la cepa HP652 y comparar con la cepa de la que proviene, AM652.



De aquí se concluyó que con la sobreexpresión de la nitrogenasa, debido a la construcción por *nifHcDK*, se logró que se disminuyera el poder reductor y que la cepa recuperara y hasta incrementara su capacidad metabólica y fijadora de nitrógeno (manuscrito en preparación). En *Rhodobacter sphaeroides*, Joshi y Tabita (1996) determinaron que en una mutante que carecía de la vía de fijación de carbono, la nitrogenasa se desreprimía en condiciones de alto nitrógeno. Explicaban que la fijación de carbono en este organismo funciona como un reservorio de electrones para disipar el exceso de poder reductor proveniente del crecimiento fotoheterotrófico y que al no estar funcionando, entonces la nitrogenasa serviría como un segundo reservorio de electrones para el mismo fin. En la cepa HP652 podría estar sucediendo un fenómeno análogo, en el que el exceso de poder reductor ocasionado por la mutación *phb* se drena al sobreexpresar la nitrogenasa.

Tabla 2. Caracterización fisiológica de las cepas de *Rhizobium* CFN42 y CIAT652 y las cepas derivadas *phb*-.

Cepa	Crecimiento <sup>1</sup>	Producción de PHB <sup>2</sup>	Actividad de PDH <sup>3</sup>
CFN42	67	1.37	32.0
SAM100 <i>phb</i> -	15	0.0	4.34
CIAT652	37	1.81	1.30
AM652 <i>phb</i> -	14	0.0	na

1. En medio mínimo líquido, unidades en  $\mu\text{g}$  de proteína/ml a 24 hs de crecimiento en medio suplementado con ácido succínico 10 mM-cloruro de amonio 10 mM.
  2. Producción del polímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato, en mg de PHB/mg de proteína.
  3. En nmoles de NADH/min mg de proteína.
- na, no se detectó actividad.

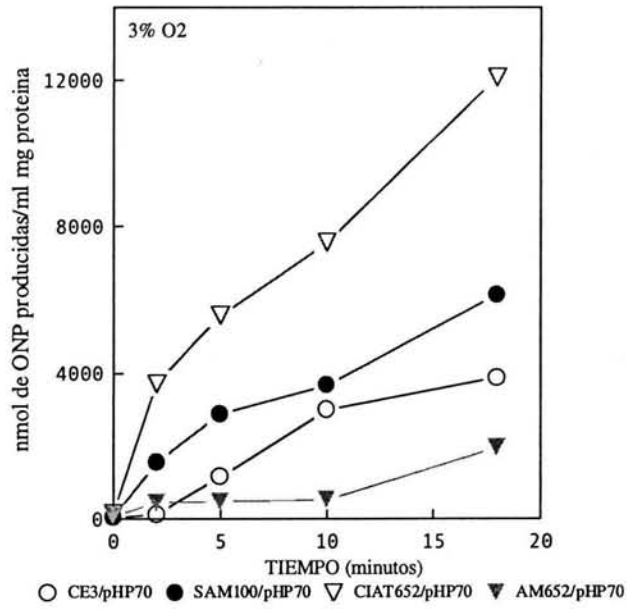


Fig 12. Ensayo de la fusión transcripcional *nifHD-lacZ* en el plásmido pHP70, en cultivos de vida libre, en bajo oxígeno. Las cepas SAM100 y AM652 son *pbb*-.

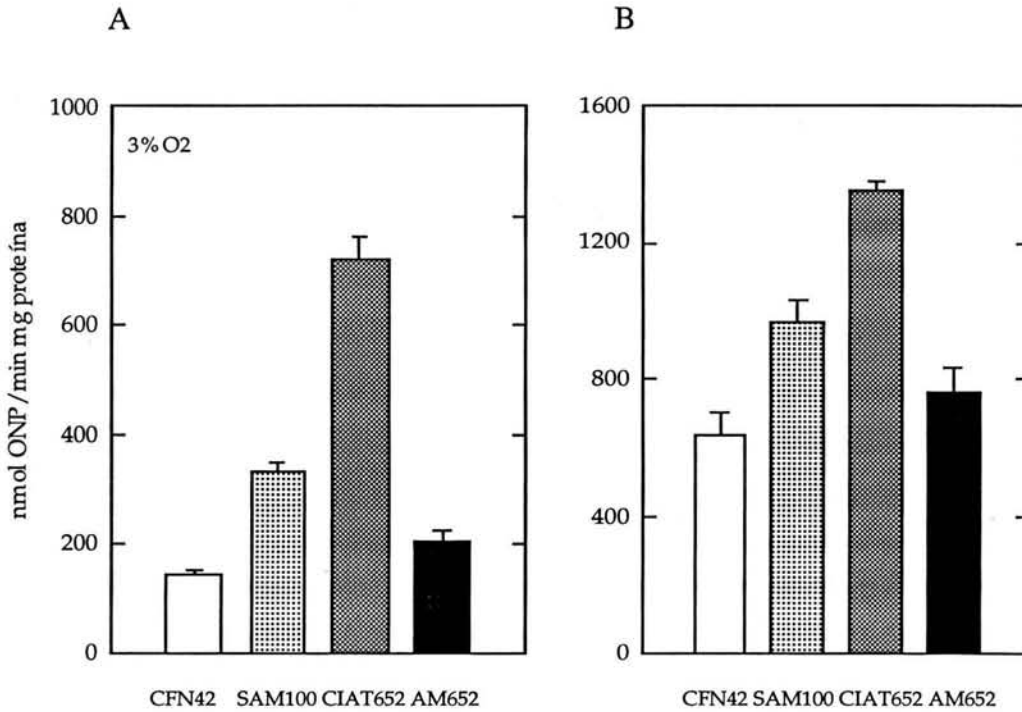


Fig. 13 Ensayo de la fusión transcripcional *nifA-gusA*, A) en cultivos de vida libre (3% de oxígeno) y B) en simbiosis (plantas de 18 días post inoculación). Las cepas SAM100 y AM652 son *pbb*-.

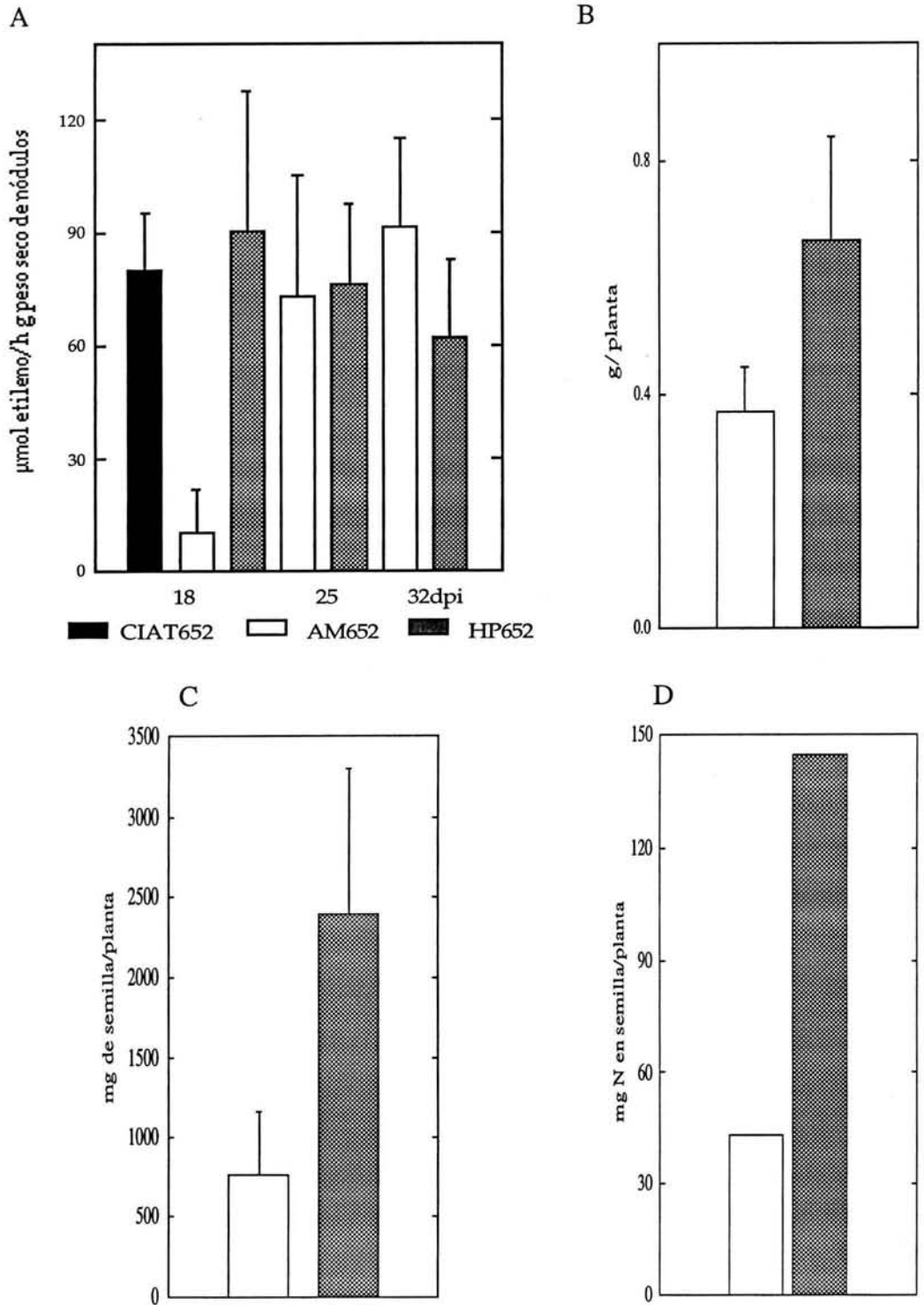


Fig. 14 Efecto de la inoculación con la cepa de *Rhizobium* sp. HP652 en plantas de frijol. A) Actividad de nitrogenasa a los 18, 25 y 32 días post inoculación (dpi, n=10 plantas). Para comparar se muestra la actividad de 18 días de la cepa silvestre CIAT652. B) Peso de plantas de 32 dpi (n=10). C) Rendimiento de semilla (n=10). D) Rendimiento de nitrógeno en semilla (n=5).



