

CFN-2
TL
1985



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

CFN2
TL
1985

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

Construcción de Mutaciones en las Regiones nif
de Rhizobium phaseoli.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO



C. N. R. M.
BIBLIOTECA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

Lorenzo Patrick Segovia Forcella

1985

73366
C



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 Beatriz ...

A todos

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer profundamente a todos mis tutores por haber hecho de mí lo que soy. Estos son por orden de aparición: Memo Dávila, Fernando Bastarrachea y last but not least Jaime Mora. Sin olvidar a las Dras. Lupe Espín y Carmen Gómez. Quisiera muy en particular agradecer al Dr Rafael Palacios, quien fué maestro mío desde el primer año de la carrera, por toda la confianza que me ha mostrado y por su continuo interés en mi formación.

Al Dr. Jan Leemans, por todo lo que aprendí y lo mucho que me divertí.

Además, quisiera agradecer al Oso (David Romero) y a Susi Brom por su amistad continua y su compañía en clase.

A todos los inconscientes que fueron mis estudiantes porque fueron mis maestros.

A las mujeres con las que he compartido mi vida y mis sueños.

También mis compañeros Enrique, Marco y Mario por haberme aguantado durante 5 años, se merecen una mención especial.

A mi primera familia: los Segovia.

A mi segunda familia: los Dingler.

A mi tercera familia: Ustedes.

Ahí se ven.....

INTRODUCCION

Todos los organismos vivos requieren asimilar del medio ambiente compuestos nitrogenados para sintetizar sus componentes esenciales. En la naturaleza, el nitrógeno se encuentra principalmente en estado gaseoso, constituyendo el 80% de la atmosfera terrestre; solo un numero limitado de microorganismos son capaces de disponer del nitrógeno molecular y de reducirlo a amonio, un componente esencial del ciclo del nitrógeno. Este proceso, denominado fijación de nitrógeno, solo puede ser llevado a cabo por organismos procariotes, tanto aerobios como anaerobios o facultativos, algunas cianobacterias y todas las bacterias fotosinteticas (Scott et al, 1981). Su participación es de suma importancia en la biosfera ya que son las responsables de la constante canalización del nitrógeno a compuestos orgánicos nitrogenados.

La fijación biológica del nitrógeno es llevada a cabo por la nitrogenasa, un complejo enzimático que tiene dos componentes; el componente I esta formado por dos pares de polipéptidos distintos y requiere de molibdeno y hierro para su actividad, y el componente II, la nitrogenasa reductasa, que es un dimeró con un solo tipo de polipeptido y requiere de hierro para su actividad. En el mecanismo de reacción, el componente II es reducido y reacciona con ATP, reduce al componente I el cual a su vez reduce el nitrógeno atmosférico a amonio (Mortenson y Thorneley, 1979).

Las bacterias del genero, Rhizobium fijan nitrógeno en simbiosis con las raices de ciertas leguminosas en estructuras altamente diferenciadas llamadas nódulos. Esta interacción, que requiere de un reconocimiento entre la bacteria y la planta, empieza por la penetración de la bacteria por los pelos radiculares hasta la corteza de la raiz, donde pasa a través de la pared celular y queda englobada en vesículas membranosas dentro del citoplasma (Beringer et al, 1979). Este paso es seguido por una marcada proliferación de las células de la

corteza radicular y por un proceso de diferenciación de ambos simbioses; el *Rhizobium* generalmente sufre cambios morfológicos, se hace más grande y de forma irregular, a este tipo celular se le conoce como bacteroide y es el estado en el que se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. En la simbiosis, los bacteroides exportan al citoplasma vegetal el amonio producido en la reducción del nitrógeno molecular; este compuesto es asimilado exclusivamente por la planta, ya que las enzimas necesarias para la asimilación de amonio están reprimidas en el bacteroide (Robertson et al, 1975). Asimismo el bacteroide utiliza el fotosintato transportado de las hojas hacia la raíz como fuente de carbono para obtener la energía indispensable para la fijación de nitrógeno.

ORGANIZACION DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA NITROGENASA.

Los genes estructurales de la nitrogenasa fueron inicialmente caracterizados en *Klebsiella pneumoniae*, en este organismo el gene que codifica para la nitrogenasa reductasa, *nifH*, y los genes que codifican para los polipeptidos de la nitrogenasa, *nifD* y *nifK*, forman una unidad única de transcripción (Mac Neil et al, 1978; Merrick et al, 1978; Elmerich et al, 1978). Los genes que codifican para la nitrogenasa están muy conservados a través de la evolución por lo que hibridizan con secuencias análogas en una gran variedad de organismos fijadores de nitrógeno (Ruvkun y Ausubel, 1980).

En los rhizobia de crecimiento rápido, *R.meliloti*, *R.leguminosarum* y *R.trifolii*, el estudio de los genes estructurales de la nitrogenasa ha revelado que se encuentran localizados en plásmidos y que al igual que los genes *nifH*, *D* y *K* de *K.pneumoniae* están organizados en una sola unidad de transcripción (Ruvkun et al, 1982; Corbin et al, 1982; Ma et al, 1982; Scott et al, 1982 y 1983b).

En los rhizobia de crecimiento lento, *R.japonicum*, *R.cowpea* y en *Parasponia Rhizobium*, este último un caso de simbiosis

entre un Rhizobium y una no-leguminosa, se encontró que el gene nifH esta separado de los genes nifD y nifK por un tramo de DNA de 15 a 20 Kb, formando asi dos unidades distintas de transcripción y que además estos genes estan localizados en el cromosoma (Szalay et al, 1984; Scott et al, 1983a).

En Rhizobium phaseoli, que fija nitrógeno en simbiosis con Phaseolus vulgaris, se encontró que el gene nifH esta reiterado tres veces. La secuencia nucleotidica de cada reiteración mostró que los genes son identicos. El análisis por microscopia electrónica de heteroduplex de fagos recombinantes que llevan cada una de las reiteraciones mostró que existe una homología de 5 Kb entre las regiones llamadas a y b y de 1.3 Kb entre la región llamada c y las regiones a y b (Quinto et al, 1985) (ver Fig.1).

