

CFN.1
TL
1985



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del C.C.H.

Estudio de Rearreglos Genómicos en Rhizobium spp. que
Alteran los Niveles de Fijación de Nitrógeno
en Phaseolus vulgaris.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO



U. N. A. M.
BIBLIOTECA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA
Marco Aurelio Pardo Galván
Julio de 1985

75 9616



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A G R A D E C I M I E N T O S

Mi agradecimiento a Espe, por la satisfacción de colaborar con ella. A Rafael, por sus enseñanzas y su preocupación en mi formación profesional. A Federico, Daniel y Carlos, por su amistad y su interés en mi trabajo. A Humberto, Margarita, Mac y Amparo.

Un profundo agradecimiento a mis padres, por su cariño, su apoyo y su ejemplo. A mis hermanos, por su confianza. Agradezco a Gaby, Paco y Yunuén porque han seguido de cerca toda mi carrera profesional.

A Enrique, Lorenzo y Mario por brindarme su amistad siempre, se les agradece, lampiños.

A la Universidad, por lo que representa y por lo que me ha brindado.

C O N T E N I D O

- Introducción
- Materiales y Métodos
- Resultados
- Discusión
- Referencias

INTRODUCCION

El proceso de la fijación de nitrógeno contribuye al reciclaje de este elemento en la biósfera, mediante la reducción del nitrógeno molecular a compuestos asimilables por los organismos vivos. La fijación de nitrógeno la llevan a cabo solo organismos procariotes y esta capacidad está distribuida tanto en bacterias gramnegativas como en el grupo de las grampositivas. Existen dos estados biológicos en los que estos microorganismos pueden fijar nitrógeno: uno es en vida libre y otro es en simbiosis. Los estudios sobre la fijación de nitrógeno en vida libre se han realizado principalmente en la enterobacteria Klebsiella pneumoniae. Se sabe que intervienen 17 genes en este proceso, organizados en siete u ocho operones. Entre estos genes se encuentran los estructurales que codifican para la enzima nitrogenasa, que es la que lleva a cabo la reacción de reducción del nitrógeno molecular hasta amonio. Esta enzima tiene dos componentes: el primero es un tetrámero de dos subunidades distintas que requiere hierro y molibdeno como cofactores, y el segundo, llamado nitrogenasa reductasa, es un dímero de subunidades idénticas que requiere hierro como cofactor. En K. pneumoniae, al componente uno lo codifican dos genes llamados nifD y nifK, y a la nitrogenasa reductasa la codifica el gene nifH (Roberts, 1981).

Fijación de nitrógeno en simbiosis.

Algunas bacterias fijan nitrógeno en simbiosis con algunas plantas. De estos sistemas simbióticos los más estudiados han sido los que se realizan entre plantas de la familia de las leguminosas y bacterias del género Rhizobium. Convencionalmente, se considera que existen dos procesos durante la relación simbiótica entre estos dos organismos: la nodulación y la fijación de nitrógeno.

a). Nodulación.

Los procesos simbióticos mejor estudiados han sido los que se llevan a cabo en alfalfa, chícharo y en trébol. En estos sistemas, la nodulación se inicia con el reconocimiento del Rhizobium por el pelo radicular de la planta. Se ha propuesto que ciertos polisacáridos intervienen en este reconocimiento (Dazzo, 1979). El pelo radicular se deforma y subsecuentemente es invadido por el Rhizobium. Existen varias formas en las que una bacteria invade a una planta. - Puede realizarse mediante una penetración a través de los - espacios intercelulares, como es el caso en cacahuete (Dazzo, 1979); o por invasión de células epidérmicas (Bal y - Wong, 1982). Sin embargo, la forma de infección mejor estudiada es a través de hilos de infección como en alfalfa, - chícharo y trébol. Aquí la bacteria penetra dentro del pelo radicular y es envuelta en una estructura tubular llamada hilo de infección, la cual se prolonga hasta las células meristemáticas de la corteza. Se produce entonces una gran proliferación de estas células corticales. La bacteria invade el citoplasma de estas células y queda envuelta por - una membrana. Enseguida, la bacteria se multiplica y sufre una serie de cambios morfológicos. A la bacteria en este - estado de diferenciación se le conoce como bacteroide, que es el estado diferenciado en el que fija nitrógeno en la - planta. Simultáneamente, la célula invadida crece en tamaño y en cantidad de organelos y amiloplastos. Estos eventos culminan en la formación de una estructura llamada nódulo, que es finalmente el lugar donde se realiza la fijación de nitrógeno.

Se conoce poco acerca de los genes bacterianos que intervienen en la nodulación. En R. meliloti, Long, et. al. (1982) clonaron una región que contiene genes que complementan a mutantes en nodulación. En una cepa de R. meliloti - (cepa 41) se encontró que existen dos regiones en el plásmi

do simbiótico (definido como aquél plásmido que contiene información para funciones simbióticas. Ver más adelante) - que contienen genes esenciales de nodulación; en una de estas regiones se encuentran probablemente los genes de especificidad por el huésped (genes hsn), y en la otra región - se han encontrado tres genes nod que, por experimentos de hibridación y de complementación interespecífica de mutantes, se encuentran representados en otros Rhizobia, por lo que se les ha llamado "genes comunes de nodulación" (Kondrosi, et. al., 1984; Torok, et. al., 1984).

En R. leguminosarum se encontraron sólo tres mutantes en nodulación de 200 inserciones independientes del transposón Tn5 en el plásmido simbiótico pRLlJ1. Estas inserciones mapearon muy cerca una de otra y al obtener los genes silvestres de estas mutantes, se encontró que estaban contenidos en un fragmento de 10 kilobases (kb). Este fragmento confería por sí mismo la capacidad de nodular chícharo a cepas que carecían de plásmido simbiótico (Downie, 1983), por lo que se cree son relativamente pocos los genes necesarios por parte de la bacteria para nodular. En R. trifolii, mutagenizando con Tn5, se encontró que las regiones nod y nif se encuentran separadas por 16 Kb una de otra en el plásmido Sim (Schofield, et. al., 1983).

Existen genes de ambos simbiosomas que sólo se expresan en el nódulo, como es el caso de la leghemoglobina, enzima encargada de atrapar oxígeno y de mantener baja la tensión parcial de este elemento, que es la condición en que la nitrogenasa funciona. La leghemoglobina es un buen ejemplo de la relación simbiótica que llevan a cabo Rhizobium y la planta: la globina es proporcionada por la célula vegetal y el grupo hemo por el bacteroide. (Appleby, 1974).

b). Fijación de nitrógeno,

La fijación de nitrógeno se lleva a cabo dentro del nódulo por el bacteroide. Este reduce al nitrógeno molecular hasta amonio y lo exporta al citoplasma de la célula infectada. El amonio es asimilado y exportado al resto de la planta a través del xilema en aminoácidos o ureidos. La planta, a través del floema, provee de fotosintato al bacteroide para proporcionarle los nutrientes para su mantenimiento y la energía necesaria para la fijación del nitrógeno.

A diferencia de K. pneumoniae, se sabe poco de los genes que intervienen en la fijación de nitrógeno en Rhizobium. Se sabe que los genes estructurales de la nitrogenasa se encuentran muy conservados en estos microorganismos, como lo demuestran Ruykun y Ausubel (1980). En R. leguminosarum, R. meliloti y R. trifolii los genes estructurales están arreglados en la misma forma que en K. pneumoniae (Corbin, 1983; Schetgens, 1984). En R. phaseoli (Quinto, 1982) y en R. japonicum de crecimiento rápido (Prakash, 1984), se ha demostrado que estos genes están reiterados (ver más adelante). En R. japonicum de crecimiento lento estos genes están localizados en el cromosoma (Haugland y Verma, 1981). También en R. japonicum (Kaluza, 1983; Kaluza, 1984) y en Parasponia Rhizobium (Scott, 1983) los genes estructurales de la nitrogenasa están organizados en dos operones, uno con nifH y otro con nifDK.

En R. meliloti se encontró, en base a una mutagénesis con Tn5 en el plásmido Sim, una región de aproximadamente 15 Kb que contiene genes de fijación de nitrógeno (genes nif) incluyendo a los genes estructurales de la nitrogenasa (Corbin, et. al., 1983; Ruykun, et. al., 1982). En R. leguminosarum, también a través de una mutagénesis con Tn5 en el plásmido Sim, se han encontrado dos regiones nif separadas 4 y 30 Kb de los genes estructurales de la nitrogena-

sa (Qing-Sheng Ma, et. al., 1982),

Localización de los genes de simbiosis en Rhizobium.