1

2

3

4

Fig. 14E Efecto simbiótico de la inoculación con la cepa HP652 (CIAT652, *phb*<sup>-</sup>, pr c *nifHcDK*) con la construcción para modificar la expresión de la nitrogenasa. Plantas de 45 días post inoculación.

1. Plantas sin inoculación y sin fertilización.
2. Plantas inoculadas con la cepa *phb*<sup>-</sup> AM652
3. Plantas inoculadas con la cepa HP652.
4. Plantas sin inoculación y fertilizadas con 2 mM NH<sub>4</sub>Cl-10 mM KNO<sub>3</sub>.

### 3.4 Ensayos de campo con las cepas modificadas, evaluación de su estabilidad, transferencia de la construcción a cepas competitivas en nodulación y promoción de su uso como biofertilizantes

#### A) Ensayos en campo con las cepas de *Rhizobium* simbiotes de frijol modificadas genéticamente para sobreexpresar la nitrogenasa

A partir de los resultados obtenidos en el invernadero con las cepas con la construcción pr c *nifHcDK* para sobreexpresar la nitrogenasa: HP310 (derivada de CFN42), HP789 (derivada de CIAT652) y HP652 (derivada de AM652, *phb*), se realizaron ensayos de campo para determinar si en estas condiciones podían obtenerse resultados de alta fijación de nitrógeno similares a los observados en invernadero. Se realizaron 16 ensayos, de los que se muestran 9 representativos, en campos experimentales del INIFAP en Guanajuato, Morelos, Estado de México y Veracruz con la intención de ensayar diversos tipos de suelo. En Celaya el suelo es tipo vertisol pélico (30% de arcilla con buen drenaje), en Zacatepec feozem (altos en carbonato), en Texcoco, Juchitepec y Cotaxtla andosol (derivados de cenizas volcánicas y ácidos) (Mapa INEGI). Se contó con la colaboración del Dr. Javier Castellanos, el Dr. Jorge Acosta y el Ing. Aurelio Barrera para coordinar los espacios a utilizar, el mantenimiento de las parcelas y el manejo de las cosechas. Se ensayaron diversos regímenes de riego (lluvia, riego rodado y riego por goteo), estaciones de siembra (primavera, verano e invierno) y cultivares de frijol (Flor de Mayo, Negro, Azufrado Higuera y Pinto). En la **Fig. 15** las fotografías muestran el proceso que llevamos a cabo: preparación de inóculo, siembra, monitoreo de ocupación de nódulos y cosecha.

Entre los resultados destacan los siguientes. Las cepas modificadas presentaron mayor capacidad de competencia por ocupación de nódulos que las cepas silvestres inoculadas (se muestran resultados de 9 experimentos, **Tablas 3-11**). Se encontraron ocupaciones varias veces mayores por las cepas modificadas. Lo anterior no es debido directamente a las modificaciones que presentaron (*phb*-y/o pr c *nifHcDK*). Una posible explicación sería que las cepas modificadas

promovieron una mejor simbiosis y que por ello las plantas tuvieron etapas adicionales de nodulación. Las cepas que accedieron a estos nuevos nódulos habrían sido las inoculadas. Un efecto similar de incremento en ocupación de nódulos se observó con cepas mejoradas de *S. meliloti* en campo (P. Burgos, resultados no publicados).

En cuanto a rendimiento de semilla, en general las cepas modificadas alcanzaron mejores rendimientos que el tratamiento control de las parcelas no fertilizadas y que las cepas de las cuales derivan. Es importante mencionar que los ensayos se realizaron en campos que habían sido fertilizados para cultivos previos y que esto influyó negativamente en la eficiencia de la inoculación. Por esta misma razón, el control de parcelas fertilizadas no mostró incrementos importantes en comparación con las parcelas no inoculadas (marcadas -N). Con la cepa HP310, derivada de la cepa CFN42, se obtuvieron incrementos variables, de hasta 50% sobre las parcelas no inoculadas, aunque en dos ensayos en Celaya se obtuvo menor producción. Respecto a su cepa silvestre CFN42, la cepa HP310 logró incrementos variables, de hasta 40%, excepto en dos experimentos en los que la cepa silvestre superó a la modificada (**Tablas 3-11**).

Con la cepa HP789, derivada de la cepa CIAT652, se lograron incrementos variables de hasta 80% en producción, en 6 de los experimentos, en comparación con las parcelas no inoculadas. En comparación con su cepa silvestre CIAT652, con la cepa HP789 se lograron incrementos variables en 5 ensayos de hasta 49%. La cepa HP652 se comparó contra la cepa silvestre CIAT652 debido a que la cepa de la que deriva (AM652, *phb*-) mostró serios defectos simbióticos en invernadero y en campo (resultados no mostrados). Con la cepa HP652 se obtuvieron incrementos de hasta 43% en producción en 5 de los experimentos sobre las parcelas no inoculadas y de hasta 39% sobre la cepa CIAT652 en 7 de los experimentos. Es importante destacar que la inoculación con las cepas modificadas, en general, logró mejores rendimientos en 6 ensayos sobre las parcelas fertilizadas y que solamente en 5 pruebas la fertilización rindió más semilla en comparación con las parcelas no inoculadas (**Tablas 3-11**).

Aunque los incrementos no son significativos en la mayoría de los casos, es notable la tendencia a obtener un mayor rendimiento con las cepas modificadas. Los productores agrícolas pueden beneficiarse del uso de estas bacterias como biofertilizantes, ya que sin disminuir el rendimiento pueden ahorrar el costo del fertilizante químico. Adicionalmente, los beneficios se pueden extender al medio ambiente al disminuir la contaminación derivada de la fabricación y aplicación de fertilizantes.

En cuanto a contenido de nitrógeno en semilla, se analizó la semilla proveniente de los experimentos y se observaron incrementos importantes por la inoculación de *Rhizobium* en general y en particular con las cepas modificadas (**Tablas 3-11**). En 5 ensayos la cepa HP310 logró incrementos de hasta 59% en nitrógeno en la semilla en comparación con las parcelas no inoculadas e incrementos de hasta 22% sobre la cepa silvestre CFN42. La cepa HP652 logró mayor contenido de nitrógeno en 6 de los experimentos respecto a las parcelas no inoculadas, con incrementos de hasta 82%. En 5 de los ensayos, los incrementos obtenidos por las cepas modificadas fueron significativos sobre las parcelas no inoculadas. En general, la fertilización química logró incrementos importantes sobre las parcelas control (marcadas -N), pero logró niveles similares a las parcelas inoculadas.

El contenido de nitrógeno es un parámetro que refleja el valor nutritivo de la semilla, ya que el principal aporte del consumo de leguminosas a la nutrición es precisamente por su alto contenido de aminoácidos y proteínas. Otro parámetro que revela la eficiencia fijadora de un inoculante es el rendimiento de nitrógeno, obtenido al multiplicar el contenido de nitrógeno en semilla por la producción y se refiere como kg de nitrógeno por hectárea. A este respecto, las cepas modificadas lograron incrementos promedio de 50% sobre las parcelas no fertilizadas y en algunos casos sobrepasaron a los controles fertilizados.

En general, se observó un efecto benéfico de la inoculación y particularmente con las cepas modificadas. Las plantas mostraron mayor vigor, verdor y frondosidad. Adicionalmente, los incrementos observados en producción,



contenido de nitrógeno y rendimiento de nitrógeno, pueden ser factores importantes para que los productores agrícolas y los consumidores se beneficien del uso de estos biofertilizantes.

## **B) Evaluación de la estabilidad de la construcción genética para modificar la expresión de la nitrogenasa en pruebas de campo**

Para evaluar la estabilidad de la construcción genética por *nifHcDK* presente en las cepas modificadas y su posible transferencia de la construcción a cepas del suelo, así como la persistencia de las cepas inoculadas en los experimentos de campo dirigí el proyecto de **Tesis de Licenciatura en Biología Evaluación de la estabilidad y persistencia de cepas modificadas genéticamente en ensayos de campo de Leslie Rincón Gallegos** (Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos), quien se encuentra en proceso de titulación.

Entre los resultados destacan los siguientes. A partir de los aislados obtenidos para determinar la ocupación de los nódulos de todas las parcelas ensayadas, se logró recuperar las cepas inoculadas con los marcadores de antibióticos adecuados que contenían la construcción sin cambio, como se observó mediante hibridación de Southern y PCR. Las cepas no mostraron cambios respecto a su contenido de plásmidos. Adicionalmente, después de 13 meses de inoculado el suelo, se recuperaron las cepas de nódulos de plantas germinadas en estas muestras en invernadero y también se encontraron estables. No se detectaron cepas del suelo que hubieran recibido la construcción genética.

Los resultados anteriores apoyan que las cepas modificadas pueden usarse como biofertilizante, ya que la construcción fue estable y las cepas inoculadas pudieron ser recuperadas sin cambios notables en su contenido de plásmidos y marcadores.



A) Semilla inoculada.



B) Siembra de parcelas en Zacatepec, Mor.



C) Parcelas en desarrollo, Zacatepec, Mor. y Celaya, Gto.



D) Parcelas en Texcoco, Méx., al inicio de la cosecha.

Fig. 15 Ensayos de campo con las cepas modificadas genéticamente para mejorar la fijación de nitrógeno. Se muestran las etapas del proceso de experimentación.

## RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE CAMPO CON CEPAS DE *Rhizobium* MODIFICADAS PARA MEJORAR LA SIMBIOSIS CON FRIJOL

Cepas ensayadas y tratamientos.