El hecho que la secuencia de los genes nifH sea identica hizo pensar que la identidad se debia a una muy fuerte presión de selección para la conservación de esta secuencia en particular. Para explorar esta posibilidad y estudiar la función de las reiteraciones de los genes nif se construyeron mutaciones por insercion de un gene que confiere resistencia a Kanamicina dentro del gene nifH. Las mutantes obtenidas en cada gene nifH tienen todas un fenotipo Fix+, indistinguible de la cepa silvestre, por lo que se deduce que ningun gene nifH es indispensable para la fijacion de nitrógeno (Quinto et al, 1985) (ver Fig.3, cepas CFN42, CFN2201, CFN2202, CFN2203).

Las hibridizaciones de tipo Southern de plasmidos recombinantes que llevan cada una de las reiteraciones con detectores heterólogos de Parasponia Rhizobium específicos para nifD y nifK, mostraron que existen secuencias homologas a estos genes en el extremo 3' de los genes nifH de las regiones a y b pero no en la región c. (Comunicación personal de C.Quinto) (ver Fig.1).

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA

NITROGENASA.

La regulación de la fijación de nitrógeno ha sido principalmente estudiada en Klebsiella pneumoniae (Mac Neil et al, 1981, Dixon 1984). En este sistema, la expresión de los genes nif esta sujeta a un doble sistema de regulación: la transcripción de los genes nif esta regulada por los productos del operon nifLA, cuya transcripción, a su vez esta regulada por los productos de los genes ntrA(glnF) y ntrB(glnG) que responden a la disponibilidad de nitrógeno en el medio. La transcripción del operón nifLA solo ocurre en condiciones de limitación de compuestos nitrogenados (Dixon et al, 1984). El producto del gene nifA, junto con el producto del gene ntrA, funciona como activador de todos los operones nif excepto el suyo; por otra parte, el producto del gene nifL antagoniza la acción del producto de nifA en respuesta a cambios en la tensión de oxígeno o bien en las pozas intracelulares de compuestos nitrogenados (Buchanan-Wollaston , 1984; Merrick et al , 1982). La expresión del operón nifLA esta regulada por un sistema generalizado de regulación que controla la expresión de operones involucrados en la utilización de fuentes alternas de nitrógeno como aminoácidos, nitratos, etc, llamado sistema Ntr (Magasanik, 1982).

En las bacterias del genero Rhizobium, la regulación de la expresión de los genes nif ha sido muy poco estudiada.

En la región del promotor/del operon nifHD y K de R.meliloti se encontró una secuencia heptamérica consenso muy cerca del inicio de transcripción, la cual ha sido involucrada en la regulación de la expresión mediada por nifA en todos los operones nif de K.pneumoniae (Beynon et al , 1983). El gene nifH de R.meliloti puede ser activado por el producto del gene nifA de K.pneumoniae cuando este es expresado a partir de un promotor constitutivo en un plásmido multicopia (Sundaresan et al, 1983). Estos datos sugieren la participación en la expresión de nifH de R.meliloti de un gene análogo a nifA.

Asimismo en R.meliloti y en R.leguminosarum se han aislado mutantes Fix- las cuales mapean en un gene homólogo a nifA de K.pneumoniae. No se ha podido detectar la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa en nódulos formados por infección con estas cepas. Estas mutantes son conocidas bajo el nombre de "nifA-like" por su parecido fenotípico con mutantes nifA- en K.pneumoniae (Zimmerman et al, 1983; Szeto et al, 1984; Downie et al, 1983).

En R.phaseoli se aislaron mutantes que afectaban tanto la asimilación de amonio como la fijación de nitrógeno por lo que se concluye que existe un gene que es común para sus regulaciones (Morett et al, en prensa, 1985).

ORGANIZACION TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES DE LA NITROGENASA EN R.phaseoli.

Los datos obtenidos hasta el momento indican que en R.phaseoli existen tres copias del gene nifH y dos copias de los genes nifD y nifK. Estos genes están arreglados de la manera siguiente: existen una copia de nifH, nifD y nifK en cada una de las regiones a y b; en la región c existe una copia sola de nifH (ver Fig.1).

El análisis de la secuencia en los extremos 5' de los genes nifH mostró que la identidad se mantiene por 200 bases hacia arriba del codón de iniciación. También se encontró dentro de este tramo a la secuencia consenso heptamérica de promotores activados por nifA en K.pneumoniae (Beynon et al, 1982; Ow et al, 1983). A menos de encontrarse elementos reguladores en el extremo 5' fuera de la región de homología, estos genes no se expresarían diferencialmente y estarían regulados de la misma manera (ver Fig.1).

En Rhodopseudomonas capsulata se encontró que el operón nifHD y K está reiterado, el análisis de mutantes en estas reiteraciones mostró que solo una de estas copias se expresaba

, ya que con una sola mutación en una de las regiones se podían obtener cepas Fix-. En el análisis de revertantes Fix+ se encontró que la otra copia se estaba expresando, de modo que se concluyó que solo una de las copias era funcional en condiciones normales (Scolnick&Haselkorn, 1984).

Para estudiar la organización transcripcional de las regiones nif decidimos construir mutaciones en los genes nifH y nifD en diferentes regiones. Los fenotipos de las distintas mutantes nos permitirían definir si en las regiones a y b los genes nifH, D y K forman operones o si existen promotores secundarios entre los genes nifH y nifD como se ha observado en otros sistemas.

La reiteración de las regiones nif forma un sistema autocomplementado ya que genes mutados de una región serían complementados por la copia silvestre en la otra. Debido a esto, no se puede proceder a una mutagenesis a azar para aislar mutantes en los genes nif. El enfoque que seguimos fue hacer una mutagenesis dirigida *In vitro* de uno de los genes nifD para posteriormente reintroducir el fragmento mutado en R.phaseoli.

CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS.