En todas las especies de Rhizobium de crecimiento rápido se ha demostrado que los genes de especificidad, algunos de nodulación y de fijación de nitrógeno (entre ellos los genes estructurales de la nitrogenasa) están localizados en plásmidos de alto peso molecular a los que se les denomina pSim (plásmido simbiótico). Esto se ha demostrado utilizando distintas estrategias como son; a). Por eliminación (curación) del plásmido, perdiéndose consecuentemente la capacidad para nodular (Zurkowski, 1982; Scott, 1982), b). Por la transferencia del plásmido a otro Rhizobium curado del plásmido simbiótico, a otra bacteria como en Agrobacterium tumefaciens. En este caso, las receptoras del plásmido adquieren la capacidad de nodular (Scott, 1982; Hooykaas, 1981), c). Por mutaciones en plásmidos que afectan funciones de nodulación o de fijación de nitrógeno, como los estudios hechos en R. phaseoli por Lamb, et. al., (1982) y por Noel, et. al. (1984) y en R. leguminosarum por Buchanan-Wallason (1983); d). Por la localización de los genes de la nitrogenasa en plásmidos. Esto se determinó por experimentos de hibridación heteróloga de perfiles de plásmido de Rhizobium contra un detector que contiene los genes estructurales de la nitrogenasa de K. pneumoniae (ver Quinto, 1982); o localizando los genes por hibridación de clonas que contienen fragmentos de plásmido contra el mismo detector (Nutí, 1979).

Rhizobium y su taxonomía.

El género Rhizobium está constituido por dos grupos de especies que difieren en su velocidad de crecimiento en un medio de cultivo que contiene extracto de levadura (Jordan,

1974). El grupo de Rhizobium de crecimiento rápido incluye, entre otros, a R. leguminosarum, R. meliloti, R. phaseoli y R. trifolii. Las especies de crecimiento lento comprenden a R. lupini, a R. japonicum de crecimiento lento y a un grupo extenso de cepas que nodulan una gran variedad de leguminosas tropicales a los que se les llama Rhizobium miembros del "cowpea miscellany".

Tradicionalmente se han clasificado a los distintos Rhizobia de acuerdo a la leguminosa que nodula. Así, R. leguminosarum es el Rhizobium que nodula al chícharo, R. phaseoli al frijol, R. japonicum a la soya, etc. Esta clasificación ha sido insuficiente para definir una determinada especie de Rhizobium, puesto que se ha encontrado una gran heterogeneidad, tanto a nivel de proteínas como a nivel de DNA, en una misma especie (Roberts, 1980; Hollis, 1981).

La capacidad de inducir nódulos efectivos (capaces de fijar nitrógeno, i.e. Fix+) por una determinada cepa de Rhizobium generalmente está circunscrita a un rango limitado de leguminosas. Así, Rhizobium meliloti infecta Medicago, Trigonella y Melilotus; R. trifolii a Trifolium, etc. Esto se conoce como "especificidad de huésped". Relacionado a esta idea y en un intento de clasificar a los Rhizobia, se estableció hace tiempo el concepto de "grupo de inoculación cruzada" definido por Fred (1932) como "aquel grupo de plantas cuyos Rhizobium son mutuamente intercambiables". Esta clasificación ha sido insatisfactoria pues no todos los Rhizobia de un grupo de inoculación infectan a todas las plantas del grupo o bien, frecuentemente existe infección cruzada entre Rhizobia de distinto grupo de inoculación (Jordan, 1974).

Recientemente Elkan (1984) propuso una nueva clasificación de los Rhizobia utilizando otros criterios como son sus requerimientos nutritivos, relación de bases de DNA, homología de DNA, etc. Con base en estos criterios se ha encontrado que los Rhizobia de crecimiento lento son tan distintos a los de crecimiento rápido, que propone sean considerados como miembros de un género aparte, llamado Bradyrhizobium.

En general, los taxónomos han enfrentado serios problemas en la clasificación de los Rhizobia y será necesario obtener más información que permita mejorar su taxonomía.

Phaseolus vulgaris y la fijación de nitrógeno.

Nosotros estamos interesados en el estudio de los procesos simbióticos que ocurren entre R. phaseoli y Phaseolus vulgaris (frijol común). El género Phaseolus comprende aproximadamente 50 especies todas ellas presentes en México. El origen de estas leguminosas se localiza en Mesoamérica y actualmente se cultiva en la mayor parte de los países del mundo. El frijol es de especial interés para nuestro país, ya que es la principal fuente de proteínas para un gran sector de la población mexicana. En un estudio realizado por E. Martínez (1983) se demostró que la limitante principal en la producción de frijol en ciertas áreas de México no era la disponibilidad de nitrógeno, sino otros factores tales como son el agua, las plagas, las enfermedades y las técnicas de cultivo utilizadas. Se encontró que el nitrógeno obtenido en simbiosis con los Rhizobia nativos cubría la mayor parte de los requerimientos de la planta por este elemento. En otras áreas de cultivo donde el nitrógeno sí es limitante no existe una respuesta favorable a la inoculación con Rhizobium, probablemente debida a que los Rhizobia

nativos son altamente competitivos en la infección.

Rhizobium phaseoli y la fijación de nitrógeno.

Al igual que otros Rhizobium, R. phaseoli contiene - - plásmidos de alto peso molecular, uno de los cuales contiene los genes de la nitrogenasa (Soberón, 1983; Quinto, 1982). Además, otros plásmidos participan en funciones de simbiosis (Morett, et. al., en prensa), característica no encontrada en otros Rhizobium.

En R. phaseoli, los genes estructurales de la nitrogenasa se encuentran reiterados. En el caso de la cepa CFN - 42 hay tres copias del gene nifH. Se ha encontrado que las secuencias nucleotídicas son idénticas entre sí y por experimentos de mutagénesis dirigida se ha demostrado que ninguna es indispensable para la fijación de nitrógeno (Quinto, 1985). Por otro lado se ha encontrado (L. Segovia, datos no publicados) que dos de las reiteraciones son operones nifHDK completos y que la tercera sólo contiene al gene - - estructural de la nitrogenasa reductasa (gene nifH).

Existe una cepa de R. phaseoli natural aislada en Colombia llamada CIAT 899 que no tiene reiterados los genes de la nitrogenasa, presenta un comportamiento fisiológico - distinto a los demás R. phaseoli y su genoma es poco homólogo al de los Rhizobium reiterados (Flores, M. y Cevallos, - M.A., datos sin publicar). Actualmente se realizan estudios acerca de esta cepa en cuanto a su simbiosis y a su ubicación evolutiva dentro de las especies de Rhizobium. Martínez, E., et. al. (1985) encontraron una correlación directa entre R. phaseoli reiterado del gene nifH y su capacidad de infectar sólo a P. vulgaris y a especies de leguminosas muy cercanas, como P. coccineus (Fig. 1). En el mismo trabajo,

E. Martínez muestra además que R. phaseoli CIAT 899 y Rhizobium (llamados Rhizobium spp.) originarios de otras leguminosas alejadas filogenéticamente al frijol, pero que nodulan y fijan nitrógeno en esta planta, no presentan reiterado el gene nifH y tienen un rango de infección más amplio en comparación a los R. phaseoli reiterados. Ello sugiere que éstos han sufrido una especialización para infectar sólo a leguminosas del género Phaseolus.

Rhizobium spp. como modelo para el estudio de la fijación de nitrógeno en P. vulgaris.

Uno de los intereses particulares de nuestro grupo es el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales R. phaseoli establece una simbiosis eficiente en fijación de nitrógeno con P. vulgaris. Existen cepas de Rhizobium spp. que muestran alteraciones en la capacidad de fijar nitrógeno eficientemente en frijol. Creemos que el estudio de este sistema nos permitirá conocer los elementos genéticos bacterianos requeridos para lograr una simbiosis eficiente con el frijol. Estas alteraciones en la capacidad de fijar nitrógeno fueron descubiertas por E. Martínez. Ella encontró que las plantas de frijol inoculadas con las cepas CFN 249, CFN 241, CFN 243 y CFN 265 (ver tabla 1), presentaban una heterogeneidad en sus nódulos, con un porcentaje aproximado del 90% de nódulos inefectivos (Fix-) y un 10% de nódulos efectivos (Fix+). Las bacterias recuperadas de los nódulos Fix- continuaban produciendo nódulos fijadores al mismo porcentaje que la cepa original, mientras que las cepas obtenidas de los nódulos Fix+ producían un porcentaje elevado de nódulos fijadores, por lo que se trataba entonces de un cambio genético en la bacteria.

Ambas formas fenotípicas provenían de una misma bacteria original, probado por distintos criterios como son la resistencia a ciertos antibióticos y los perfiles de digestión de genoma total.