CFN<sub>42</sub>, silvestre, aislada de Celaya, Guanajuato. Es la cepa tipo de *R. etli*.

HP310, derivada de CFN<sub>42</sub>, contiene la construcción pr c *nifHcDK*.

CIAT652, silvestre, aislada de Colombia.

HP789, derivada de CIAT652, contiene la construcción pr c *nifHcDK*.

HP652, derivada de la cepa *pbb*- AM652, contiene la construcción pr c *nifHcDK*.

-N, sin inocular y sin fertilizar.

+N, sin inocular y con fertilizante nitrogenado, se usaron de 60 a 80 Kg N/Ha.

Los experimentos fueron realizados en campos experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de la Secretaría de Agricultura, localizados en Celaya, Gto., Zacatepec, Mor., Texcoco, Méx y Cotaxtla, Ver.

**Tabla 3.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Zacatepec. Fecha: Noviembre de 1999. Régimen de riego: rodado. Variedad: Flor de mayo M38.

Cepa/Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	48	544± 4*	33.9±2.9	18.4
HP310	88	552±140	38.7±7.2*	21.4
CIAT652	33	436± 43	34.6±4.7	15.0
HP789	69	649± 95*	47.1±8.6*	30.6
HP652	85	602±147*	41.7±4.2*	25.1
-N		420± 34	25.6±5.5	10.7
+N		473± 11	25.5±8.3	12.1

<sup>1</sup> En %, se analizaron 800 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Kg/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* Significativamente diferente con P < 0.05 respecto al control sin nitrógeno.

**Tabla 4.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Celaya. Fecha: Marzo de 2000. Régimen de riego: por goteo y rizorriego\*\*. Variedad: Flor de mayo.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	53	4.24±0.22	46.7±8.0*	198.0
HP310	74	4.29±0.45	38.6±2.4*	165.8
CIAT652	28	4.22±0.21	56.5±3.8*	238.4
HP789	21	4.08±0.20	50.9±1.4*	207.7
HP652	12	4.34±0.42	53.6±3.5*	232.7
-N		4.38±0.39	34.6±2.0	151.7
+N		4.48±0.53	71.3±6.0*	319.3

<sup>1</sup> En %, se analizaron 500 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cinco parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* Significativamente diferente con P < 0.05 respecto al control sin nitrógeno. \*\* El rizorriego consistió en incluir a las bacterias en el sistema de riego por goteo por dos ocasiones.

**Tabla 5.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Celaya. Fecha: Junio de 2000. Régimen de riego: rodado. Variedad: Flor de mayo M38.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	20	2.09±0.24	45.7±2*	95.5
HP310	36	2.15±0.15	55.6±2*	119.5
CIAT652	7	2.10±0.10	62.5±2*	131.2
HP789	54	2.03±0.25	61.7±2*	125.2
HP652	51	2.23±0.21	66.3±2*	147.8
-N		2.23±0.12	43.4±2	96.7
+N		2.57±0.34	72.6±1*	186.6

<sup>1</sup> En %, se analizaron 500 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Kg/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* Significativamente diferente con P < 0.05 respecto al control sin nitrógeno.

**Tabla 6.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Texcoco. Fecha: Junio de 2000.  
Régimen de riego: rodado. Variedad: Negro M8025.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	-	3.43±0.38	46.1±3*	158.3
HP310	45	3.39±0.90	47.5±1*	161.0
CIAT652	-	3.46±0.40	57.1±2*	197.4
HP789	36	3.33±0.35	49.3±3*	164.1
HP652	14	3.14±0.40	54.3±1*	170.3
-N		3.23±0.09	29.9±2	96.6
+N		3.46±0.31	66.3±1*	229.4

<sup>1</sup> En %, se analizaron 500 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cinco parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* Significativamente diferente con P < 0.05 respecto al control sin nitrógeno. -, no se determinó.

**Tabla 7.** Experimento de campo. Lugar: Juchitepec, Méx. Fecha: Junio de 2000.  
Régimen de riego: lluvia. Variedad: Negro M8025.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	na	1.29±0.23	47.2±2*	60.9
HP310	na	1.39±0.27	52.5±2*	72.3
CIAT652	na	1.34±0.20	62.9±2*	84.3
HP789	42	1.41±0.33	57.0±2*	80.6
HP652	86	1.47±0.15	58.9±1*	86.5
-N		1.33±0.26	32.1±1	42.7
+N		1.45±0.22	70.2±1*	101.4

<sup>1</sup> En %, se analizaron 100 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* Significativamente diferente con P < 0.05 respecto al control sin nitrógeno. na, no se analizó.

**Tabla 8.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Texcoco. Fecha: Junio de 2001.  
Régimen de riego: rodado. Variedad: Pinto Villa.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	61	1.49±0.63	42.9±1.3	63.9
HP310	43	2.07±0.32	42.7±1.0	88.9
CIAT652	45	1.81±0.33	43.0±0.9	77.9
HP789	51	1.86±0.74	43.3±2.2	80.5
HP652	34	2.28±0.75	42.1±1.2	96.0
-N		1.69±0.68	43.0±3.4	72.7
+N		2.14±0.80	43.3±1.5	92.8

<sup>1</sup> En %, se analizaron 200 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha.

**Tabla 9.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Texcoco. Fecha: Junio de 2001.  
Régimen de riego: rodado. Variedad: Negro M8025.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	15	1.82±0.17	42.3±2.1	77.0
HP310	39	2.44±0.35 *	41.4±5.7	101.0
CIAT652	6	1.65±0.31	42.6±1.0	70.3
HP789	14	1.82±0.59	42.1±1.4	76.6
HP652	69	2.29±0.11*	41.9±1.6	96.0
-N		1.63±0.12	42.2±1.0	68.8
+N		1.78±0.25	42.7±1.6	76.0

<sup>1</sup> En %, se analizaron 200 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* Significativamente diferente con P < 0.05 respecto al control sin nitrógeno.

**Tabla 10.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Zacatepec. Fecha: Diciembre de 2001. Régimen de riego: rodado. Variedad: Azufrado higuera.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	27	0.79±0.30	34.6±4.6	27.4
HP310	57	1.10±0.38	37.4±1.2	41.0
CIAT652	34	1.26±0.72	38.7±2.2	48.6
HP789	70	1.04±0.48	40.0±1.9	41.7
HP652	52	1.02±0.16	38.6±1.4	39.2
HP310PHB*	43	1.62±0.54	38.4±4.1	62.4
-N		1.28±0.39	37.0±2.9	47.3
+N		1.74±0.86	32.8±5.1	57.2

<sup>1</sup> En %, se analizaron 200 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha. \* La cepa HP310PHB es *phb*- y deriva de la cepa HP310.

**Tabla 11.** Experimento de campo. Lugar: INIFAP-Zacatepec.Fecha: Junio de 2001. Régimen de riego: rodado. Variedad: Azufrado higuera.

Cepa o Trat.	Ocupación <sup>1</sup>	Producción <sup>2</sup>	N en semilla <sup>3</sup>	Rendimiento de N <sup>4</sup>
CFN42	4	1.88±1.50	47.9±1.0*	90.0
HP310	23	1.78±0.28	51.1±1.0*	91.0
CIAT652	4	1.55±0.50	44.8±0.4	69.4
HP789	12	2.26±0.17*	51.5±1.1*	116.4
HP652	13	1.56±1.40	52.9±1.0*	82.5
-N		1.26±0.81	43.6±0.6	54.9
+N		2.07±0.80	47.1±0.6*	97.5

<sup>1</sup> En %, se analizaron 400 nódulos por cepa. <sup>2</sup> En Ton/ha, producción de cuatro parcelas. <sup>3</sup> En mg N/g de semilla. <sup>4</sup> En Kg N/Ha.

### **C) Modificación de la expresión de la nitrogenasa en cepas con alta competitividad por nodulación**

Para determinar si era posible conjuntar la modificación de la expresión de la nitrogenasa con una mayor competitividad en nodulación, se ensayó la transferencia de la construcción genética para sobreexpresar la nitrogenasa por *nifHcDK* a un grupo de 12 cepas aisladas de frijol provenientes de varias regiones del país (Vertiente del Golfo, Centro, Bajío, Altiplano y Vertiente del Pacífico), de una colección perteneciente a la Dra. Valeria Souza del Instituto de Ecología, UNAM. Para ello dirigí el proyecto de **Tesis de Licenciatura Construcción de cepas de *Rhizobium* modificadas genéticamente para mejorar la fijación de nitrógeno**, de la **Biol. Maricela Tejeda Aburto** (Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos), titulada el **30 de noviembre de 2003**.

Entre los resultados se determinó que en la mayoría de las cepas se logró sobreexpresar la nitrogenasa, así como se mejoró la eficiencia fijadora de nitrógeno determinada por mayor rendimiento de semilla y apariencia y crecimiento de las plantas. Lo anterior muestra que los elementos de la activación transcripcional de los genes *nifH* se conservan en estas cepas por lo que son reconocidos en estos fondos.

Adicionalmente, el grupo de cepas presenta una alta capacidad de competencia en nodulación en las variedades de frijol más cultivadas en el país (bayo, flor de mayo y negro) y pueden ser empleadas en la formulación de biofertilizantes para frijol especialmente para las regiones de las que fueron aisladas.

### **D) Promoción del uso de las cepas de *Rhizobium* mejoradas en fijación de nitrógeno como biofertilizantes**



Debido a los resultados obtenidos con las cepas modificadas para sobreexpresar la nitrogenasa en las pruebas de invernadero y campo, se decidió promover y proteger su uso como biofertilizantes de frijol. La aplicación de biofertilizantes basado en estas bacterias en el cultivo de frijol puede lograr incrementos en producción de semilla, principalmente en suelos pobres de nitrógeno, se pueden reducir los altos costos económicos y ambientales de la fertilización química nitrogenada y un factor muy importante: la semilla producida de esta manera presenta mayor contenido de nitrógeno, que eleva el valor nutritivo de la semilla y con lo cual el consumidor de bajos recursos puede lograr un consumo más adecuado de proteínas.