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados y construidos en este trabajo están descritas en la tabla 1.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

El medio de cultivo rico utilizado para crecer R. phaseoli fue PY (peptona de caseína 0.5%, extracto de levadura 0.3% y CaCl_2 7mM) (Noel et al 1984). El medio rico utilizado para crecer E. coli fue LB (peptona de caseína 1.0%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%). Para solidificar los medios se empleó agar al 1.5%. Cuando se requirió, se utilizaron los siguientes antibióticos para R. phaseoli: Espectinomicina (Sp) 200ug/ml, Kanamicina (Km) 60ug/ml, Tetraciclina (Tc) 2.5ug/ml y Acido nalidixico (Nal) 10ug/ml y para E. coli: Kanamicina (Km) 30ug/ml, Espectinomicina (Sp) 100ug/ml, Ampicilina (Ap) 50ug/ml, Tetraciclina (Tc) 10 ug/ml, Cloranfenicol (Cm) 30ug/ml. La temperatura de crecimiento para R. phaseoli fue de 30°C y para E. coli 37°C. Los cultivos en medio líquido fueron agitados a 200rpm durante 24h, los cultivos en medio sólido se incubaron hasta obtener colonias aisladas (16 hrs para E. coli y tres días para R. phaseoli).

Las conjugaciones bacterianas se realizaron sobre PY sólido, en una relación de donadoras/ receptoras de 1 a 10. Después de 16h, las bacterias fueron resuspendidas en 1ml de solución de MgSO_4 10mM y plateadas sobre el medio selectivo.

EXTRACCION DE DNA TOTAL DE CEPAS DE Rhizobium phaseoli.

Se crecen las células en 10 ml de medio PA hasta saturación. Se centrifugan 10' a 7K a 4°C. Se lavan en Tris-EDTA (TE) pH8(50:20). Se centrifugan 10' a 7K a 4°C. Se resuspenden en: 1.7ml TE pH8, 0.1ml pronasa 10mg/ml en TE, 0.2ml SDS 10%. Se incuban 1hr. a 37°C. Se pasa el lisado tres veces por jeringa con aguja verde. Se extrajo dos veces con fenol cloroformo isoamílico (FCI) y una vez con cloroformo isoamílico (CI). Se precipita con Etanol (1/25 vols. NaCl 5M + 2 1/2 vols. Etanol) a -20°C por 2hrs. Se centrifuga 15' a 4°C a 7K. Se resuspende en 0.5ml de TE pH8(10:1). Se incuban con RNasa 0.2mg/ml por 1 hr a 37°C. Se extrae dos veces con FCI y una vez con CI. Se precipitan con Etanol. Se lava el precipitado con Etanol al 70% tres veces. Se evapora el Etanol y se resuspende la pastilla en 0.2ml; de TE 10:1.

PURIFICACION DE DNA DE BACTERIOIDE.

La extracción de DNA de bacterioide se lleva a cabo del mismo modo que para bacterias crecidas en vida libre. El método de obtención de bacteroides a partir de nódulos maduros es el siguiente: Se muelen 10 g de nódulos con hielo seco en un mortero. Se resuspende en 15ml de buffer A: manitol 0.5M, Tris pH7.5 50mM, Succinato de Sodio 20mM, B-mercaptoetanol 0.1%. Se homogeneiza y se filtra por gasa, colecta el filtrado. Se centrifuga a 1.5K a 4°C, y recentrifuga el sobrenadante a 9K a 4°C por 5' para bajar bacteroides. Se resuspende en 15ml de

medio de protoplastos: Tris pH8 15mM, Sacarosa 0.45M, EDTA 8mM. Se incubaba en hielo 5' y centrifugaba 5' a 10K. Se procede con la lisis como para bacterias.

PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDOS RECOMBINANTES.

Los plasmidos recombinantes fueron purificados según el metodo de Birnboim y Doly (Birboim & Doly, 1979). Las condiciones de digestión fueron como las reportadas por Quinto et al (1982).

TRANSFORMACION DE E.coli.

Se creció la cepa hasta una densidad de 0.6 DO 650nm en 50 ml. de medio Luria. Se cosecharon las células centrifugando a 8K, 5' a 5°C en JA-20. Se lavaron en NaCl 10 mM y recentrifugaron. Se resuspendieron en 50 ml. de buffer de transformación y incubaron 20' en hielo. Se concentran las células centrifugando 10' a 6K a 5°C y resuspendiendo en 1ml. de buffer de transformación. Se mezclan 200 ul de células competentes con 100 ul de buffer de transformación conteniendo 0.5 ug de DNA. Se incuban 10' en hielo y dan un choque de calor de 1' a 42°C. Se dejan expresando 1 hr. a 37°C en 3ml de Luria. Platear 0.2ml por caja. BUFFER DE TRANSFORMACION : 75mM CaCl₂, 5mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM MgCl₂.

CONDICIONES DE HIBRIDIZACION.

Para los experimentos de hibridización de ácidos nucleicos, se transfirió el DNA del gel a membranas de nitrocelulosa de manera similar a lo reportado por Southern (Southern, 1975). Las hibridizaciones con detectores homologos fueron efectuadas en condiciones de alta estringencia ionica a 65°C. Los plasmidos utilizados como detectores, fueron previamente marcados con 32P por el procedimiento de "nick translation" (Rigby et al, 1977).

DETERMINACION DE LA FIJACION DE NITROGENO Y DE LA NODULACION.

Para todos los ensayos de nodulación con *R. phaseoli*, se utilizaron semillas de frijol del cultivar Negro jamapa. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2.0%, se pregerminaron por espacio de tres días en la oscuridad a 30°C en de matraces Erlenmeyer de 250ml, conteniendo 100ml de solución salina libre de nitrógeno (Wacek y Bril, 1976) solidificada con agar al 0.8%. Una vez germinadas las plantas, se inocularon con 0.5ml de un cultivo bacteriano saturado.

La actividad enzimática de la nitrogenasa fue determinada en los nódulos adheridos a las raíces de las plantas. Dieciocho días después de haber germinado, las raíces se cortaron y se introdujeron en frascos de 10ml con tapon de hule hermetico, a dichos frascos se les inyectaron 0.5ml de acetileno y se dejó correr la reacción por 1h, y la producción de etileno se determino por cromatografía de gases.

MUTAGENESIS DIRIGIDA DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE *R.phaseoli*.