De las bacterias recuperadas en frijol, ninguna perdió su capacidad de nodular y fijar nitrógeno eficientemente en su leguminosa original ni a otras leguminosas. Por tal motivo, el cambio de fenotipo Fix- a Fix+ parece ocurrir sólo en P. vulgaris. Esto nos sugiere que existen genes de especificidad para fijar nitrógeno y que, en el caso de estos Rhizobium spp., se expresan a través de cambios genéticos. El cambio fenotípico de Fix- a Fix+ en frijol que se produce en estas cepas de Rhizobium spp., nos permitiría estudiar a estos genes de especificidad de fijación, así como los cambios genómicos que se producen para que estos genes se expresen. En este trabajo pretendo contestar varias preguntas al respecto. Específicamente, deseo conocer la localización de estos cambios en el genoma de la bacteria, esto es, si ocurren en plásmido (y en qué plásmido) o en el cromosoma. Deseo conocer también la frecuencia a la que ocurre la conversión fenotípica de fijación y si es reversible y, finalmente, obtener evidencia que nos permita formarnos una idea del tipo de cambio genómico que provoca el cambio fenotípico en fijación de nitrógeno que observamos en estos Rhizobium spp.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

- Cepas Bacterianas y plásmidos.
Las cepas bacterianas se describen en la tabla 1, así como los plásmidos utilizados, analizados y construídos en este trabajo.
- Medios de cultivo:
 - a) PY.- Peptona de caseína 0.5%. Extracto de levadura 0.3% y CaCl₂ 7 mM.
 - b) PA.- Peptona de caseína 0.4% y MgSO₄ 0.2 mM.
 - c) LB.- Peptona de caseína 0.1 %, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%.
- Concentración de Antibióticos . .
Para Rhizobium: Kanamicina 0.06mg/ml, Rifampicina 0.025mg/ml, Novobiocina 0.075mg/ml, Acido Nalidíxico 0.01mg/ml.
Para E. coli: Tetraciclina 0.03mg/ml, Kanamicina 0.03mg/ml, Ampicilina 0.05mg/ml.
- Temperatura de crecimiento.
Rhizobium fue crecido a 30°C en todas las condiciones. E. coli a 37°C excepto durante las conjugaciones con Rhizobium.
- Tiempo de crecimiento.
Rhizobium crecido en medio PY tiene un tiempo de duplicación de 3-4 hr. y se obtienen colonias aisladas en 3 días. E. coli tiene un tiempo de duplicación de 20 min y se obtienen colonias aisladas en 14 hrs.
- Condiciones de Conjugación.
Siempre en una relación de donadoras/receptoras de 1/10 en medio PY a 30°C .
- Extracción de DNA total.
Se crece a las cepas en 5 ml de PY. Centrifugar los 5 ml a 10,000g por 5 min. Resuspender en 1 ml de Tris/EDTA 50mM/20mM (TE50/20), pH8. Centrifugar a 10,000 g por 5 min. Resuspender en 0.5 ml de TE 50/20 y agregar 0.05 ml de Pronasa 5mg/ml y 0.05 ml de SDS 10% en TE. Incubar 60 min. a 37°C. Pasar 3 veces por jeringa. Extraer 3 veces con Fenol-Cloroformo-Isoamílico en una relación de 24-24-1. respectivamente y dos veces con Cloroformo. Añadir 2.5 vol. de e tanol y 1/10 de vol. de acetato de Sodio 5 M a la fase acuosa. Dejar precipitando por 4 hr o toda la noche a -20°C. Centrifugar 15 min., decantar, secar y disolver la pastilla en 0.1 ml de TE

CEPAS	FENOTIPO SIMBIOTICO	OTRAS CARACTERISTICAS
<u>R. phaseoli</u>		
CFN 42	Nod+ Fix+ en <u>P. vulgaris</u>	Silvestre; 6 megaplásmidos; reiterado del gene H de la nitrogenasa.
<u>Rhizobium spp.</u>		
CFN 249	Nod+ Fix ^d en <u>P. vulgaris</u> Nod+ Fix+ en <u>Dalea</u> y <u>Leucaena</u> .	Silvestre; <u>Rhizobium</u> natural de <u>Dalea</u>
CFN 325	Nod+ Fix+ en <u>P. vulgaris</u> , <u>Dalea</u> y <u>Leucaena</u> .	Derivada de la CFN 249.
CFN 241	Nod+ Fix ^d en <u>P. vulgaris</u> . Nod+ Fix+ en <u>Crotalaria</u> .	Silvestre; <u>Rhizobium</u> natural de <u>Crotalaria</u> .
CFN 326	Nod+ Fix+ en <u>P. vulgaris</u> y en <u>Crotalaria</u> .	Derivada de la CFN 241.
CFN 243	Nod+ Fix ^d en <u>P. vulgaris</u> . Nod+ Fix+ en <u>Dalea</u> .	Silvestre; <u>Rhizobium</u> natural de <u>Dalea</u>
CFN 341	Nod+ Fix+ en <u>P. vulgaris</u> y <u>Dalea</u> .	Derivada de la CFN 243.
CFN 265	Nod+ Fix ^d en <u>P. vulgaris</u> . Nod+ Fix+ en <u>Leucaena</u> .	Silvestre; <u>Rhizobium</u> natural de <u>Leucaena</u> .
CFN 351	Nod+ Fix+ en <u>P. vulgaris</u> y <u>Leucaena</u> .	Derivada de la CFN 265.
<u>E. coli</u>		
HB101		StrA, <u>recA</u> , <u>hsdR</u> , <u>pro</u> , <u>leu</u> , <u>lacY</u> . (Boyer, 1969).

PLASMIDOS	CEPA	CARACTERISTICAS
pDal-4	CFN 249	pSim; de aprox. 300 Kb.
pDal-4fr	CFN 325	" " " "
pRK404	JM83	Tc., <u>lacZ</u>
pRK2013	HB101	Derivada de ColE1 con la región Tra del pRK2.
pSUP5011		Am, Cm, Nm, Tn5mob. (mob del RP4).

TABLA I.- Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo. Los distintos Rhizobium spp. son aislamientos hechos por E. Martínez.

50/20. pH8. Adicionar RNAsa hasta una concentración final de 0.005 mg/ml. Incubar una hr. a 37°C. Extraer 3 veces con Fenol-Cloroformo-Isoamílico y 2 veces con Cloroformo. Precipitar con 2.5 vol. de etanol y 1/10 de vol. de acet. de Sodio 5 M. Dejar precipitando 4 hr. a -20°C. Centrifugar 15 min. Decantar , lavar con etanol al 70% y secar. Resuspender en agua estéril.

- Purificación de megaplásmidos.

Realizado básicamente con la técnica de Hirsch(1980) y cnetrifugado en gradientes de CsCl a una densidad de 1.58 g/ml a 43,000 rpm por 17 hr en el rotor 65 Ti vertical. de Beckman. Se recupera la banda inferior, que representa el DNA superenrollado, con una jeringa. Se dializa la muestra con agua y se precipita con 2.5 vol de etanol y 1/10 de vol de Acet. de Sodio 5 M y finalmente se resuspende en agua estéril.

- Perfil electroforético de plásmidos de alto peso molecular.

Se obtuvieron utilizando las técnicas de Eckhardt(1978) y de Hirsch (1980).

- Condiciones de hibridación.

La transferencia del DNA a filtros de nitrocelulosa se hizo de acuerdo al método de Southern(1975). Los detectores fueron marcados c/Fósforo 32 por "nick translation" (Rigby,1977).

- Técnica de clonación.

Clonación del pDal4 en pRK404 visto en detalle en Martínez(1985). Básicamente se clonaron digestines parciales del pDal4 para obtener clonados fragmentos de aproximadamente 20 Kb.

- Nodulación y determinación de fijación de nitrógeno.

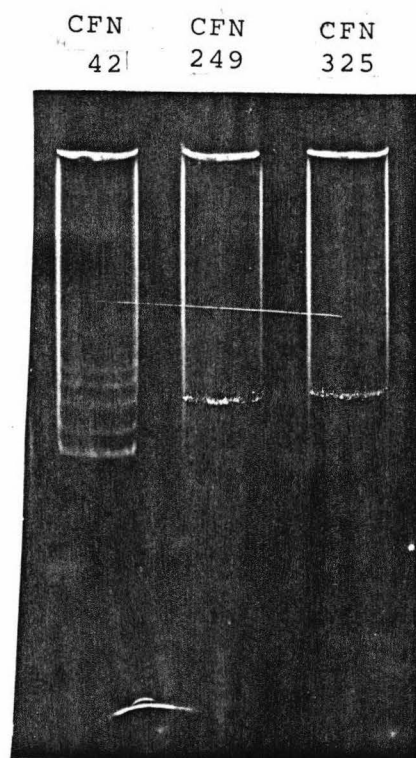
El frijol utilizado fue el cultivar "Negro Jamapa". Las semillas se esterilizaron con etanol por 3 min. y con hipoclorito de Sodio al 50% por 15 min. Se lavan exhaustivamente con agua estéril y se pregerminan por 3 días a 30°C en obscuridad. Se pasan a matraces de 250 ml con 200 ml de medio sin nitrógeno (Wacek,1976), solidificado con .8% de agar. Las plantas fueron inoculadas con 0.2 ml de cultivo bacteriano en saturación. Después los matraces se transfieren a 30°C con luz, humedad y obscuridad controladas.

La actividad de la nitrogenasa fué determinada a los 16 días de inoculación. Esto se realiza colocando la raíz en frascos de 25 ml que se sellan herméticamente y se inyecta acetileno. Después de 1 hr se determina el contenido de etileno por cromatografía de gases.

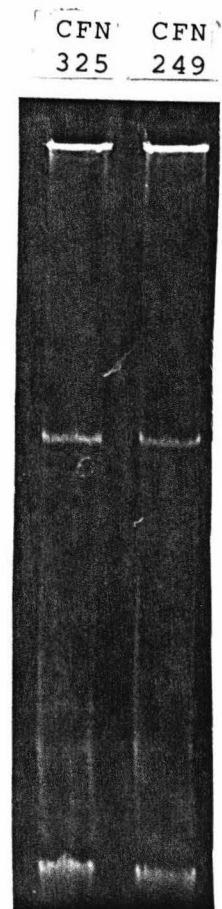
R E S U L T A D O S

Localización en el genoma de los factores genéticos responsables del cambio fenotípico Fix- a Fix+ en las cepas CFN 249 y CFN 325.