La producción de un biofertilizante en la industria representa un costo mucho menor al de producir un fertilizante. Por ejemplo, el costo de fertilizar una hectárea de frijol es cercano a 800 pesos y para inocular esa misma superficie con bacterias, sin reducir el rendimiento, aproximadamente 20 pesos. Por ello, una alternativa económica y ecológicamente más adecuada para lograr el objetivo mencionado en el campo es el mejoramiento de la fijación del nitrógeno que sucede en el cultivo de plantas, especialmente leguminosas.

Se obtuvieron los permisos pertinentes de liberación de la Secretaría de Agricultura, así como la cepa HP310 se depositó en la colección de cultivos del Agricultural Research Service-USDA con la clave NRRL B-30606. Se logró la difusión de la obtención de estos biofertilizantes a través de entrevistas y conferencias de prensa para medios nacionales de comunicación (televisión, radio y prensa escrita), así como impartí talleres de capacitación a ingenieros agrónomos del centro del país, principalmente de Michoacán, Puebla, Guerrero, Morelos y Estado de México, acerca de los beneficios del uso de inoculantes en el cultivo de frijol.

En México, los derechos para usar las cepas y la transferencia de tecnología se concedieron a la empresa Asesoría Integral Agropecuaria, S. A. (ASIA) a través de un convenio con la UNAM con vigencia de 10 años. La empresa se interesó en

producir el biofertilizante para el mercado nacional y tiene contemplado cubrir 80 mil hectáreas de zonas de cultivo de productores de bajos ingresos.

Mediante una colaboración con el Dr Leobardo Serrano de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología (UNAM), se elaboraron 300 dosis del biofertilizante para promocionar su uso con los agricultores mediante la siembra de 30 parcelas demostrativas en estados del centro y sur del país (Estado de México, Morelos, Puebla, Michoacán, San Luis Potosí, Hidalgo, Guanajuato, Chiapas y Veracruz) que la empresa estableció y monitoreó durante 2003.

En la temporada primavera-verano de 2004, la empresa ASIA pondrá el biofertilizante a disposición de los agricultores a bajo costo. En otros países se promoverá el uso de estas cepas como biofertilizantes a través de convenios similares.

## 4 DISCUSION Y PERSPECTIVAS

Una característica especial de *Rhizobium etli* (y otros *rhizobia* como *R. trifolii*, *R. leguminosarum* biovares phaseoli y viciae, *R. sp.* CIAT652 y *R. sp.* NGR234) es la presencia de reiteraciones de los genes que codifican para la enzima nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno. Las regiones promotoras de las tres reiteraciones en la cepa *Rhizobium etli* CFN42 (dos forman operones completos *nifHDK*) comparten elementos regulatorios como el promotor dependiente de  $\sigma_{54}$ , la secuencia UAS para acoplamiento del activador general de la fijación NifA y segmentos de acoplamiento de la proteína IHF. Pero difieren en un factor fundamental: la distancia entre el promotor y la UAS, que en la reiteración *nifHc* representa la posibilidad de formar un complejo activador mejor posicionado que en las reiteraciones *nifHa* o *nifHb*. Ello se confirmó con el nivel diferencial de activación que tienen estas fusiones.

A través de una construcción quimérica se logró controlar la transcripción del operón *nifHDK* mediante la región promotora de la reiteración *nifHc*, con el objetivo de incrementar la cantidad de transcrito de los genes, pero principalmente de *nifDK* (ya que *nifH* abunda en este organismo). Esta construcción presentó varias ventajas: se conservó la regulación original dependiente de NifA que es importante por que la construcción se activa naturalmente en la simbiosis y porque no se incorporaron elementos genéticos adicionales al genoma de *Rhizobium*; lo que es un factor clave si se pretende que estos organismos modificados puedan ser empleados como biofertilizantes.

Adicionalmente se comprobó la dependencia de fase de la activación de *nifH* en *R. etli* y la capacidad metabólica de la cepa CFN42 para incrementar su eficiencia fijadora de nitrógeno. Esto último es muy importante porque la simbiosis de *Rhizobium*-frijol es una de las más ineficaces al obtener los más bajos rendimientos de nitrógeno entre los cultivos de leguminosas.

La construcción genética incrementó notablemente la capacidad simbiótica de la cepa. La revisión de la literatura indica que es el mayor aumento reportado a la fecha. Se logró impactar benéficamente en el rendimiento, el contenido de nitrógeno en la semilla y el peso de las plantas. En experimentos de campo se observó una tendencia similar de mejoramiento del cultivo con mayores rendimientos de producción, contenido de nitrógeno en semilla y rendimiento de nitrógeno. Adicionalmente, apareció un nuevo factor: se aumentó el nivel de ocupación de nódulos por las bacterias modificadas respecto a sus silvestres, posiblemente por una simbiosis más benéfica para la planta.

A partir de estos resultados se promovió el uso de estos organismos como un biofertilizante eficiente. Actualmente, la empresa ASIA está produciendo las cepas mejoradas para biofertilizar el cultivo de frijol en el país. Considero que este logro es el resultado natural de varios años de investigación básica en el área, principalmente realizada en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM y que este trabajo contribuye a eliminar la división artificial entre la ciencia básica y aplicada.

Exploramos además otros aspectos de la regulación de la nitrogenasa en *Rhizobium*. Para contestar la pregunta de qué factor influye más en la transcripción, ensayamos varios fondos como *S. meliloti*, *Rhizobium* sp. CIAT652 y *R. tropici*, además de la cepa CFN42 (ver **Anexo A**). Los tres últimos son simbioses de frijol y representan una gama variada de estrategias para fijar nitrógeno: CIAT652 y CFN42 tienen tres reiteraciones casi idénticas que son reguladas similarmente, pero la primera cepa tiene una mayor capacidad fijadora (explicable porque oxida más rápidamente los sustratos de carbono y produce más ATP); *R. tropici* presenta un solo operón *nifHDK* y fija mejor que CFN42 que tiene dos completos. La diferencia principal de estos simbioses de frijol con *S. meliloti* es la presencia de un promotor consenso en este último y un promotor desviado en la posición -12 en aquellos. Los resultados nos dan una visión más amplia sobre la importancia de cada elemento regulatorio y cómo los organismos están adaptados a transcribir eficientemente complejos que en otro fondo serían aún inadecuados.

Por último, en el **Anexo B**, mediante un análisis comparativo de las regiones promotoras de *nifH* en varios *Rhizobium*, logramos determinar que los tipos de regiones *nifHa* y *nifHc* divergieron a partir de inserciones-delecciones, se predice que *R. leguminosarum* bv *viciae* presentaría la regulación diferencial observada en CFN42 y CIAT652 y que *R. trifolii*, con reiteraciones menos relacionadas con las típicas *nifHa* y *nifHc*, también presenta una alta identidad entre dos reiteraciones y una tercera divergente.

## PERSPECTIVAS

Para mejorar la eficiencia fijadora de nitrógeno de *Rhizobium* pueden explorarse otras modificaciones en la región promotora. El cambio de la posición -12 (A) por una base consenso (C) en el promotor puede incrementar la tasa transcripcional. De la misma manera, el sitio de acoplamiento de IHF, aunque no presenta una secuencia consenso, puede modificarse para determinar aquella que influya en la afinidad de pegado de este factor. Respecto a otros factores puede estudiarse también la activación por NifA. En estudios preliminares observamos un incremento notable en actividad de nitrogenasa al usar una cepa, obtenida por la Dra. Lourdes Girard, con dos reiteraciones del activador *nifA*. Se requiere construir una cepa estable con esta característica. También es importante profundizar el estudio de la regulación de *nifA* en esta especie. Como se comentó en la Introducción, detectamos en *R. etli* que existe el par regulatorio RegSR y posiblemente influya en la transcripción de *nifA*. La señal regulatoria para RegSR es transducida por los homólogos de FixNOQP en *Rhodobacter*, pero no se sabe si es así en *R. etli*. La determinación de la naturaleza de la señal sensada por FixNOQP a la cual responde este par regulatorio, podría ser el potencial redox, lo que reflejaría el estado metabólico de la célula, y algunos resultados presentados aquí apoyan esta hipótesis. Con estos conocimientos se tendría un panorama más integrado de la cascada regulatoria de la fijación de nitrógeno en *R. etli*.

En *R. etli* CFN42, mediante *northern*s, detectamos varios transcritos que corresponderían a las especies *nifH*, *nifHD* y *nifHDK*, lo cual apunta a que existe

regulación postranscripcional. Como se mencionó, en esta especie, como en otras, hay una sobreabundancia de NifH respecto a NifDK. Es importante determinar el papel de esta regulación en definir la estequiometría y función de los péptidos que conforman el complejo de la nitrogenasa.

También es importante ensayar la incorporación de genes con nuevas funciones en *R. etli* para mejorar la fijación de nitrógeno. Por ejemplo, mediante una colaboración con el Dr. Tomás Ruiz-Argüeso (Universidad Politécnica de Madrid) ensayamos cepas de *R. etli* conteniendo los genes de la toma de hidrógeno (*hup*) para recuperar parte de la energía que se pierde en la simbiosis por la formación de hidrógeno. Los resultados fueron variables con la estación del año, y se requiere determinar los factores que influyen en el efecto simbiótico de estos genes en *R. etli*.

El estudio de unos cuantos genes participantes en una función, aun cuando puede ser fructífero, no nos permite conocer las múltiples interacciones que éstos tienen con otras proteínas y funciones. A un siglo del estudio sistemático de la fijación simbiótica de nitrógeno, aparecen nuevos paradigmas. La secuenciación de los genomas de procariotes, 164 a la fecha, entre las cuales hay Rhizobiaceas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Rhizobium etli* en el CIFN) y el empleo de herramientas de análisis experimental masivo (microarreglos y proteoma) y computarizado (bases de datos y programas), abre enormes posibilidades para entender mejor su metabolismo y los procesos en que participan, como simbiosis y patogenicidad.