La mutagenesis dirigida de las regiones nif se hizo a través

de la construcción de una inserción que confiere resistencia a Espectinomicina en el extremo 3' del gene nifH de la region b. El plasmido pCQ12 es un derivado del vector pBR328 que tiene clonada la region nif b en el sitio EcoR1 (Quinto et al, 1983). La mutación fue construida clonando en el sitio HindIII en el extremo 3' del gene nifH un fragmento HindIII del plasmido pGV764 que confiere resistencia a Espectinomicina (Leemans et al). La region nif b mutada fue posteriormente subclonada en el plasmido pSUP205, un derivado del plasmido pBR325 que lleva la region mob del plasmido RP4 y un sitio cos clonado en el sitio SalI (Simon et al, 1983), para poder ser movilizada a R. phaseoli. Para este fin se utiliza al plasmido pRk2013, un replicón ColE1 que lleva la region Tra del RP4, como ayudador en la conjugación (Guiney et al, 1979). El pSUP205, por tener un origen de replicación proveniente del plasmido ColE1, no es estable en las Rhizobiaceas por lo que las transconjugantes que llevan la resistencia a Espectinomicina son recombinantes del vector intermediario y la región silvestre. Las clonas que llevan solo el marcador de la mutación y no las del vector son dobles recombinantes que intercambiaron la región silvestre por la region mutada.

RESULTADOS:

I. CONSTRUCCION DEL VEHICULO INTERMEDIARIO DE MUTAGENESIS pLS121.

El objetivo de este trabajo es obtener cepas que llevaran mutaciones en las distintas regiones nif a fin de llevar a cabo un análisis de la organización estructural de las reiteraciones. Para esto se uso un enfoque de mutagénesis dirigida para construir las cepas necesarias para este análisis.

En el laboratorio se habían construido previamente cepas que llevaban inserciones de un gene de resistencia a kanamicina en cada uno de los genes nifH. Las mutaciones fueron construidas sobre las regiones nif a y b clonadas en los plásmidos pCQ15 y pCQ23 respectivamente. Las regiones mutadas fueron subclonadas en un vehículo movilizable derivado del pBR325, el pSUP205, dando origen a los vectores de mutagénesis pJL115 y pJL123 los cuales fueron posteriormente movilizados a la cepa CE3 (ver tablas 1 y 2) para obtener mutaciones sencillas en los genes nif (Quinto et al, 1985).

Debido a la muy alta homología entre las regiones nif a y b se pudieron obtener cepas que llevaran inserciones en nifHa o en nifHb usando al plásmido pJL115. Con el plásmido pJL123 solo se obtuvieron recombinantes con la región c (ver Fig.3).

La cepa que lleva la inserción en nifHb (CFN2202) no lleva la region b original completa, ya que las secuencias que flanquean la insercion en la región nifHa deben haber substituído parte de la secuencia original de la región nifHb (Quinto et al, 1985). En el caso de buscarse una mutación sencilla esto no es importante pero cuando se pretende hacer un estudio de complementación entre dos regiones distintas mutadas la heterogeneidad a nivel de secuencia puede tener

consecuencias importantes.

Ya que se contaban con cepas que llevaban sus regiones originales mutadas (CFN2201,nifHa-; CFN2203,nifHc-) se escogió a la región b para construir la mutación de modo a tener el mayor número de mutaciones en sus regiones originales.

Las mutaciones que se construyeron en nifH fueron obtenidas por la inserción con técnicas de ingeniería genética de un fragmento BamH1 que lleva el gene de resistencia a kanamicina de Tn5 en el sitio BglIII localizado en el gene nifH en la región a, y en la región b por la substitución de un fragmento BglIII que cubre del extremo 5' hasta el sitio interno localizado dentro de nifHc. Este marcador permite una selección muy sencilla de las cepas que llevan cualquiera de estas mutaciones.

En este trabajo el objetivo era obtener cepas dobles mutantes en las regiones nif. Para esto es preciso tener dos marcadores distintos para poder seguir las mutaciones, en este caso se decidió usar un fragmento proveniente del plásmido pGV764 que lleva un determinante de resistencia a espectinomicina para construir la mutación (Leemans et al) (ver tabla 2 y Fig.2). Este plásmido es un derivado del pBR325 que lleva un fragmento BamH1 de plásmido R702 insertado en el sitio BamH1 del gene de resistencia a tetraciclina, este fragmento contiene los genes de resistencia a espectinomicina/estreptomicina y a sulfamida. Cuando este plásmido es cortado con la enzima de restricción HindIII se obtienen dos fragmentos, uno correspondiente al vector pBR325 mas un pedazo del inserto y otro que lleva la resistencia a espectinomicina.

Los experimentos de hibridización tipo Southern de la región b con el detector heterologo de Parasponia Rhizobium específico para nifD mostraron que la zona de homología se encuentra en un trecho de 2Kb localizado inmediatamente después del extremo 3' del gene nifH (Carmen Quinto, no publicado) (ver Fig.1). La

comparación de las secuencias de aminoácidos de la subunidad alfa de la nitrogenasa, codificada por el gene nifD, de Anabaena, R.japonicum, K.pneumoniae y Clostridium pasteurianum mostró que tanto el tamaño como la secuencia en sí de las distintas subunidades estaba muy conservada a través de la evolución (Kaluza & Hennecke, 1984; Lammers & Haselkorn, 1983). Escogimos el sitio HindIII localizado a 0.5Kb del extremo 3' del gene nifH, dentro de la zona de homología con nifD para construir la mutación (ver Fig.1). Por analogía, suponemos que nifD en R.phaseoli debe tener un tamaño cercano a los 1.5Kb encontrados en Anabaena y en R.japonicum, por lo tanto una inserción en el sitio de HindIII de la zona de homología con nifD debiera encontrarse dentro del gene o muy cerca de su extremo.

A) Construcción de la mutación.

El plásmido pCQ12 es un derivado del pBR329 el cual lleva un fragmento de la región b. En este plásmido hay tres sitios de reconocimiento para la enzima HindIII, dos de ellos localizados en el inserto y uno en el vector (Quinto et al, 1983). (ver Fig.2).

Para insertar el fragmento Spr en el sitio HindIII localizado en el extremo 3' del gene nifH, se digirió parcialmente al plásmido pCQ12 con HindIII de modo a obtener moléculas del plásmido cortadas en uno solo de los sitios. El plásmido pGV764 fue cortado totalmente con HindIII. Los plásmidos digeridos fueron ligados por 16Hrs. a 14°C en una relación 5:1 de pasajero-vector y a una concentración final de DNA en la reacción de 20ug/ml (ver Fig.2).