Las cepas de Rhizobium spp. y de crecimiento rápido CFN 249 (Fix+ en Dalea, Fix- en frijol) y CFN 325 (Fix+ en Dalea, Fix+ en frijol) provenientes de Dalea leporina, las cepas CFN 241 (Fix+ en Crotalaria pumila, Fix- en frijol) y CFN 326 (Fix+ en C. pumila, Fix+ en frijol), así como las cepas CFN 234 (Fix+ en Leucaena leucocephala, Fix- en frijol) y CFN 345 (Fix+ en L. leucocephala y Fix+ en frijol) presentan el cambio fenotípico Fix- a Fix+ en frijol. Como sabemos, Rhizobia de crecimiento rápido poseen un plásmido que contiene la información para funciones simbióticas (pSim). El problema biológico que abordo en este trabajo es sobre una función simbiótica (un cambio de fenotipo en fijación de nitrógeno), pensamos que el cambio genotípico que provoca este cambio en el fenotipo pudiese estar ligado a un plásmido. Una hipótesis que teníamos era que el cambio en fenotipo de fijación se podría correlacionar con la pérdida o ganancia de algún plásmido. Para saberlo, obtuve el perfil de plásmidos de estas cepas utilizando las técnicas de Eckhardt y de Hirsch (ver Materiales y Métodos). Los perfiles de plásmidos los muestro en la Fig. 2. Como ahí se muestra, no existe pérdida o ganancia de algún plásmido en ninguna de las cepas, lo que desecha la hipótesis anterior. La Fig. 2 muestra también que existe, aparentemente, solo un plásmido de alto peso molecular. Sin embargo, se deberán realizar más experimentos que demuestren que efectivamente se trata de un solo plásmido.



A



B

Fig. 2.- Perfil de plásmidos de las cepas CFN 249 y CFN 325 por el método de Eckhardt(A) y por el método de Hirsch (B).

Quisimos saber si el plásmido que observamos en el perfil de estas cepas era un plásmido simbiótico. El experimento que realicé para saberlo fué hibridar estos perfiles contra un detector interno del gene estructural de la nitrógenasa reductasa de la cepa de R. phaseoli CFN 42 (Quinto, et al., 1985). La fig. 3 muestra una hibridación positiva de este detector con el plásmido observado, lo que nos indica que al menos el gene estructural de la nitrógenasa reductasa se localiza en este plásmido.

De ser plasmídico el origen del cambio genotípico que provoca el cambio en fenotipo de fijación de nitrógeno, probablemente estaría ocurriendo en el megaplásmido que observamos. Para probarlo, decidí transferir el plásmido Sim (pDal4fr) de la cepa CFN 325 que es Fix+ a la cepa CFN 249 (Fix-). La estrategia que se siguió para transferirlo se muestra en la fig. 4. Bajo la suposición de que el cambio genotípico ocurría en este plásmido, entonces las cepas receptoras del plásmido deberían adquirir el fenotipo Fix+. Los resultados se muestran en la tabla 2. Las cuatro transjugantes probadas fueron Fix+, lo que indicaba que el cambio genotípico ocurría en este plásmido.

Frecuencia de conversión del fenotipo Fix- a Fix+.

Para cuantificar la frecuencia a la que ocurre el cambio fenotípico de Fix- a Fix+, diseñamos un experimento en el que utilizamos colonias aisladas de las cepas CFN 249 y CFN 243, ambas originarias de Dalea. Sabemos que una colonia se forma a partir de una sola bacteria, por lo que una colonia formada a partir de una bacteria de Rhizobium spp. originalmente con fenotipo Fix- dará nódulos que en su mayoría serán Fix-. Del mismo modo, una colonia Fix+ dará nódulos en su mayoría Fix+. Con este experimento nos daríamos una idea aproximada de la frecuencia a la que ocurre el cambio genotípico.

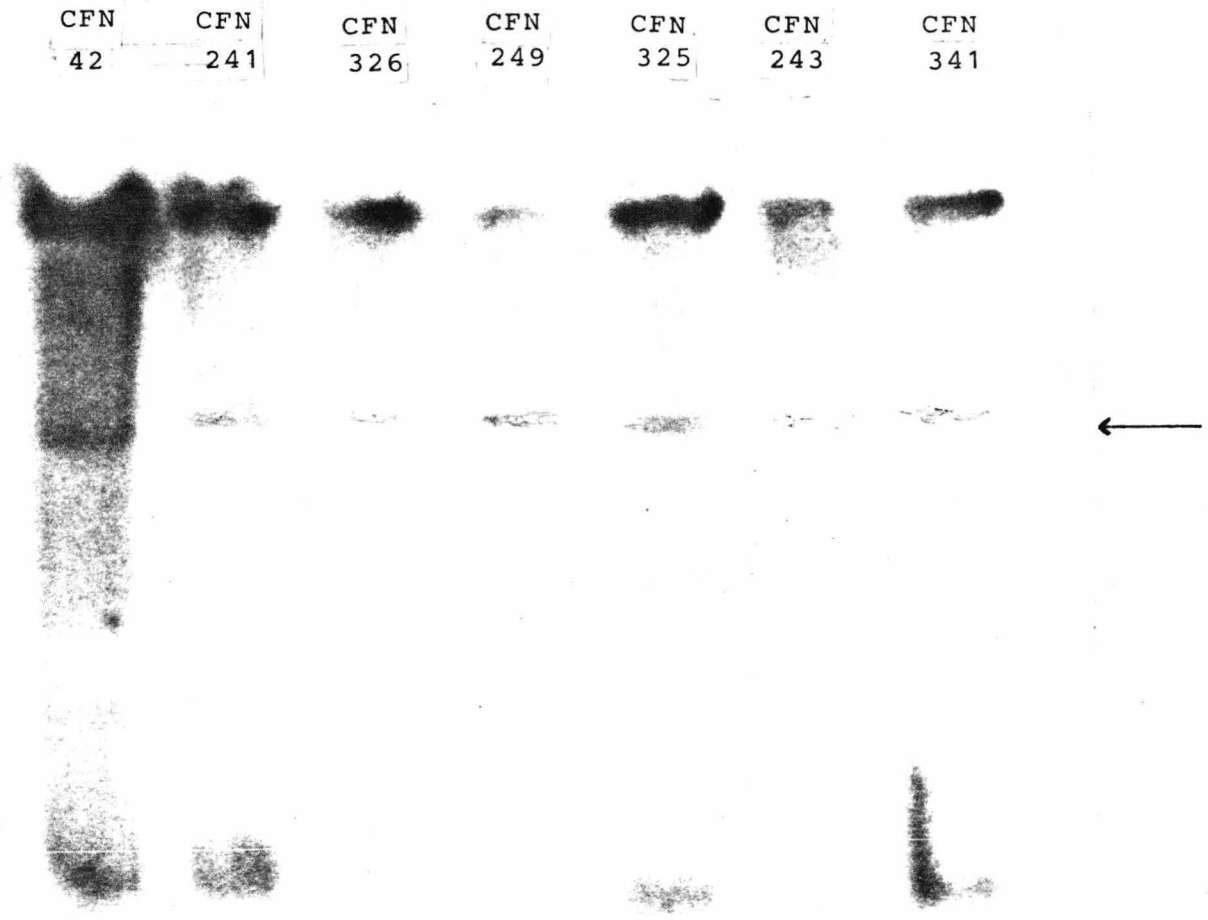


Fig. 3.- Autorradiografía que muestra el resultado de la hibridización de los perfiles de plásmidos de distintos *R. spp.* contra un fragmento interno de el gene H de la nitrogenasa de *R. phaseoli*.