## 5 CONCLUSIONES

- Se modificó la regulación transcripcional de la nitrogenasa en *Rhizobium etli*, empleando los elementos presentes en las reiteraciones silvestres de *nifH*. La construcción genética resultante se logró transferir exitosamente a otras cepas de *Rhizobium* que presentaban características como alta capacidad fijadora de nitrógeno o alta competitividad por nodulación.
- Las cepas de *Rhizobium*, simbioses de frijol, con la construcción para sobreexpresar la nitrogenasa lograron incrementos significativos en actividad de nitrogenasa, peso de plantas, rendimiento y contenido de nitrógeno en semilla, en ensayos de invernadero.
- Las cepas mejoradas pueden emplearse como biofertilizantes del cultivo de frijol. En condiciones de campo obtuvieron resultados similares a los de invernadero, con variaciones debidas a factores climáticos, de suelo, cultivar de frijol y régimen de riego. Además, se observó una alta competitividad nodulatoria y estabilidad genética de la construcción.
- Se conocieron mejor los factores metabólicos que definen la capacidad fijadora de nitrógeno en cepas de *rhizobia* simbioses de frijol.
- Se determinó la influencia del poder reductor sobre la expresión de los genes de la nitrogenasa, y junto con el exceso de carbono se usó para energizar a la nitrogenasa.
- Mediante un análisis comparativo, se determinó que existen dos tipos de regiones promotoras de la nitrogenasa en las cepas con reiteraciones de *nifH*. También se determinó la influencia de la variación de elementos regulatorios en diversos *rhizobia*.

## Anexo A

### Análisis de la activación transcripcional de *nifH* en *Rhizobium*

Para determinar cómo se reconocen los elementos regulatorios de la transcripción de la nitrogenasa en diversas especies de *Rhizobium*, se determinó la activación de fusiones transcripcionales *nifH-lacZ* en varias especies de *Rhizobium* que presentan las siguientes características.

*S. meliloti* 1021, simbiote de alfalfa, tiene un operón de la nitrogenasa *nifHDK*, el promotor de este operón presenta la base consenso C en la posición -12.

*Rhizobium* sp. CIAT652, simbiote de frijol, tiene tres reiteraciones de *nifH*, los promotores son idénticos y presentan la desviación del consenso en la posición -12 (A en vez de C). Ver figura 19, en la sección siguiente. Las secuencias fueron determinadas en este Proyecto.

*R. tropici* CIAT899, simbiote del frijol, tiene un operón de la nitrogenasa *nifHDK*, el promotor es semejante al de *R. etli* CFN42, tiene A en vez de C en la posición -12. La secuencia se determinó en este Proyecto.

Se obtuvieron los siguientes resultados.

Las fusiones *nifHa* y *nifHc* de la cepa CFN42 en *S. meliloti* no se expresaron adecuadamente, con valores 2 a 6 veces menores a los observados en *R. etli*, respectivamente (**Fig. 16**). En cambio, la fusión *nifH-lacZ* de *S. meliloti* se expresó en altos niveles en *R. etli* CFN42 (**Fig. 17**).

La diferencia principal es que el promotor de *S. meliloti* presenta la base consenso C en la posición -12. Con lo anterior se comprobaría la noción de que el promotor de *R. etli* es de baja afinidad, en comparación con los promotores consenso. La distancia entre promotor y UAS no fue importante en *S. meliloti*, ya que ninguna de las dos fusiones se expresó bien. Al parecer, la deficiencia de fuerza



del promotor de la nitrogenasa de CFN42 (con A en vez de C) se compensa con la distancia entre promotor y UAS en el caso de la región promotora de *nifHc*.

En la cepa *R. tropici* CIAT899, la fusión *nifHc* de la cepa CFN42 presentó un nivel de expresión bajo, menor al que normalmente presenta en el fondo de CFN42 (**Fig. 16**). Sin embargo, la fusión *nifHa-lacZ* alcanzó niveles notablemente altos, de cerca del doble al que normalmente presenta en su propio fondo. Ambas fusiones presentan el mismo promotor, pero difieren en el sitio de pegado a NifA, ya que el UAS de *nifHc* se desvía del consenso. Este cambio pudiera ser el responsable del no reconocimiento por *R. tropici*, aun cuando pareciera que la distancia entre UAS y promotor de *nifHc* formaría una arquitectura más adecuada para transcribir.

En la cepa de CIAT652 se encontró que aún cuando la fusión *nifHa-lacZ* de *R. etli* CFN42 se expresó como en su propio fondo, la fusión *nifHc-lacZ* llegó a activarse 2.5 veces más en CIAT652 que en CFN42 (**Fig. 4**). CIAT652 reconoció adecuadamente los elementos de *R. etli* y muestra la respuesta de activación diferencial de las fusiones *nifHa* y *nifHc*, observada en la cepa CFN42. Adicionalmente, la cepa CIAT652 presentó una mejor respuesta a la arquitectura adecuada de *nifHc*, cercana a las 8 vueltas completas entre UAS y promotor.

En general, se observó que cada organismo transcribió mejor las fusiones *nifH* que presentan elementos regulatorios más semejantes a los propios, ello indica que el sistema de regulación está “adaptado” a sus propios elementos, aún cuando algunos de ellos parecen representar complejos reguladores menos favorecidos para la transcripción.

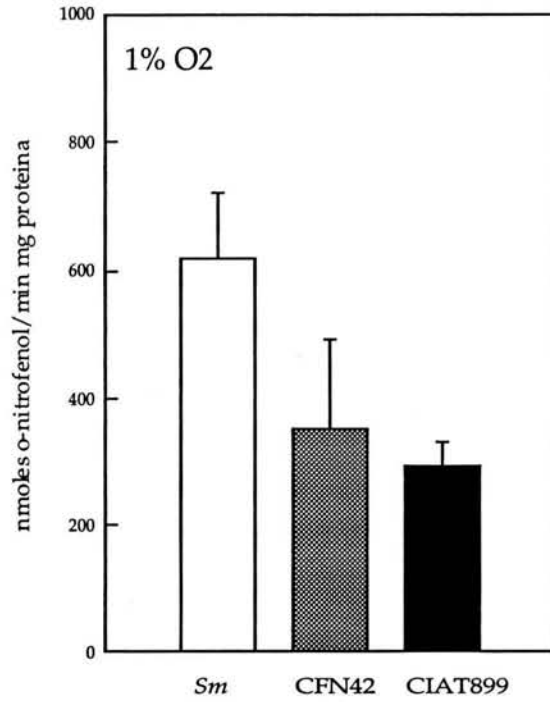


Fig. 16 Actividad transcripcional de la fusión *nifH-lacZ* de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en la cepa de *R. etli* CFN42 y en la cepa de *R. tropici* CIAT899.

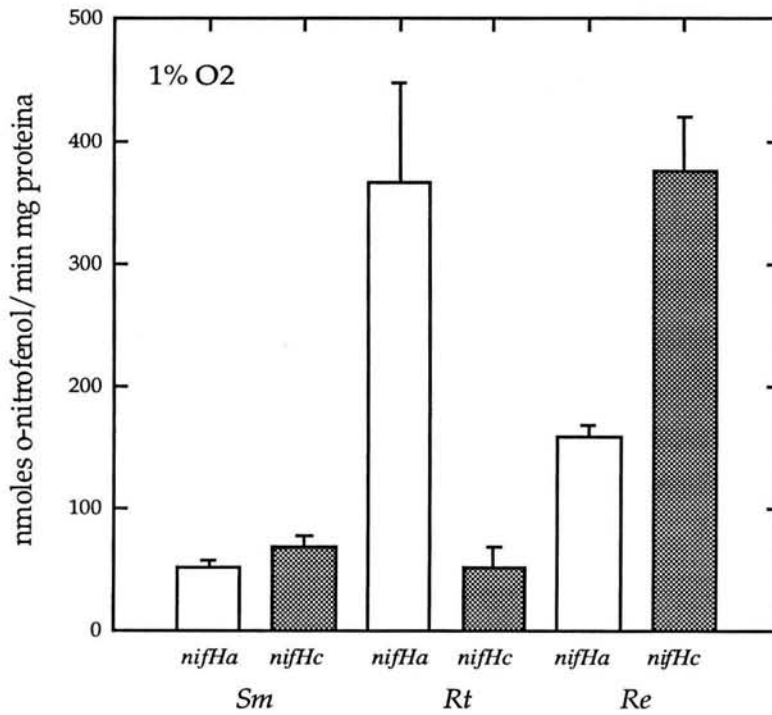


Fig. 17 Actividad transcripcional de las fusiones de *nifHa-lacZ* y *nifHc-lacZ* de la cepa de *R. etli* CFN42 en las cepas de *S. meliloti* 1021 y de *R. tropici* CIAT899.

## Anexo B

### Análisis comparativo de las regiones promotoras de *nifH* de *Rhizobium*

Para determinar si el modelo de activación transcripcional descrito en *Rhizobium etli* CFN<sub>42</sub> podía extenderse a otras especies de *Rhizobium*, que se asocian con frijol con o sin reiteraciones de la nitrogenasa (como *R. sp.* CIAT652 y *R. tropici*), se propuso llevar a cabo un análisis comparativo entre las secuencias de las regiones promotoras de estos genes. Para complementar la información para este análisis, se secuenció la región promotora del operón *nifHDK* de *R. tropici* CFN299 (tipo IIA), y se depositó en la base de datos de NCBI con el número de acceso AF314054. En la **Fig. 18** se muestra la comparación con las regiones promotoras de *nifHa* y *nifHc* de la cepa CFN<sub>42</sub>. Entre otros *rhizobia* que se asocian con frijol se encuentra *Rhizobium sp.* NGR234, aislada de Nueva Guinea y que presenta el rango de hospedador más grande conocido: 110 géneros de leguminosas. Presenta dos reiteraciones del operon *nifHDK*. Pero no sólo los simbioses de frijol presentan reiteraciones del gene *nifH*, también *R. trifolii* (del trébol, 3 reiteraciones) y *R. leguminosarum* biovar *viciae* (del haba, 3 reiteraciones).