La mezcla de reacción de ligasa fue usada para transformar a la cepa de E.coli HB101, seleccionando las clonas que tuvieran los marcadores siguientes: Tc^r, Sp^r, Ap^r, Cm^s. Estos son los marcadores de un plásmido recombinante derivado del pCQ12 que

lleve ahora el determinante de resistencia a espectinomicina.

Se purificaron las cepas y se volvieron a checar los marcadores, se examinaron los patrones de restricción de los plasmidos que contenían las clonas seleccionadas. El fragmento HindIII que confiere resistencia a espectinomicina tiene un sitio interno de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI, se usó este sitio para determinar la orientación y el sitio de inserción del fragmento en el plasmido pCQ12.

Entre las clonas aisladas, se encontraron plasmidos que llevaban el fragmento insertado en el sitio de HindIII en el gene de resistencia a Tc en el vector; normalmente una inserción en este sitio debe dar un fenotipo Tc^s, pero en este caso tenían un fenotipo Tc^r porque el fragmento no produce inserciones polares en una de sus orientaciones. Debido a esto se tomaron solo las clonas que tuvieran el fragmento insertado en la orientación inversa al sentido de la transcripción de nifH. El 16% de las clonas estudiadas tenían el fragmento en la orientación y el sitio correctos.

B) Subclonación de la mutación en el vector pSUP205.

Ya que no existe un sistema de transformación eficiente en R.phaseoli es necesario subclonar el fragmento mutado a un plasmido que pueda ser movilizado o conjugado para poder reintroducirlo a su fondo genético original. El plasmido que se usó como vector es el pSUP205 (ver tabla 1 y Fig.2).

El plasmido que llevaba la mutación y el pSUP205 fueron digeridos con EcoRI, posteriormente se ligaron en las mismas condiciones que las anteriores. La cepa de E.coli HB101 fue usada nuevamente como receptora de la transformación. Los marcadores que se seleccionaron fueron Tc^r, Sp^r, Ap^s, Cm^s que corresponden al pSUP205 con el fragmento mutado clonado en el sitio de EcoRI del gene de resistencia a cloramfenicol (ver Fig.2).

Solo el 1% de las clonas Sp r, Tc r era Ap s y Cm s, el resto eran Ap r, Cm s lo que corresponde al fragmento reclonado en el vector original.

Se examinó el patron de restricción de las clonas Tc r, Sp r, Ap s, Cm s con la enzima EcoR1 y se observaron dos fragmentos: uno de 7.9 Kb correspondiente al pSUP205 y otro de 6.7 correspondiente al fragmento mutado.

A este plasmido se le denominó pLS121.

II. CONSTRUCCION DE LAS MUTANTES.

La mutación fue introducida a R. phaseoli por movilización del vector intermediario pLS121. Se utilizó al plasmido pRK2013 como ayudador en cruzas triparentales. Este plasmido es un derivado del plasmido ColE1 que lleva el operon Tra del replicon RP4, el pRK2013 moviliza a todos los elementos geneticos que lleven el sitio de origen de la conjugación del RP4, el sitio mob, por complementación en trans de las funciones de conjugacion. El pRK2013 es incompatible con todos los derivados del pBR al tener un origen de replicacion común proveniente del ColE1 (Guiney et al ,1979). Si la cepa huesped es Rec-, los plasmidos se transferiran independientemente el uno del otro, no como cointegrados.

Estos orígenes de replicación no son funcionales en R. phaseoli, las transconjugantes adquieren los marcadores del vector intermediario porque este recombina con regiones homologas en el genoma de la receptora. Asimismo, es posible obtener transconjugantes en las cuales ocurre un fenomeno de doble recombinación entre la región silvestre y la región mutada, quedando la mutación construida insertada en su sitio en el genoma.

En este trabajo utilizamos a las cepas CE3 (silvestre), CFN2201, CFN2202 y CFN2203 (nifHa-, NifHb- y nifHc-

respectivamente) como receptoras en las cruzas. La cepa CE3 fue usada para construir cepas que llevaran inserciones sencillas en los genes nifD tanto en la región a como en la región b. Las cepas mutadas en nifH fueron usadas para construir cepas que llevaran mutaciones en dos regiones a la vez.

Las transconjugantes fueron seleccionadas en medio PY con Nal, Sp y Kan cuando era necesario. El ácido nalidixico fue empleado para contraseleccionar a las cepas donadora y ayudadora. La frecuencia de aparición de transconjugantes Sp-r fue del orden de 10^{-4} transconjugantes por receptora. Se verificaron los marcadores de resistencia a Tc de las transconjugantes Nal-r, Sp-r. El 3% de las transconjugantes no llevaban marcadores del pSUP205.

El genotipo de las cepas mutantes fue verificado en experimentos de hibridización de tipo Southern usando detectores específicos del gene nifH.

Se purificó DNA total de cada una de las clonas, posteriormente se digirieron con enzimas de restricción y se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-boratos 1X. El DNA fue transferido a membranas de nitrocelulosa por capilaridad y fijado con calor. Los filtros fueron hibridizados con el detector marcado a alta actividad específica por el procedimiento de "nick translation". En la parte A de la figura 3 se observan en los carriles 1, 2, 3 y 4 los perfiles de hibridización en EcoR1 de las cepas CE 3, CFN2201, CFN2202 y CFN2203 respectivamente con un detector que incluye del extremo 3' del gene nifH hasta el extremo 5' del inserto en el pCQ15. En la cepa silvestre se observan una banda de 4.1 Kb y un doblete de 4.9 y 4.7 Kb que corresponden a nif b a y c respectivamente. En la cepa CFN2201 la banda de 4.9 Kb fue substituída por una banda de 7 Kb debida a la insercion del cassette Kan en nifHa. En la cepa CFN2202 se observa en lugar de la banda de 4.1 Kb, una banda de 6.2 Kb por el mismo tipo de fenómeno pero en nifHb. En la cepa CFN2203 la banda de 4.7 Kb

da origen a una banda de 5.5 Kb producto de la delección substitucion del fragmento interno BglII por el cassette en nifHc. En el carril 5 se observan tres bandas de 7.5, 4.7 y 4.1 Kb. este patron corresponde al esperado en mutantes en el sitio HindIII de la region nif a por la inserción del cassette Sp. En el carril 5 se observan dos bandas, una de 4.7 Kb y una mucho más intensa de alrededor de 7 Kb las cuales corresponden al patron esperado en mutantes en nifHa por la inserción del cassette Kan como en el sitio HindIII de la región nif b por el cassette Sp ya que las dos regiones mutadas deben tener 7 y 6.7 Kb respectivamente de peso molecular.