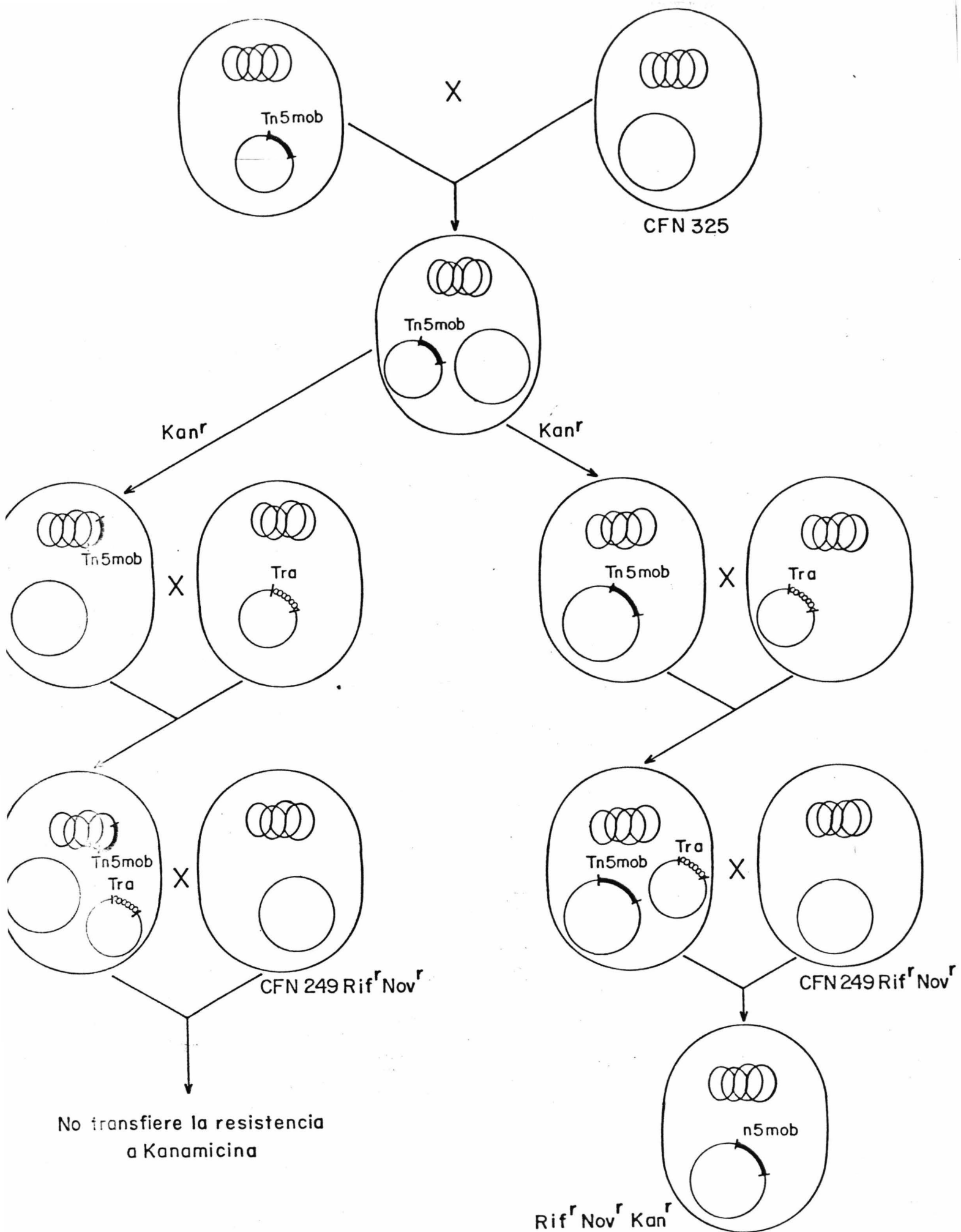


Fig. 4.- Esquema general de la estrategia utilizada para transferir

CEPA	PORCENTAJE DE FIJACION	FENOTIPO DE FIJACION
CFN 42	100	Fix+
<u>Transc.</u>		
P/S-2	87	Fix+
P/S-3	93	Fix+
P/S-4	111	Fix+
P/S-6	150	Fix+
CFN 249	30	Fix-

TABLA 2.- Fenotipo simbiótico en frijol de las transconjugantes CFN 249/pDal-4fr:Tn5mob.

Se utilizaron 25 colonias aisladas de cada cepa inoculando 2 plantas de frijol con cada colonia. A los 16 días se determinó la actividad de la nitrogenasa tomando como control a la cepa de R. phaseoli CFN 42 (100% de fijación) y los resultados los muestro en la tabla 3. Un 75% de las plantas continuaron como Fix-, un 15% aparecieron como Fix+ y un 10% intermedio (Fix+-). Estos resultados nos indican que probablemente en el 15% de las colonias ya se había efectuado el cambio genético que dió origen al fenotipo Fix+. Una probable explicación para los valores intermedios es que el cambio genotípico después de la primera replicación de la bacteria que dió origen a la colonia, dando dos poblaciones en la colonia que en su suma darían valores intermedios de fijación por planta.

Frecuencia de conversión del fenotipo Fix+ a Fix-.

Consideramos importante saber si el cambio fenotípico -- Fix- a Fix+ ocurre en el sentido opuesto, para así formarnos una idea del cambio genético que se efectúa en el plásmido. Nos interesa también conocer la frecuencia a la que ocurre la conversión a Fix-, ya que nos diría si existe un equilibrio y si está desplazado hacia un fenotipo de fijación en particular. El diseño del experimento es el mismo que el anterior. La cepa utilizada fué la CFN 325, que es una versión Fix+ de la CFN 249 obtenida de un nódulo fijador en frijol. Esta cepa fija nitrógeno con una eficiencia de 80-100% con respecto a la cepa control (CFN 42). En el experimento se probaron 50 colonias aisladas y los resultados se muestran en la tabla 4 : de las 50 colonias 32% continuaron como Fix+, 36% Fix+- y apareció un 32% de Fix- , que representa aproximadamente el doble de la frecuencia que ocurre en el sentido opuesto.

Cambios estructurales en los plásmidos Sim de las cepas CFN 249 y CFN 325.

La frecuencia a la que ocurre la conversión fenotípica

Número de colonia*	Porcentaje de Fijación	Fenotipo de Fijación	Número de colonia°	Porcentaje de Fijación	Fenotipo de Fijación
1	3	-	26	25	-
2	8	-	27	6	-
3	0	-	28	70	+ -
4	0	-	29	80	+
5	8	-	30	30	-
6	10	-	31	80	+
7	25	-	32	80	+
8	3	-	33	6	-
9	10	-	34	15	-
10	30	-	35	35	-
11	30	-	36	90	+
12	2	-	37	60	+ -
13	35	-	38	25	-
14	6	-	39	5	-
15	8	-	40	25	-
16	70	+ -	41	25	-
17	25	-	43	70	+ -
18	23	-	44	50	+ -
19	100	+	45	80	+
20	0	-	46	30	-
21	25	-	47	12	-
22	60	+ -	48	10	-
23	95	+	49	20	-
24	98	+			

(*).- Las colonias 1 al 24 provienen de la cepa CFN 249.

(°).- Las colonias 26 al 49 provienen de la cepa CFN 243.

TABLA 3.- Frecuencia de conversión fenotípica a Fix+ en frijol a partir de R. app. Fix-. Se consideró como valor intermedio a los porcentajes de fijación comprendidos entre 40-70%. Se consideró como control de 100% de fijación a la cepa CFN 42.

<u>Número de colonia</u>	<u>Porcentaje de Fijación</u>	<u>Fenotipo de Fijación</u>
2	30	-
3	90	+
4	40	+ -
5	85	+
6	15	-
7	20	-
8	100	+
9	100	+
10	100	+
11	85	+
12	0	-
13	75	+
14	45	+ -
15	65	+ -
16	5	-
17	0	-
18	55	+ -
19	100	+
20	25	-
22	10	-
23	5	-
24	8	-
25	10	-
27	50	+ -
28	50	+ -
29	8	-
30	65	+ -
31	10	-
32	5	-
33	100	+
34	55	+ -
35	8	-
36	0	-
37	50	+ -
38	100	+
39	75	+
40	60	+ -
41	25	-
42	85	+
43	80	+
44	60	+ -
45	70	+ -
46	100	+
47	50	+ -
48	100	+
49	100	+
50	65	+ -

TABLA 4.- Frecuencia de conversión fenotípica a Fix- en frijol de la cepa CFN 325. Los valores porcentuales comprendidos entre 40 -70% son considerados valores intermedios de fijación. La cepa control es la CFN 42 (100% de fijación).

de fijación nos permitió contemplar la posibilidad de visualizar alguna diferencia estructural en los plásmidos Sim de estos Rhizobia, pues se ha visto que en otros organismos en los que se presentan variaciones fenotípicas a alta frecuencia, estas variaciones están mediadas por rearrreglos génicos (ver Discusión). El encontrar rearrreglos en el genoma de estas bacterias sentaría bases para pensar que el cambio en el fenotipo de fijación está mediado por rearrreglos genómicos.

Tomando ventaja de un banco de cósmidos de la CFN 325 construído por Guadalupe Espín (un cósmido es un plásmido que contiene la región cos del fago Lambda que permite la clonación de fragmentos de aproximadamente 40 Kb de DNA), hibridé este banco contra el plásmido pDal4 por el método de hibridación en colonia (ver Martínez, 1985). De esta manera seleccioné los cósmidos que contuvieran DNA del pSim. Luego de purificar los cósmidos, seleccioné algunos de ellos y -- los hibridé contra genoma total de las cepas CFN 249 y CFN 325. Con el número de cósmidos utilizados se habrá cubierto una porción grande del pDal4 (que es de aproximadamente -- 300 Kb) y de esta manera se aumentarían las posibilidades de localizar algún reaarreglo en el plásmido, ya que por este método se logra una nitidez mayor en las bandas de hibridación. El experimento se llevó a cabo utilizando 10 cósmidos escogidos al azar marcados radiactivamente con 32(P) e hibridados contra genoma total de las cepas CFN 249 y CFN-325 digeridos con las enzimas de restricción BamH1 y Hind111. Escogí estas endonucleasas debido a que en general, los --- plásmidos poseen un número limitado de sitios de corte por enzimas que reconocen seis pares de bases, lo que hace posible la comparación de los fragmentos del plásmido en perfiles electroforéticos. El resultado de la hibridación lo muestro en la fig. 5. La hibridación con algunos cósmidos (5-9,