El análisis de las regiones promotoras se extendió a los organismos mencionados y para comparación se usó la región promotora de *nifHDK* de *S. meliloti* y como secuencia menos relacionada (*outgroup*) la región promotora del operón *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae*. Se obtuvieron las secuencias de las bases de datos y para alinearlas se empleó el programa DIALIGN ([http:// bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/submission.html](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/submission.html), Morgenstern *et al.*, 1996) (**Fig. 19**). Se analizaron las reiteraciones *nifHa* de CFN<sub>42</sub> y CIAT652, las que corresponderían a *nifHa*, *nifHb* y *nifHc* de *R. leguminosarum* bv *viciae* (marcadas *R. l-1*, 2 y 3), las tres de *R. trifolii* (marcadas *R. t-1*, 2 y 3), las 2 de NGR234 y las únicas de *R. tropici*, *S. meliloti* y *K. pneumoniae*.

Puede observarse que las secuencias del promotor y de la región activadora de acoplado a NifA están conservadas. El promotor presenta las posiciones -25, -24 y -13 absolutamente. En el caso de los organismos con reiteraciones o relacionados con frijol presentan la posición -12 (A) desviada del consenso (C) y como se vio en

la sección anterior, son promotores de baja afinidad por el factor Sigma 54. La secuencia UAS, de pegado del activador NifA, tiene el motivo consenso TGT-N<sub>10</sub>-ACA, excepto en las reiteraciones tipo *nifHc*, que es TGG-N<sub>10</sub>-ACA. Como lo demostró Valderrama (1996) para la cepa CFN<sub>42</sub>, el sitio desviado de las reiteraciones tipo *nifHc* es reconocido por NifA. Interesantemente, aunque las reiteraciones de *R. leguminosarum* bv *viciae* pueden clasificarse como tipos *nifHa* y *nifHc*, el UAS es consenso en este último caso.

Otro parámetro de análisis es la distancia entre promotor y UAS, ya que la activación transcripcional es dependiente de fase (como en NtrC) y la distancia entre estos dos elementos *cis* es un factor crítico para la eficiencia de transcripción. El cálculo para las vueltas implica aplicar el factor 10.5 bases/vuelta, típico para el ADN tipo B (Lescrinier *et al.*, 2003). Puede notarse que en las reiteraciones tipo *nifHa* la distancia es 8.7 vueltas helicoidales de ADN y en las tipo *nifHc* de 8.2 vueltas. Para el caso de *R. trifolii*, los dos elementos en las tres reiteraciones están colocados a vueltas intermedias (8.6, 8.5 y 8.4 respectivamente). El caso de *R. leguminosarum* bv *viciae* es idéntico que las reiteraciones de *R. etli*, así como para la cepa CIAT652, con lo cual se predice que estos organismos van a compartir la expresión diferencial de estas reiteraciones (**Fig. 19**). Para el caso de *R. tropici*, también simbionte del frijol, la distancia es de 8.6 vueltas y conserva una identidad de 83% con la reiteración tipo *nifHa* y de 78% con la tipo *nifHc*. La mayor identidad con *nifHa* apoyaría que una fusión de este tipo se transcriba mejor que una *nifHc* en este organismo (ver sección anterior).

En la **Fig. 19** se puede observar que el nivel de identidad cuando se comparan todas las regiones es de cerca del 15%, pero en realidad se forman dos tipos de regiones entre los organismos con tres reiteraciones (*R. etli*, *R. leguminosarum* bv *viciae* y CIAT652). El nivel de identidad de estos dos grupos entre sí es del 97%, en promedio. Se observan pequeños segmentos ausentes-presentes de 4-5 bases al comparar los dos tipos de regiones regulatorias. Estos segmentos se denominan *indels* (por *insertion-deletion*) y se ha propuesto que en los organismos la microevolución de secuencias cercanamente relacionadas es por el cambio de

segmentos pequeños de secuencia de ADN (*indels*), más que a través de sustituciones de bases individuales (Britten *et al.*, 2003).

De este alineamiento se obtuvo un árbol filogenético usando los programas Phylip (Phylogeny Inference Package, por J. Felsenstein, mediante el método UPGMA) y TreeViewPPC (por R. Page) que se muestra en la **Fig. 20**. Se observa claramente que las regiones promotoras tipo *nifHa* se separan de las tipo *nifHc*. La rama más cercana a *nifHa* es la de *R. tropici*, que además comparte la distancia de promotor-UAS con *nifHa*. A continuación se localizan las dos reiteraciones de NGR234, que son 81% idénticas entre sí y que difieren por 3 bases en distancia promotor-UAS, por lo que es difícil predecir el nivel de activación transcripcional para ellas. Perret y colaboradores no encontraron diferencias en la expresión en simbiosis de estas reiteraciones (Perret *et al.*, 2000). En estas ramas quedaron los simbiontes de frijol y bifurcan con la de *S. meliloti* y a su vez bifurcan de las tres reiteraciones de *R. trifolii*. El nivel de identidad entre las regiones promotoras de las reiteraciones de *R. l. trifolii* es 78.5%, sin embargo, dos de ellas (*R. t-1* y *R. t-2*) son idénticas en 96.6% de la secuencia. Estas dos reiteraciones semejarían a las de *nifHa* y *nifHb* de los simbiontes de frijol con tres reiteraciones. Las distancias entre promotor-UAS es muy semejante para las tres (**Fig. 19**).

Así, puede inferirse que las reiteraciones múltiples de los operones completos de la nitrogenasa *nifHDK* (a y b) en estos organismos divergieron concertadamente, como lo revela su alta identidad, posiblemente por conversión génica (Rodríguez y Romero), y que la tercera reiteración (tipo *nifHc*) presenta diferencias por *indels* respecto a las otras dos. Estas diferencias son fundamentales para determinar el alto nivel de expresión transcripcional, como se observó en los casos de *R. etli* CFN42 y *R. sp.* CIAT652. En el caso de *R. tropici*, presenta una región promotora tipo *nifHa* y como se mostró en la sección anterior, en este fondo está mejor adaptada que la tipo *nifHc*. La alta tasa transcripcional de *nifHa* en *R. tropici* puede depender de factores adicionales como una alta afinidad de NifA o puede existir activación heteróloga o cruzada, como en el caso de NtrC en la activación de DctAB en *S. meliloti* (Reid y Poole).

A

Re-nifHa -----TTTGTCTGATCGGGCGACAT  
 RtCFN299 CGCCCAGGCTTTATCAGTTTACTGCGACACAATGCGTCCGATTTGTCTGGGCCCCGCGACAA  
\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*  
UAS

Re-nifHa TAGGTTTGTTTGGCAGT--TTCCTGTGGTGGTTCCGAGTAACTTTCTGAAACCCAACAAA  
 RtCFN299 -AGGCTTGTCAGTTGGAGCGCATGTACTGGCGCAGC-TAAATAGCTGAAAAACAATCAA  
\*\*\* \*\* \*

Re-nifHa AGGATCTTTCCTTTGGCTCGATCGGCCACATGGCACGGGTTTGAAGATTGCCATGCGA  
 RtCFN299 GAGAGTTTCCCTTCAAGTCGACTG-CCAACTTGGCACGCGTTTGAACGCTTCTCGGGC  
\*  
PROMOTOR

Re-nifHa GCGGGCGAGCTGCCTGCCTTTTACTC-AGCGATGGATGGAACG-AAAGAAGGAAGGCG  
 RtCFN299 GCGGGCGAGCTGCCGACCGACTCCGC-GACGGATG-----ACG-AAAGAAGGAAGGC-  
\*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

B

Re-nifHc -----TTTGGCGGTTTCGAGACAA  
 RtCFN299 TCGCCAGGCTTTATCAGTTTACTGCGACACAATGCGTCCGATTTGTCTGGGCCCCGCGACAA  
\*\*\*\* \* \* \* \* \*  
UAS

Re-nifHc -GAGTTTGTGATCCCGCCTTCGAAAGTT--CGGAAC TAAATAGCTGAAGATCAG-CAA  
 RtCFN299 -AGGCTTGTCAGTTGGAGCGCATGTACTGGCGCAGCTAAATAGCTGAAAAACAATCAAG  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Re-nifHc ACAGCTGTTTTATATGCTG-CTGCCACATGGCACGGGTTTGAAGATTGCCATGCGAG  
 RtCFN299 AGAGTTTCCCTTCAAGTCGACTGCCAACTTGGCACGCGTTTGAACGCTTCTCGGCGG  
\*  
PROMOTOR

Re-nifHc GCGGGCGAGCTGCCTGCCTTTTACTCA-GCGATGGATGGAACG-AAAGAAGGAAGGCGA  
 RtCFN299 GCGGGCGAGCTGCCGACC---GACTCC-GCGACGGATG--ACG-AAAGAAGGAAGGCAA  
\*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Identidad con la región promotora *nifHa*, 76/92, 82.6%.  
 Identidad con la región promotora *nifHc*, 72/92, 78.3%.

Fig. 18 Alineamiento de la región promotora del operon *nifHDK* de *R. tropici* CFN299 con las reiteraciones A) *nifHa* y B) *nifHc* de la cepa *R. etli* CFN42.