En la parte B de la figura 3 se observan en los carriles 1 y 2 los perfiles de hibridización con EcoR1 de las cepas CFN2202 y CFN2203 usando el mismo detector que en el anterior. En la cepa CFN2202 se observan tres bandas de 6.2, 4.7 y 4.5 Kb correspondientes a las regiones nif a y c silvestres y a la región b mutada por la inserción del cassette Kan. En la cepa CFN2203 se observan tres bandas de 5.5, 4.7 y 4.1 Kb correspondientes a las regiones nif a y b silvestres y a la region c mutada por la delección substitución del cassette Kan entre los sitios BglII internos. En el carril 3 se observan tres bandas de 7.3, 6.2 y 4.5 Kb correspondientes al patrón esperado en una mutante que lleve la inserción del cassette Kan en el gene nifH de la región b y la inserción del cassette Sp en el sitio HindIII de la región a. En el carril 4 se observan tres bandas de 7.3, 5.5 y 4.1 Kb que corresponden al patrón esperado en una cepa mutada en el gene nifH de la región c por la delección substitución del cassette Kan y mutada en la región a por la inserción en el sitio HindIII del cassette Sp. En el carril 5 se observan tres bandas de 6.7, 5.5 y 4.7 Kb que coresponden al patrón de una cepa mutada en la región c por la delección substitución del cassette Kan y en el sitio HindIII de la región b por la inserción del cassette Sp.

Se seleccionó una clona de cada tipo y se les denominó de la manera siguiente:

CFN2204	<u>nifDa</u> ::Sp
CFN2205	<u>nifHb</u> ::Km, <u>nifDa</u> ::Sp
CFN2206	<u>nifHa</u> ::Km, <u>nifDb</u> ::Sp
CFN2207	<u>nifHc</u> ::Km, <u>nifDa</u> ::Sp
CFN2208	<u>nifHc</u> ::Km, <u>nifDb</u> ::Sp

III. FENOTIPO SIMBIOTICO DE LAS MUTANTES.

Se inocularon raíces de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa con las cepas mutantes para determinar sus fenotipos de nodulación (Nod) y de fijación de nitrógeno (Fix).

Las plantas de frijol fueron inoculadas a los tres días de haber germinado. A los 14 y 17 días de haber sido inoculadas se cortaron las raíces y se determinó la actividad de fijación de nitrógeno por el ensayo de reducción de acetileno.

Todas las cepas produjeron un número de nódulos por planta muy similar. Esto indica que las mutaciones en los genes estructurales de la nitrogenasa no afectan el proceso de infección de la planta por las bacterias (ver Fig.3)

Las cepas CFN2204, CFN2207 y CFN2208 tuvieron un fenotipo Fix+, comparable a la cepa silvestre. Las cepas CFN2205 y CFN2206 tuvieron un fenotipo Fix-, además los nódulos producidos por estas plantas eran de color blanco, lo cual es un marcador característico del fenotipo Fix- (ver Fig.3).

Se comprobó que las bacterias contenidas en los nódulos hayan mantenido los marcadores de resistencia de la clona del inóculo. Se extrajeron los bacteroides de tres nódulos de cada tres plantas inoculadas con la misma cepa. El 100% de las colonias probadas (100 de cada tipo) mantuvieron los marcadores del inóculo.

Se checaron también los patrones de hibridización de los bacteroides extraídos de nódulos en experimentos de tipo Southern usando el mismo detector que para caracterizar las cepas y se observó que los bacteroides conservaban el mismo patrón que las bacterias del inóculo (figura 3, parte C).

DISCUSION:

En este trabajo se describe la construcción de cepas de R.phaseoli que llevan mutaciones en los genes estructurales de la nitrogenasa de las distintas regiones nif. El análisis de los fenotipos simbióticos de las mutantes permite estudiar los distintos arreglos transcripcionales de los genes de la nitrogenasa.

Los experimentos de hibridización de tipo Southern de las regiones nif contra detectores heterologos de Parasponia Rhizobium específicos para nifD y nifK mostraron que solo en las regiones a y b existen secuencias homologas a nifD y nifK (C.Quinto, no publicado). Por lo tanto en R.phaseoli los genes estructurales de la nitrogenasa estarían agrupados en las regiones a y b.

Las cepas CFN2204, CFN2207 y CFN2208 tienen un fenotipo Fix+. La característica común de estas cepas es que tienen una inserción en la región homóloga a nifD de una de las regiones a o b, manteniendose la otra libre de mutaciones. Del fenotipo Fix+ de estas cepas se deduce que ninguno de los genes nifD es indispensable para la fijación de nitrógeno.

Las cepas CFN2207 y CFN2208, además de las inserciones en la región homóloga a nifD, tienen una inserción en el gene nifH de la región c (C.Quinto et al, 1985), esto no afecta el fenotipo simbiótico de manera alguna, por lo menos dentro de los limites de sensibilidad del ensayo de reducción de acetileno.

Las cepas CFN2205 y CFN2207 tienen un fenotipo Fix-. En estas cepas las inserciones mapean en las regiones nif a y b. En la cepa CFN2206, la región a esta interrumpida en el gene nifH por la inserción de un fragmento que confiere resistencia a kanamicina y la region b por un fragmento que confiere resistencia a espectinomicina insertado en la zona de homología a nifD. En la cepa CFN2205 las mutaciones estan invertidas, la inserción en nifH esta en la región b y la inserción en la

region homologa a nifD esta en la region a. En caso de existir diferencias a nivel de secuencia importantes entre la región a y b que determinaran arreglos transcripcionales distintos en los genes de la región a y los genes de la región b las cepas CFN2205 y CFN2206 pudieran ser identicas mas no equivalentes ya que los vectores de mutagenesis recombinaron en la cepa CFN2205 con sus regiones homologas no originales (i.e. la region a con la region b y vice versa).