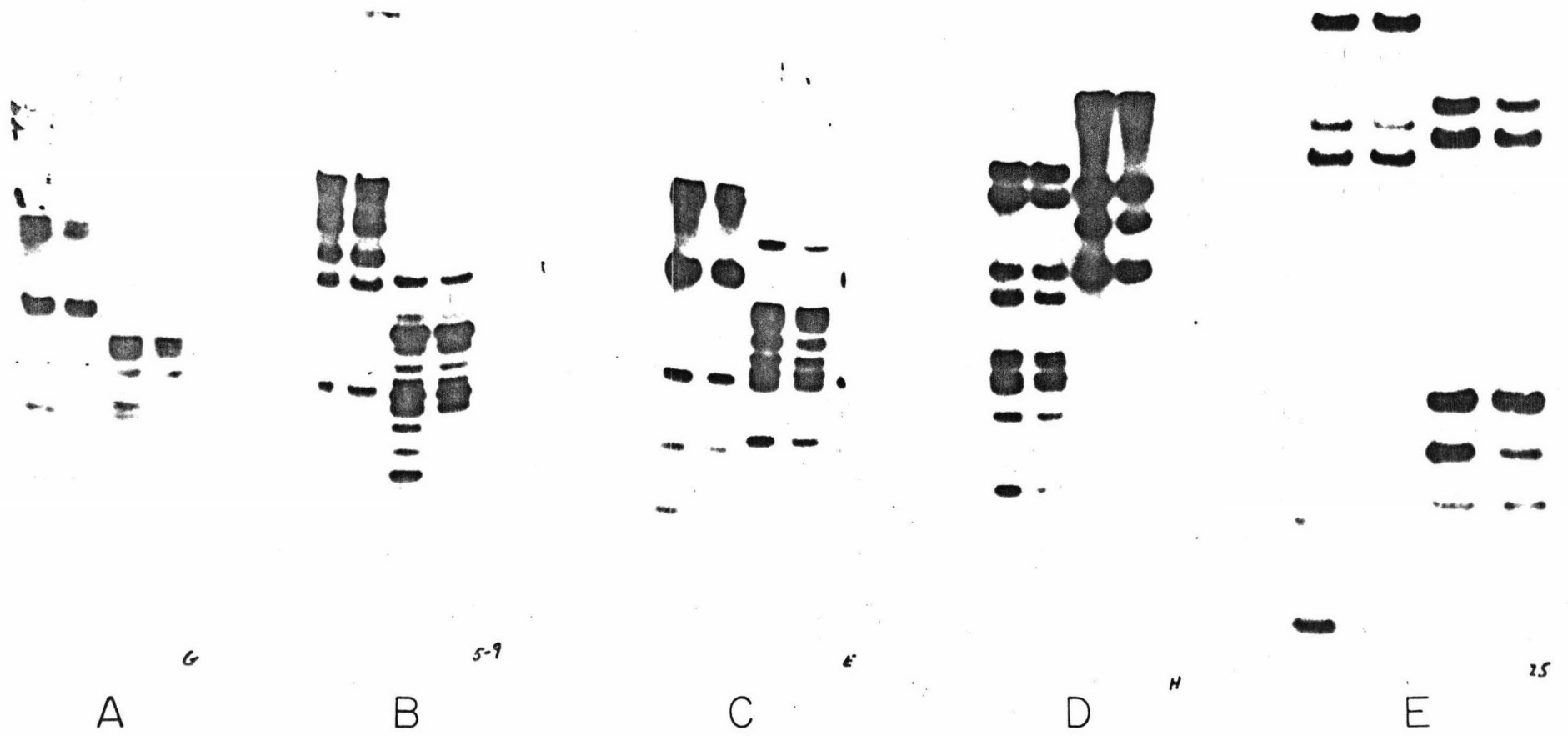


Fig. 5 = Autorradiografía que muestra la hibridación de genoma total de las cepas CFN 249 y CFN 325 contra los detectores : A) Cósmido 30 ; B) Cósmidos 5 y 9 ; C) Cósmido 18 ; D) Cósmido 27 ; E) Clona 25

por ejemplo) presentan algunas diferencias en intensidad de ciertas bandas. Ninguna de estas diferencias nos pareció -- realmente significativa, es decir, que mostraran claramente que hubo rearrreglos genómicos. Este resultado se unía a una serie de experimentos que realicé anteriormente en los que probé hibridaciones del pDal4 contra genoma total de las cepas CFN 249 y CFN325 e hibridaciones de las mismas cepas -- contra un fragmento del pDal4 (clona 25) de 18.5 Kb. Los resultados que arrojaron estos experimentos fueron de que, o no se observaba ninguna diferencia o sólo se presentaban diferencias en intensidad no muy significativas.

Pensamos entonces que una probable razón por la cual no -- habíamos podido detectar rearrreglos génicos en estos experimentos era debido a que los cambios sucedían a muy alta frecuencia en la población y como consecuencia habría un ocultamiento de dichos cambios estructurales sin descartar, por supuesto, el que no los hubiese. Decidimos utilizar entonces colonias aisladas. Como mi objetivo era demostrar que -- existían rearrreglos génicos en estas cepas en donde una de sus probables consecuencias fuese el efecto en la eficiencia de fijación de nitrógeno, entonces podría utilizar cualquiera de las cepas , CFN 249 o CFN 325, pues ambas presentan cambios fenotípicos de fijación. Utilicé 20 colonias -- aisladas de la CFN 249 y los genomas de estas colonias fueron digeridos con HindIII, colocando cantidades semejantes de DNA en cada carril del gel. Estas digestiones se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron contra -- cuatro cósmidos del pDal4, contra una clona del pDal4 clonada en un vehículo distinto (clona 25) y contra una clona de la cepa CFN 42 (clona 20) que tiene la particularidad de sufrir rearrreglos en cepas de R. phaseoli reiterados (datos del laboratorio). Las autorradiografías las presento en la fig. 6. La clona 20 está definitivamente reiterada,

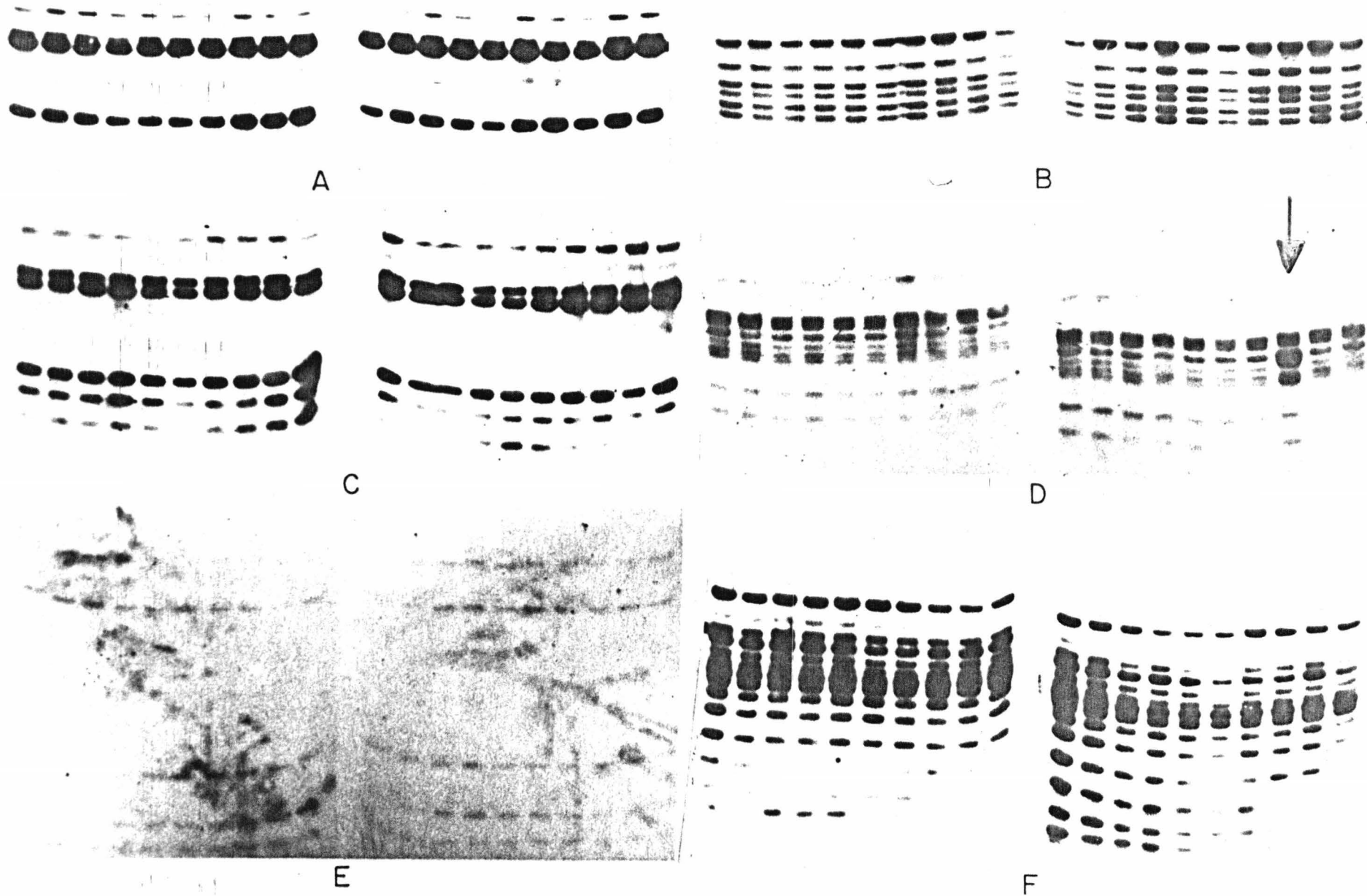


Fig. 6: Autorradiografía que muestra la hibridización de genoma total de 20 colonias aisladas de la cepa CFN 249 contra los detectores :
 A) Cósmido 9, B) Cósmido 16, C) Clona 25, D) Cósmido 30, E) Clona 20, F) Cósmido 5.

pero no muestra algún rearrreglo. Tres detectores (cósmidos 5 y 16, clona 25) muestran nuevamente claras diferencias en intensidad de ciertas bandas, tal como se había observado en experimentos anteriores. Sin embargo, el cósmido 30 - en el carril 18 nos muestra que en esta colonia hubo una alteración estructural drástica, pues se observa tanto desaparición de bandas de hibridación comunes a las demás colo---nias como aparición de otras. Con este experimento demues--tro que existen rearrreglos genómicos en la cepa CFN 249.