**R. trifolii-1** TTGTCGACTTCGAGACA CGTCTTAGGA--TT-----CTTCGGTCCGATATTTTA-  
**R. trifolii-2** TTGTCGACTTCGTGACA CGTCTTAGGA--TT-----CTTCGGTCCGGTATTTTA-  
**R. trifolii-3** TTGTCGGCTTCGTGACA CGGTTTAGGA--TT-----CTTCGGTCCAGTATTTTA-  
**R. legum.-3** TTGTCTGATCGGCGACA TTAGGTTTGTGTTGGCAGTT-----TCCTGTGGTGGT-  
**R. legum.-1** TTGTCTGATCGGCGACA TTAGGTTTGTGTTGGCAGTT-----TCCTGTGGTGGT-  
**R. etli-Ha** TTGTCTGATCGGCGACA TTAGGTTTGTGTTGGCAGTT-----TCCTGTGGTGGT-  
**R. CIAT-Ha** TTGTCTGATTGGCGACA TTAGGTTTGTGTTGGCAGTT-----TCCTGTGGTGGT-  
**R. etli-Hc** TTGGCGGTTTCGAGACA AGAGTTTGTC----GATCCCGCCTTCGAAA-----GTT-  
**R. CIAT-Hc** TTGGCGGTTTCGAGACA AGAGTTTGTC----GATCCCGCCTTCGAAA-----GTT-  
**R. legum.-2** TTGGCGGTTTCGAGACA AGAGTTTGTC----GATCCCGCCTTCGAAA-----GTT-  
**NGR234-H1** TTGTTCGGCTCCGCGACA CATGCTTGCGTTTT-----AATGCGGGCGCTCTCTTT-  
**NGR234-H2** TTGTTCGGCTCCGCGACA CAGGCTTGCTTC-----TGGGTTCGGCTACTTCTC  
**R. tropici** TTGTTCGGCCCCGCGACA AAGGCTTGTC----CAGTTGGAGCGCATGT-----ACTGG-  
**S. meliloti** TTGTTCGGCTTAGCGACA CGAGTTGTTTCGCT-CA-----ACCATTGGTCAATTTT  
**K. pneumoniae** TTGTTCTGTTTCCACACA TTTGGTCGCC-T-TATTGTGC-CG-TTTTGTGTTTACGTCCT

UAS

**R. trifolii-1** TCCCTCTAAG TGTGTTGCGGC A-CACCAAAT TCCG--TTCT GCCACATCAA  
**R. trifolii-2** TCCCTCTAAG TGTGTTGCGGC AGCGCCAAAT TCCG--TTCT GCCACATCAA  
**R. trifolii-3** AACCTCTAAG TGTCTGTGGC AGCACCAACT TTCG--TTCT GCCTa-T---  
**R. legum.-3** TCGGAGTAAC TTTCTGAAAC C-CAACAAAA AGATCTTTCC TTTGGCT---  
**R. legum.-1** TCGGAGTAAC TTTCTGAAAC C-CAACAAAA GGATCTTTCC TTTGGCT---  
**R. etli-Ha** TCGGAGTAAC TTTCTGAAAC C-CAACAAAA GGATCTTTCC TTTGGCT---  
**R. CIAT-Ha** TCGGAGTAAC TTTCTGAAAC C-CAACAAAA GGATCTTTCC TTTGGCT---  
**R. etli-Hc** CGGAACTAAA TAGCTGAAGA T-CAGCAAAA C-AGCTGTTT TATATGCTG-  
**R. CIAT-Hc** CGGAACTAAA TAGCTGAAGA T-CAGCAAAA C-AGCTGTTT TATATGCTG-  
**R. legum.-2** TGGAAATAAA TACGTGAAGA T-CACGAAAA C-AaCTGTTT TATATGCTG-  
**NGR234-H1** TTGGTCTAAG CGGCTGAGAA ATCTGGAAAA TCGGG----- ----CAGCCA  
**NGR234-H2** CTAATCTAAG TAGCTGAAA A-GAAGGTAA ACCAGTTCT GCTGGGctCA  
**R. tropici** CGCAGCTAAA TAGCTGAAA A-CAATCAAG AGAGTTTCCC TTCaAgtcgA  
**S. meliloti** CAGATCTAAC TATCTGAAAG A-AAGCCGAG T-AGTTTTAT TTCAgac---  
**K. pneumoniae** -----GC GCGGCGACAA ATAACCTAAT TCATAAAAAT CATAAGAATA

				DISTANCIA	PROM-UAS
				bp	vueltas
<b>R. trifolii-1</b>	TCCGC-----	----CCAGTC	TGGCACGACGCTTGAAAA	89	8.5
<b>R. trifolii-2</b>	TCCGC-----	----CCAGTC	TGGCACGACGCTTGAAAA	90	8.6
<b>R. trifolii-3</b>	-----CAA	TCAGCTCAAT	TGGCACGACGCTTGAAAA	88	8.4
<b>R. legum.-3</b>	-----CGA	TCGGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	91	8.7
<b>R. legum.-1</b>	-----CGA	TCGGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	91	8.7
<b>R. etli-Ha</b>	-----CGA	TCGGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	91	8.7
<b>R. CIAT-Ha</b>	-----CGA	TCGGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	91	8.7
<b>R. etli-Hc</b>	-----	-CTGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	86	8.2
<b>R. CIAT-Hc</b>	-----	-CTGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	86	8.2
<b>R. legum.-2</b>	-----	-CTGCCACA	TGGCACGGGTTTTGAAGA	86	8.2
<b>NGR234-H1</b>	ACCCTGCGC	TCCACCGACT	TGGCACGGCTTTTGAAGC	94	9.0
<b>NGR234-H2</b>	CCCTCCT---	----CGACT	TGGCACGGCTTTTGAAGC	91	8.7
<b>R. tropici</b>	-----	-CTGCCAAT	TGGCACGCGTTTTGAAAC	90	8.6
<b>S. meliloti</b>	-----	-----GGC	TGGCACGACTTTTGCACG	80	7.6
<b>K. pneumoniae</b>	CA---TAAA	CAGGCACGGC	TGGTATGTTCCCTGCACT	96	9.1

PROMOTOR

Fig. 19 Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de *nifH* de Rhizobiaceas.

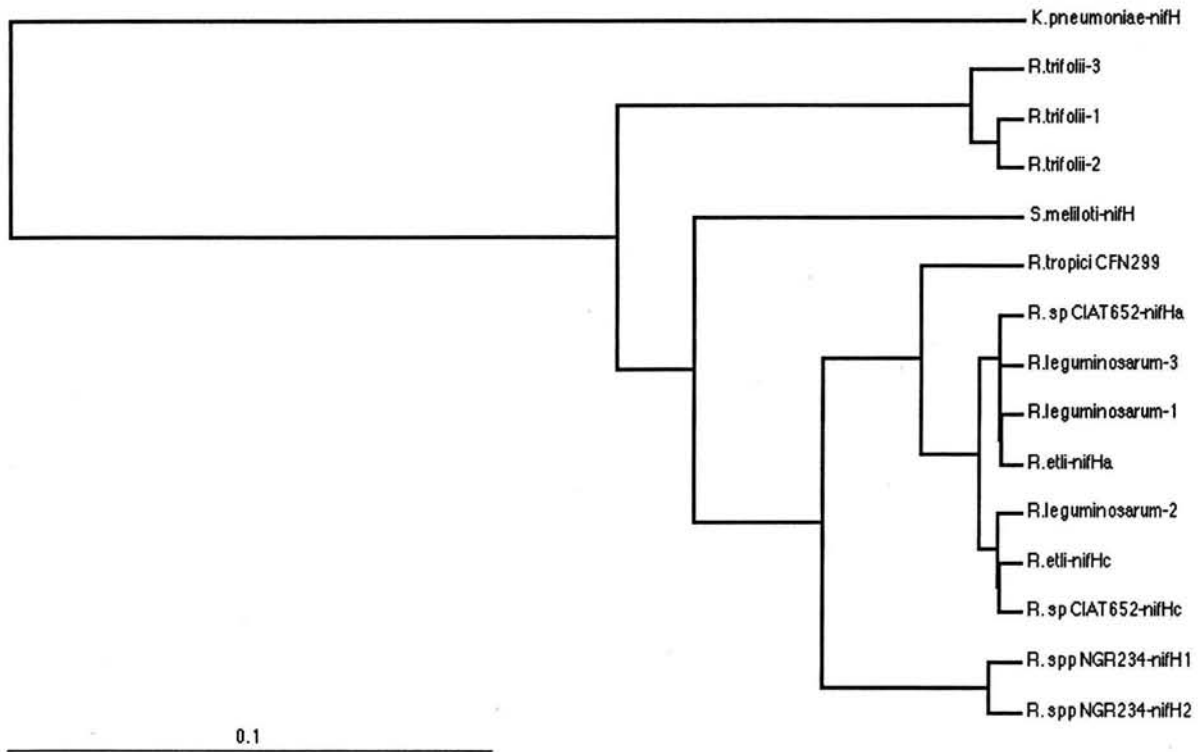


Fig. 20 Arbol filogenético de las regiones promotoras de *nifH* de Rhizobiaceas.



## 6 REFERENCIAS

- Barrios H, Valderrama B y Morett E. 1999. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucl Acids Res* 27(22):4305-4313.
- Bascones E, Imperial J, Ruiz-Argueso T y Palacios J M. 2000. Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel hup minitransposon. *App. Environ. Microbiol.* 66:4292-4299.
- Batut J y Boistard P. 1994. Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66(1-3):129-50.
- Bosworth A H, Williams M K, Albrecht K A, Kwiatkowski R, Beynon J, Hankinson T R, Ronson C W, Cannon F, Wacek T J y Triplett E W. 1994. Alfalfa yied response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. *App. Environ. Microbiol.* 60:3815-3832.
- Britten R J, Rowen L, Williams J, y Andrew Cameron R. 2003. Majority of divergence between closely related DNA samples is due to indels. *PNAS* 100: 4661-4665.
- Broughton W J y Perret X. 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr Opin Plant Biol* 2:305-311.
- Castellanos J. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol *Phaseolus vulgaris* en México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47:163-167.
- Cevallos M A, Encarnación S, Leija A, Mora Y y Mora J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178:1646-1654.
- Chen W M, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Bena G y Boivin-Masson C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185:7266-7272.