En estas cepas no se observa complementacion de la inserción en nifH por la región que lleva la inserción en la región homologa a nifD; esto indica que el fenotipo Fix- es debido a la carencia de producto de los genes nifD debido en un caso a la inserción en el gene nifD y en el otro a la polaridad de la inserción en nifH sobre la expresión de nifD.

Por esto concluimos que en las regiones a y b los genes nifH y nifD forman una unidad de transcripción.

En R.phaseoli los genes estructurales de la nitrogenasa conservan el arreglo transcripcional que se ha encontrado en todos los Rhizobia de crecimiento rapido.

En el laboratorio se ha demostrado que los plasmidos de R.phaseoli contienen secuencias reiteradas (M.Flores, no publicado). Usando clonas que llevan fragmentos de plasmido clonados al azar como detectores en experimentos de hibridización de tipo Southern de digestiones de genoma total de cepas de R.phaseoli se demostró que algunas estaban reiteradas en el genoma. Se calculó que aproximadamente el 15% de las clonas tomadas de cada plasmido estaban reiteradas. El fenotipo simbiótico de las cepas CFN2207 y CFN2208 indica que ninguna de las reiteraciones es indispensable para la fijacion de nitrogeno y aparentemente (considerando la incertidumbre del ensayo de reduccion de acetileno empleado para la determinación de la actividad de nitrogenasa) una sola de las regiones es suficiente para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Por consecuencia parecería que la reiteración de las

regiones nif es producida no por el requerimiento masivo del producto de los genes sino que responde a un fenómeno general de reiteración que involucra a secuencias contenidas en plasmidos en R.phaseoli.

REFERENCIAS:

- Beringer,JE, Brewin,N, Johnston,AWB, Schulman,HM & Hopwood,DA (1979). The Rhizobium-Legume Symbiosis. Proc.R.Soc. London SerB 204:219-233
- Beynon,J, Cannon,M, Buchanan-Wollaston,V & Cannon,F (1983). The nif promoters of Klebsiella pneumoniae have a characteristic primary structure. Cell 34:665-675
- Boyer,HB & Roulland-Dussoix,D (1969). A Complementation Analysis of the restriction and modification of DNA in Escherchia coli. J.Mol.Biol 41:459-472
- Birboim,H & Doly,l (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc.Ac.Res. 7:1513-1523
- Buchanan-Wollaston,V & Cannon,F (1984). Regulation of nif transcription in Klebsiella pneumoniae. Advances of Nitrogen Fixation Research. Veeger,C, Newton,WE (eds) The Hague Nijhoff/Junk p.732-737
- Corbin,D, Ditta,G & Helinski,D (1982). Clustering of Nitrogen Fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti J.Bacteriol 149:221-228
- Dixon,R (1984). The Genetic Complexity of Nitrogen Fixation. J.Gen.Microbiol 130:2745-2755
- Dixon,R, Alvarez-Morales,A, Clements,J, Drummond,M, Merrick,M & Postgate,JR (1984). Transcriptional Control of the nif Regulon in Klebsiella pneumoniae. Advances in Nitrogen Fixation Research, Veeger,C, Newton,WE (eds) Nijhoff/Junk p.635-642
- Downie,JA, Ma,QS, Knight,CD, Hombrecher,G & Johnston,AWB (1983). Cloning of the simbiotic region of Rhizobium leguminosarum: The nodulation genes are between the nitrogenase genes and a nifA-like gene. EMBO J. 2:947-952
- Elmerich,C, Haumard,J, Sibold,l, Manheimer,I & Charpin,N (1978). Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage Mu integration into Klebsiella pneumoniae nitrogen fixation genes. M.G.G. 165:181-189
- Guiney,DG & Helinski,DR (1979). Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. J.Bacteriol 117:619-630
- Kaluza,K & Hennecke,H (1984). Fine structure analysis of the nifDK operon encoding the α and β subunits of dinitrogenase from Rhizobium japonicum M.G.G 196:35-42
- Lammers,pj & Haselkorn,R (1983). Sequence of the nifD gene

coding for the α subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium Anabaena. PNAS 80:4723-4727

-Ma,Q, Johnston,AWB, Hombrecher,G & Downie,JA (1982). Molecular genetics of mutants of Rhizobium leguminosarum which fail to fix nitrogen. M.G.G. 187:166-171

-Magasanik,B (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Annu.rev.Genet. 16:135-168

-MacNeil,T, MacNeil,D, Roberts,GP, Supiano,MA & Brill,WJ (1978). Fine structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in Klebsiella pneumoniae. J.Bacteriol 136:253-266

-MacNeil,D, Zhu,Q, Brill,WJ (1981). Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: Isolation and characterization of strains with nif-Lac fusions. J.Bacteriol 145:348-357

-Merrick,M, Filser,M, Kennedy,C & Dixon,R (1978). Polarity of mutations induced by insertion of transposon Tn5, Tn7 and Tn10 into the nif gene cluster of Klebsiella pneumoniae. M.G.G. 165:103-111

-Merrick,M, Hill,S, Hennecke,H, Hahn,M, Dixon,R & Kennedy,C (1982). Repressor properties of the nifL gene product in Klebsiella pneumoniae. M.G.G. 185:75-81

-Morett,E, Moreno,S & Espin,G (1985). Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine sensitive (MSs) mutants of Rhizobium phaseoli. M.G.G. en prensa

-Ow,DW, Sundaresan,V, Rothstein,DM, Brown,SE & Ausubel,FM (1983). Promoters regulated by glnG (ntrC) and nifA gene products share a heptameric consensus sequence in the -15 region. Cell 80:2524-2528

-Quinto,C, de la Vega,H, Flores,m, Fernandez,L, Ballado,T, Soberon,G & Palacios,R (1982). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature 299:724-725

-Quinto,C, de la Vega,H, Flores,M, Leemans,J, Cevallos,MA, Pardo,MA, Azpiroz,R, Girard,MdeL, Calva,E & Palacios,R (1985). Nitrogenase reductase: a multigene family in Rhizobium phaseoli. PNAS 82:1170-1174