D I S C U S I O N

En este trabajo he presentado evidencias que existen rearranglos genómicos en Rhizobium spp. Estas evidencias sugieren que el cambio en el fenotipo de fijación que sufren estas Rhizobium con frijol podría estar ligado a rearranglos genómicos.

Aunque nos centramos básicamente en dos cepas, CFN 249 y CFN 325 que infectan Dalea, el fenómeno de conversión fenotípica en fijación de nitrógeno en frijol comprende a otros Rhizobium spp., como son aquellos que infectan a Crotalaria pumila y los que infectan a Leucaena leucocephala.

Aunque la nodulación que inducen estos Rhizobium en frijol es menos eficiente que un R. phaseoli típico (reiterado de nifH), en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez, V. Conde ha demostrado que la cepa CFN 325 es casi tan eficiente para fijar nitrógeno en frijol como un R. phaseoli (medido por actividad específica). En experimentos de inmunodetección con anticuerpos antinitrogenasa reductasa, V. Conde encontró además que en la cepa CFN 249 existe menos nitrogenasa reductasa que en la cepa CFN 325. Nosotros no observamos ningún cambio estructural del gene nifH una vez inducido el cambio en fenotipo de fijación (fig. 7). Sin embargo, hasta el momento desconocemos cuál nivel de la simbiosis se afecta ni qué provoca los cambios en la fijación de nitrógeno. Es importante recordar que estos Rhizobium en sus dos versiones de fijación de nitrógeno en frijol son igualmente eficientes para fijar nitrógeno en sus leguminosas originales y aún en Leucaena, como es el caso de las cepas CFN 249 y CFN 325 (datos de E. Martínez). Ello indica que en frijol la información necesaria para lograr una fijación de nitrógeno eficiente es distinta a la requerida para otras le-

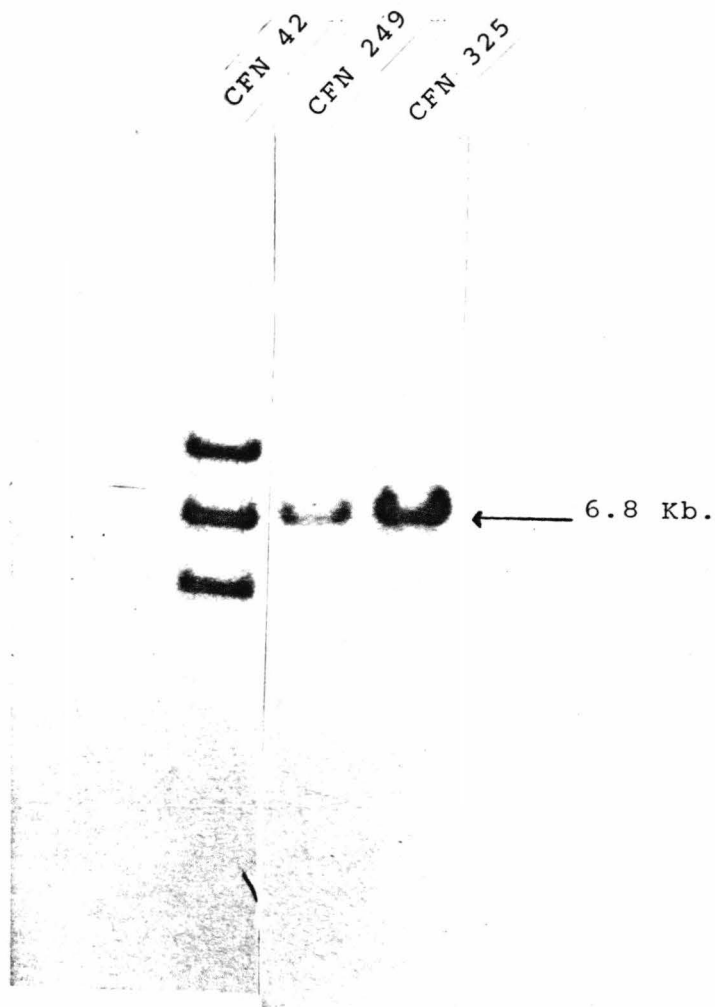


Fig. 13 - Autorradiografía que muestra la hibridización de genomas de las cepas CFN 249 y CFN 325 digeridos con Bam HI e hibridizados contra un fragmento interno de la nitrogenasa (Sal c) de R. phaseoli (Quinto, 1985).

guminosas, pero que sin embargo estos Rhizobium spp. poseen esta información genética que logran expresar a través de -- rearreglos génicos que se producen a alta frecuencia. Algo que creemos probable, es que estos rearreglos genómicos permiten a la bacteria expresar genes de simbiosis que les posibilita infectar un número mayor de leguminosas con las -- que convive en su ecosistema.

Es interesante el hecho de que la conversión de Fix+ a -- Fix- sea el doble que la conversión inversa. Esto nos habla de una tendencia de estos Rhizobia por un cierto camino de especialización en simbiosis hacia algunas leguminosas, en grado tal que en un momento dado la especificidad de simbiosis de estos Rhizobia por determinadas especies de leguminosas sería tan estrecha como son los R. phaseoli reiterados por Phaseolus (Martínez, et al., 1985).

Ya que los cambios génicos que provocan el cambio en fenotipo de fijación ocurren a muy alta frecuencia, se desecha la posibilidad de que estos cambios se generen por mutación puntual, que es de 10,000 a 100,000 veces menor. Por la reversibilidad del fenómeno se desecha también una delección.

Existen otros sistemas en los que se induce una expresión fenotípica mediada por rearreglos génicos que ocurren a alta frecuencia. Tal es el caso de Neisseria gonorrhoeae, en donde la expresión de un gene que codifica para una proteína del pili está sujeta a un rearreglo cromosomal (Meyer, 1982) . En Salmonella typhimurium, la expresión del gene - H2, que codifica para una de las proteínas del flagelo, depende de la orientación en que se encuentre un fragmento de 900 pares de bases donde se encuentra el promotor para el - gene H2 (Zieg y Simon, 1982). También en Salmonella, se ha - demostrado que ciertas inserciones de un transposón (Tn10)- en el extremo 5' del operón his promueve la transcripción - de éste (Ciampi, 1982). En Escherichia coli, se ha encontrado una activación del operón bgl (considerado críptico) de-

bido a inserciones de secuencias de inserción (IS) en este operón (Reynolds, et al, 1981). En el bacteriofago Mu, la región G es un fragmento de DNA invertible que determina la especificidad de infección de este fago por determinada bacteria (Van de Putte, 1980). En Trypanosoma brucei, la variabilidad antigénica que le permite a este parásito evadir la respuesta inmune está dada por rearrreglos génicos (Vickerman, 1978); Hoeijmakers, 1980). En R. trifolii, Djordjevic, et al. (1982) encontraron que las transconjugantes que habían recibido un plásmido Sim de R. leguminosarum y que eran capaces de nodular y fijar nitrógeno en chícharo y en trébol, mostraban una inestabilidad de alta frecuencia en el fenotipo simbiótico. En ocasiones, estos cambios fenotípicos correlacionaban con alteraciones estructurales en los plásmidos, pero otros no mostraron alteraciones aparentes. Cabe mencionar que los cambios en fenotipo simbiótico se dieron en trébol y en chícharo, y algunos eran reversibles. Aún más, los rearrreglos en R. phaseoli no se circunscriben a las cepas estudiadas en este trabajo, ya que G. Soberón ha encontrado en una cepa de R. phaseoli típico (CFN 23) una serie de rearrreglos génicos que involucran a genes nif y que ocurren a alta frecuencia. En el laboratorio del Dr. Rafael Palacios, en experimentos realizados por Margarita Flores, se ha demostrado que algunos fragmentos del plásmido Sim de la cepa CFN 42 (incluyendo la clona 20 mencionada anteriormente) también sufren rearrreglos a alta frecuencia en cepas de R. phaseoli típicos (datos no reportados). En este aspecto, sería interesante definir la generalidad de estos rearrreglos a lo largo del género Rhizobium, que nos hablaría más sobre la plasticidad de su genoma y de los mecanismos moleculares de que se valen estas bacterias para llevar a cabo funciones tales como la simbiosis.