- Choo Q C, Samian M R y Najimudin N. 2003. Phylogeny and characterization of three *nifH*-homologous genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Appl Environ Microbiol* 69(6):3658-3662.
- Debarbuille M, Verstraete M, Klier A y Rapaport G. 1991. The *Bacillus subtilis sigL* gene encode an equivalent of sigma 54 from gram negative bacteria. *Proc Natl Acad of Sci* 88 9092-9096.
- Debelle F, Moulin L, Mangin B, Denarie J y Boivin C. 2001. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim Pol* 48:359-365.
- D'haeze W y Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12:79R-105R.
- D'hooghe I, Michiels J y Vanderleyden J. 1998. The *Rhizobium etli* FixL protein differs in structure from other known FixL proteins. *Mol Gen Genet* 257:576-580.
- Dominic B, Chen Y B y Zehr J P. 1998. Cloning and transcriptional analysis of the *nifUHDK* genes of *Trichodesmium sp.* IMS101 reveals stable *nifD*, *nifDK* and *nifK* transcripts. *Microbiology* 144:3359-68.
- Downie J y Walker S A. 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol* 2:483-489.
- Encarnación S, Calderón J, Gelbard A S, Cooper A J y Mora J. 1998. Glutamine biosynthesis and the utilization of succinate and glutamine by *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 144:2629-2638.
- Fischer H M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *rhizobia*. *Microbiol Rev* 8:352-386.
- Foussard M, Garnerone A M, Ni F, Soupene E, Boistard P y Batut J. 1997. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. *Mol Microbiol* 25(1):27-37.

Gallon J R. 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. *Trends in Biol Sci* 6:19-25.

Georgiadis M M, Komiya H, Chakrabarti P, Woo D, Kornuc J J y Rees D C. 1992. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein *from Azotobacter vinelandii*. *Science* 257(5077):1653-1659.

Girard L, Brom S, Davalos A, Lopez O, Soberon M y Romero D. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL-fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1283-1292.

Golden J W y Yoon H S. 2003. Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr Opin Microbiol* 6:557-63.

Halbleib C M y Ludden P W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr* 130(5):1081-1084.

Hirsch A, Lum M y Downie A. 2001. What makes the *rhizobia*-legume symbiosis so especial? *Plant Physiol* 127:1484-1492.

Hoover I, Santero E, Porter S y Kustu S. 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator of nitrogen fixation operons. *Cell* 63 11-22.

Igarashi R Y y Seefeldt L C. 2003. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:351-384.

Jack R, De Zamaroczy M y Merrick M. 1999. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 181(4):1156-62.

Joshi H M y Tabita F R. 1996. A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci* 93:14515-14520.

Kim J, Woo D y Rees D C. 1993. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. *Biochemistry* 32:7104-7115.

Lescrinier E, Froeyen M y Herdewijn P. 2003. Difference in conformational diversity between nucleic acids with a six-membered “sugar” unit and natural furanose nucleic acids. *Nucl Acids Res* 31:2975-2989.

Lynch T W, Read E K, Mattis A N, Gardner J F y Rice P A. 2003. Integration host factor: putting a twist on protein-DNA recognition. *J Mol Biol.* 330(3):493-502.

Mandon K, Michel-Reydellet N, Encarnación S, Kaminski P A, Leija A, Cevallos M A, Elmerich C y Mora J. 1998. Poly-β-hydroxybutyrate turnover in *Azorhizobium caulinodans* is required for growth and affects *nifA* expression. *J Bacteriol* 180:5070-5076.

Merrick M J. 1993. In a class of its own- the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* 10: 903-909.

Michiels J, D'hooghe I, Verreth C, Pelemans H y Vanderleyden J. 1994. Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *nifA* gene, a positive regulator of *nif* gene expression. *Arch Microbiol* 161 (5): 404-408.

Michiels J, Moris M, Drombecht B, Verreth C y Vanderleyden J. 1998. Differential regulation of *Rhizobium etli* *rpoN2* gene expression during symbiosis and free living growth. *J Bacteriol* 180: 3620-3628.

Molina-López J, Govantes F y Santero E. 1994. Geometry of the process of transcription activation at the sigma 54-dependent *nifH* promoter of *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 269:25419-25425.

Morett E y Buck M. 1989. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase-σ<sub>54</sub> with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters. *J Mol Biol* 210 65-77

Morett E y Segovia L. 1993. The σ<sub>54</sub> bacterial enhancer-binding protein family: Mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* 175:6067-6074.

Morgenstern B, Dress A y Werner T. 1996. Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison. *Proc Natl Acad Sci* 93:12098-12103.

Moris M, Dombrecht B, Chuanwi X, Vanderleyden J y Michiels J. 2004. Regulatory role of *Rhizobium etli* CNPAF512 *fmrN* during symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 70:1287-1296.

Morris L, Cannon W, Cleverie-Martin F, Austin S y Buck M. 1994. DNA distortion and nucleation of local DNA unwinding within  $\sigma_{54}$  holoenzyme closed promotor complexes. *J Biol Chem* 269 11563-11571.

O' Brian M R y Maier R.J. 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbioses. *Biochim Biophys Acta* 974:229-46.

Oke V y Long S R. 1999. Bacteoid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol.* 2:641-646.

Olah B, Kiss E, Gyorgypal Z, Borzi J, Cinege G, Csanadi G, Batut J, Kondorosi A y Dusha I. 2001. Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:887-894.

Pérez-Martín J, Rojo F y de Lorenzo V. 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol Rev* 58: 268-290.

Perret X, Freiberg C, Rosenthal A, Broughton W J y Fellay R. 1999. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol* 32:415-425.

Perret X, Staehlin C y Broughton W. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180-201.

Poole R K y Hill S. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*-roles of the terminal oxidases. *Biosci Rep* 17:303-17.

Poole, R K. 1994. Oxygen reactions with bacterial oxidases and globins: binding, reduction and regulation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65:289-310.

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

Rangaraj P y Ludden P W. 2002. Accumulation of 99Mo-containing iron-molybdenum cofactor precursors of nitrogenase on NifNE, NifH, and NifX of *Azotobacter vinelandii*. J Biol Chem. 277(42):40106-40111.

Rangaraj P, Shah V K y Ludden P W. 1997. ApoNifH functions in iron-molybdenum cofactor synthesis and apodinitrogenase maturation. Proc Natl Acad Sci 94:11250-11255.

Reid C J y Poole P S. 1998. Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. J Bacteriol 180:2660-2669.

Reitzer L y Schneider B L. 2001. Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 65(3):422-444.

Ribbe M W, Hu Y, Guo M, Schmidt B y Burgess B K. 2002. The FeMoco-deficient MoFe protein produced by a *nifH* deletion strain of *Azotobacter vinelandii* shows unusual P-cluster features. J Biol Chem. 277(26):23469-23476.

Robinson A C, Dean D R y Burgess B. 1987. Iron-Molybdenum cofactor biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* requires the iron protein of nitrogenase. J Biol Chem 262:14327-14332.

Robson R L. 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. Biochemical J 181: 569-575.

Rodríguez C y Romero D. 1998. Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. Genetics 149:785-94.

Rosado A, Duarte G, Seldin, L y Van Elsas J D. 1998. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. App. Env. Microbiol 64:2770-2779.

Rudnick P, Kunz C, Gunatilaka M K, Hines E R y Kennedy C. 2002. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. 184:812-820.

Schmitz R, Klopprogge K y Grabbe R. 2002. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. J Mol Microbiol Biotechnol 4:235-42.

Schubert K R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants synthesis transport and metabolism. Annu Rev Plant Physiol 37 539-574.

Schultze M y Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. Annu Rev Genet 32:33-57.

Soberón M, Lopez O, Morera C, Girard ML, Tabche ML y Miranda J. 1999. Enhanced nitrogen fixation in a *Rhizobium etli ntrC* mutant that overproduces the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic terminal oxidase *cbb3*. Appl Environ Microbiol 65:2015-2019.

Thorneley R N y Ashby G A. 1989. Oxidation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates of *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments. Biochem J 261:181-187.

Valderrama B, Dávalos A, Girard L, Morett E y Mora J. Regulatory proteins and *cis*-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. J Bacteriol 178:3119-3126.

Wang S Z, Chen J S y Johnson J L. 1988. The presence of five *nifH*-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. Nucl Acids Res 16(2):439-454.

Wang E T, van Berkum P, Bayene D, Sui X H, Dorado O, Chen W X y Martínez-Romero E. 1998. *Rhizobium huautlense sp nov*, a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. Int J Syst Bacteriol 48:687-699.

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

Xu H y Hoover T. 2001. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. Curr Opin Microbiol 4:138-144.

Yun A C, Noti J D y Szalay A A. 1986. Nitrogenase promoter-*lacZ* fusion studies of essential nitrogen fixation genes in *Bradyrhizobium japonicum* 1110. J Bacteriol 167:784-791.



## 7 ABREVIATURAS USADAS

ATP	Trifosfato de adenosín.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
ARN	Acido ribonucleico.
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
IHF	<i>Integration host factor.</i>
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio.
<i>lacZ</i>	Gene de la $\beta$ -galactosidasa.
NADH (NADPH)	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido (fosfato).
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio.
NifA	Activador general de la fijación de nitrógeno.
NifH	Dinitrogenasa reductasa o proteína Hierro (Fe).
NifD	Nitrogenasa o proteína Hierro-Molibdeno (Fe Mo), subunidad $\alpha$ .
NifK	Nitrogenasa o proteína Hierro-Molibdeno (Fe Mo), subunidad $\beta$ .
PDH	Piruvato deshidrogenasa.
PHB	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato.
pr c <i>nifHcDK</i>	Región promotora de <i>nifHc</i> acoplada al operón <i>nifHDK</i> .
$\sigma_{54}$ (sigma 54)	Factor sigma 54.
UAS	<i>Upstream activator sequences.</i>
UR	Uracyl removing protein.
USDA	United States-Department of Agriculture
UT	Uracyl transferring protein.