En el presente trabajo he demostrado que los cambios genéticos que ocurren en las cepas CFN 249 y CFN 325 que pro-

vocan un cambio fenotípico en fijación, suceden en un plásmido de alto peso molecular, al que identificamos como plásmido simbiótico por hibridación con el gene estructural de la nitrogenasa reductasa de R. phaseoli. Sabiendo que los rearrreglos ocurren en este megaplásmido y a alta frecuencia, me permitió identificar cambios estructurales en el genoma de estas cepas.

Algo que deberá conocerse es si los cambios estructurales que hemos observado o que observemos posteriormente, correlacionan con el cambio en fenotipo de fijación que ocurren en estos Rhizobium spp., pues actualmente no tenemos evidencia que correlacione un cambio estructural con un cambio en fenotipo de fijación de nitrógeno. Para ello será necesario contar con otras cepas Fix+ generadas independientemente, así como sus revertantes, y analizar en ellas los cambios estructurales que ocurran en sus plásmidos, correlacionando éstos con el fenotipo de fijación de la cepa.

Los experimentos de este trabajo fueron hechos básicamente con dos cepas, CFN 249 y CFN 325. Sin embargo, recordemos que otros Rhizobia presentan el mismo cambio en fenotipo de fijación con frijol. Es interesante poder determinar si es o no el mismo factor génico el que induce el cambio de fijación en estas cepas de Rhizobium spp., lo que nos hablaría de la generalidad del mecanismo del que se valen estos Rhizobia para lograr una fijación de nitrógeno eficiente. Esto es importante además, porque creemos que estas secuencias génicas están involucradas en la especificidad de fijación de nitrógeno en frijol. Creemos trascendente saber si estas secuencias génicas se encuentran en los R. phaseoli reiterados, que son Rhizobium específicos para infectar frijol. Si es así, esto nos hablaría de una estrategia común utilizada por estos Rhizobia para establecer una simbiosis efectiva y eficiente con Phaseolus. Si estas secuencias no las comparte R. phaseoli típico, entonces estaríamos en

condiciones de pensar que ha ocurrido una evolución convergente en cuanto a su especificidad de fijación de nitrógeno en Phaseolus.

También creo interesante saber si estas secuencias génicas se encuentran representadas en todos aquellos Rhizobia capaces de establecer una simbiosis efectiva con frijol o con parientes cercanos al frijol. Esto nos ampliaría el panorama sobre la generalidad de una estrategia utilizada por algunos Rhizobia para lograr una simbiosis efectiva con leguminosas del género Phaseolus.

Algo que nos gustaría explorar es el posible efecto simbiótico que tendrían estas secuencias génicas sobre un fondo genético distinto, específicamente sobre un R. phaseoli reiterado. Buscaríamos si los niveles de fijación o de nodulación se alteran. Esta pregunta no es trivial ya que, en un experimento que no incluí en este trabajo, transferí el pSim de la cepa de R. phaseoli CFN 42 a una cepa de Rhizobium spp., Dal5 (originaria de Dalea), en donde las transconjugantes fijaron nitrógeno en frijol un 240% con respecto a la cepa control (CFN 42). Este resultado sugiere que existen factores génicos en estos plásmidos que afectan los niveles de fijación de nitrógeno y que funcionan distinto (o no funcionan) dependiendo del fondo genético en que se encuentren.

R E F E R E N C I A S

- Appleyby, C.A. (1974). Leghemoglobin en "The Biology of Nitrogen Fixation". pág. 521. North Holland. Quispel Ed.
- Bal, A.K. y Wong, P.P. (1982) Can. J. Microb. 28:890.
- Boyer, H.B., Roulland-Dossoix, D. (1969). J. Mol. Biol. 41:459.
- Buchanan-Wallason, A.V., Beringer, J.E., Brewin, N.J., Hirsch, P.R. y Johnston, A.W.B. (1980). Mol. Gen. Genet. 178:185.
- Ciampi, M.S., Schmid, M.B. y Roth, J.R. (1982) P.N.A.S. USA 79:5046.
- Corbin, D., Bran, L. y Ditta, G. (1983) P.N.A.S. USA 80:3005.
- Dazzo, F.B. (1979) en "Adsorption of Microorganisms to Surfaces" p. 253, N.Y.
- Djordjevic, M.A., Hombrecher, G., Ma, Q.S., Knight, C.D., Wells, B y Johnston, A.W.B. (1982) J. Bact. 151, No. 2:560.
- Downie, J.A., Hombrecher, G., Ma, Q.S., Knight, C.D., Wells, B., y Johnston, A.W.B. (1983). Mol. Gen. Gen. 190:359.
- Eckhardt, T. (1978) Plasmid 1:584.
- Elkan, G.H. (1984) Biological Nitrogen Fixation. Alexander, M. (ed).
- Fred, E.B., Baldwin, I.L. y McCoy, E. (1932) Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. (Univer. of Wisconsin, Madison).
- Guiney, D.G. y Helinski, D.R. (1979). J. Bact. 117:619.
- Haugland, R. y Verma, D.P.S. (1981) J. Mol. App. Gen. 1:205.
- Hirsch, P.R., van Montagu, M., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J. y Schell, J. (1980). J. Gen. Microbiol. 120:403.
- Hoeijmakers, J.H.J., Frash, A.C.C., Bernardis, A., Borst, P. y Cross, G.A. (1980) Nature vol. 284:78.
- Hollos, A.B., Kloos, W.E. y Elkan, G.H. (1981) A. Gen. Microb. 123:215.
- Hooykaas, P.J.J., van Brussel, A.A.N., den Dalk-Ras, H., van Slog Teren, G.M.S. y Schilperoort, R.S. (1981). Nature vol 291:351.
- Jordan, D.C., Allen, O.N. (1974) Family III. Rhizobiaceae conn. (1983) Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Ed. Berguey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Baltimore 261.
- Kaluza, K., Fuhrmann, M., Hahn, M., Regensburger, B. y Hennecke, H. (1983) J. Bact. 155:915.
- Kaluza, K. y Hennecke, H. (1984) Mol. Gen. Genet. 196:35.
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. (1984) Mol. Gen. Gen. 193: 445.
- Lamb, J.W., Hombrecher, G., Johnston, A.W.B. (1982) Mol. Gen. Gen. 186:449.
- Long, S.R., Buikema, W.J. y Ausubel, F.M. (1982) Nature 291:485.
- Martínez, E. (1983). Tesis para obtener el grado de Maestría en Inv. Biom. Bás. UACPyP del C.C.H., UNAM, México.

- Martínez, E. (1985). Tesis para obtener el grado de Doctor en Inv. Biom. Bás. UACPyP del C.C.H., UNAM, México.
- Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. y Cevallos, M.A. (1985) J. Gen. Microbiol. (en prensa).
- Meyer, T.M., Mlawer, N., So, M. (1982) Cell 30:45.
- Morett, E., Moreno, S. y Espín, G. (1985). M.G.G., en prensa.
- Noel, K.D., Sánchez A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A. (1984) J. Bact. 158:148.
- Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Prakash, R.K., Schilperoort, R.A., Cannol, F.C. (1979). Nature 282 : 533.
- Palacios, R., Quinto, C., De la Vega, H.M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T. y Soberón, G. (1983) Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. Puhler, A. (Ed). Springer-Verlog, Berlin, Heidelberg 164.
- Prakash, R.K., Atherley, A.G. (1984). J. Bact. 160:785.
- Qing-Sheng Ma, Johnston, A.W.B., Hombrecher, G. y Downie, J.A. (1982) Mol. Gen. Gen. 187:166.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G. y Palacios, R. (1982). Nature 299:724.
- 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). P.N.A.S. (en prensa).
- Reynolds, A.E., Felton, J. y Wright, A. (1985). Nature 293:625.
- Roberts, G.P., Brill, W.J. (1981). Ann. Rev. Microb. 35:207.
- Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Hodes, C., Berg, P. (1977). J. Mol. Biol. 113:237.
- Ruvkun, G.B., Sundaresan, V. y Ausubel, F.M. (1982). Cell 8:551.
- Schetgens, J.M.P., Bakkeren, G. van Dun, C., Hontelez, J.G.J., van des Bos, R.C. y van Kammen, A. (1984) J. Mol. App. Genet. 2:406.
- Scott, D.B. y Ronson, C.W. (1982) J. Bact. , Julio ; p. 36.
- Scott, K.F., Rolfe, G.B. y Shine, J. (1983). DNA 2;141.
- Simon, R., Proefer, V., Puhler, A. (1983). Biotech. 1:784.
- Soberón, G. (1983). Tesis para obtener el grado de Maestría en Inv. Biom. Bás. UACPyP del C.C.H., UNAM, México.
- Southern, E.M. (1975). J. Mol. Biol. 98:503.
- Torok, I., Kondorosi, E., Stepkowski, T., Posfai, J. y Kondorosi, A. (1984). Nuc. Ac. Res. 12, No. 24.
- Vickerman, K. (1978). Nature 273:613.
- Vincent, J.M. (1974). The Biology of Nitrogen Fization. A. Quispel (Ed) North Holland Publishing Co., Amsterdam, Oxford.
- Wacek, T., Brill, W.J. (1976), Crop Sc. 16: 519.
- Zieg, J., Simon, M. (1980) P.N.A.S. vol. 77, No. 7;4196.
- Zurkowski, W. (1982) J. Bact. 150(3):999.