-Rigby,PWJ, Dieckman,M, Rhodes,C & Berg,P (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to a high specific activity invitro by nick-translation with DNA polymerase I. J.Mol.Biol 113:237-251

-Robertson,JG, Farnden,KJK, Warburton,MP, Banks,JM (1975) Induction of glutamine synthetase during nodule development in Lupin. Aust.J.Plant.Physiol 2:265-272

- Ruvkun,G & Ausubel,FM (1980). interspecies homology of nitrogenase genes. PNAS 77:191-195
- Ruvkun,G, Sundaresan,V & Ausubel,FM (1982). Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation genes. Cell 29:551-559
- Scolnick,PA & Haselkorn,R (1984). Activation of extra copies of genes coding for nitrogenase in Rhodopseudomonas capsulata. Nature 307:289-292
- Scott,K, Rolfe,BG & Shine,J (1981). Biological nitrogen fixation: Primary structure of the Klebsiella pneumoniae nifH and nifD genes. J.Mol.Appl.Genet. 1:71-81
- Scott,K, Hughes,JE, Gresshoff,PM, Beringer,JE, Rolfe,BG & Shine,J (1982). Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved in symbiotic nitrogen fixation, J.Mol.Appl.Genet 1:315-326
- Scott,K, Rolfe,B & Shine,J (1983a). Nitrogenase structural genes are unlinked in the non-legume symbiont Parasponia Rhizobium. DNA 2:141-148
- Scott,K, Rolfe,B & Shine,J (1983b). Biological nitrogen fixation: primary structure of the Rhizobium trifolii iron protein gene. DNA 2:149-155
- Simon,R, Priefer,V & Puhler,A (1983). Abroad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technology 1:784-791
- Southern,EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol 98:503-518
- Sundaresan,V, Jones,JDG, Ow,DW & Ausubel,FM (1983). Conservation of nitrogenase promoters from Rhizobium meliloti and Klebsiella pneumoniae. Nature 301:728:732
- Szeto,WW, Zimmerman,JL, Sundaresan,V & Ausubel,FM (1984). A Rhizobium meliloti symbiotic regulation gene. Cell 36:1035-1043
- Wacek,T & Brill,WJ (1976). Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in Soy-bean. Crop.Sci 16:519-522
- Zimmerman,JL, Szeto,WW, & Ausubel,FM (1983). Molecular characterization of Tn5 induced symbiotic (Fix-) mutants of Rhizobium meliloti. J.Bacteriol 156:1025-1036

TABLA I

Tabla de cepas utilizadas y construidas en este trabajo.

E.coli

HB101	recA,hsdR,hsdM,pro,leu,StrA EndoI,thi,lacY	Boyer et al 1969
-------	---	------------------

R.phaseoli

CFN42	Silvestre	Quinto et al 1982
CE3	Derivada StrR de la cepa CFN42	Noel et al 1984
CFN2201	CE3, <u>nifHa</u> ::Km	Quinto et al 1985
CFN2202	CE3, <u>nifHb</u> ::Km	" "
CFN2203	CE3, <u>nifHc</u> ::Km	" "
CFN2204	CE3, <u>nifDa</u> ::Sp	Este trabajo
CFN2205	CFN2202, <u>nifDa</u> ::Sp	" "
CFN2206	CFN2201, <u>nifDb</u> ::Sp	" "
CFN2207	CFN2203, <u>nifDa</u> ::Sp	" "
CFN2208	CFN2203, <u>nifDb</u> ::Sp	" "

TABLA II

Tabla de plasmidos utilizados y construidos en este trabajo

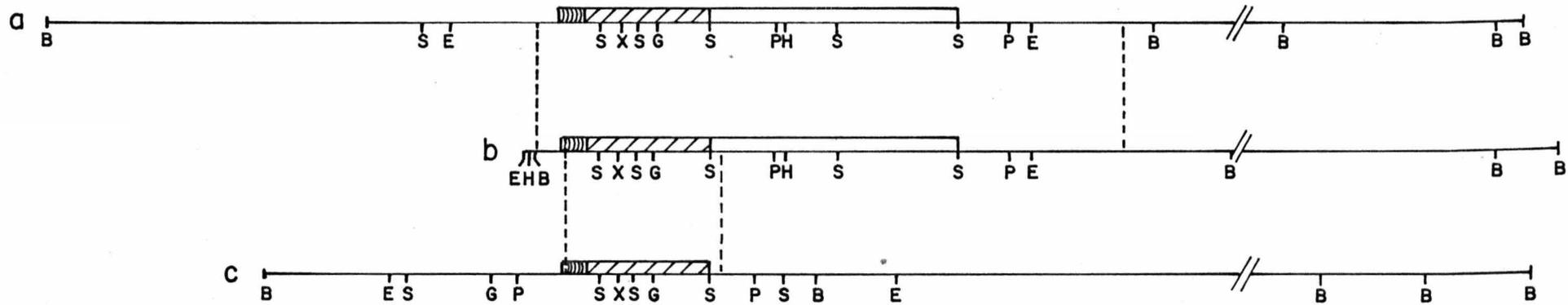
pCQ12	Derivado de pBR329 con el inserto EcoR1 de la region <u>nif</u> b.	Quinto et al 1982
pSUP205	Costrasmido derivado de pBR325 con la region <u>mob</u> de RP4	Simon et al 1983
pRK2013	Derivado de ColE1 con el operon <u>Tra</u> de RP4	Guiney et al 1979
pGV764	Derivado de pBR325 con un fragmento BamH1 del plasmido R702 que confiere resistencia a Sp/Sm y a Su	Leemans, no publicado
pLS121	Derivado del pSUP205 que lleva la region <u>nif</u> b mutada en la zona de homologia con <u>nifD</u>	Este trabajo

FIGURA 1: MAPA DE RESTRICCIÓN DE LAS REGIONES *nif*. Las líneas punteadas denotan los límites de homología entre las regiones.  gene *nifH*.  zona de homología con *nifD*.  zona de operación y promotor. B, BamHI. E, EcoRI. S, Sali. G, BglII. H, HindIII. P, PstI. X, XhoI. (Tomada de Quinto et al, 1985).

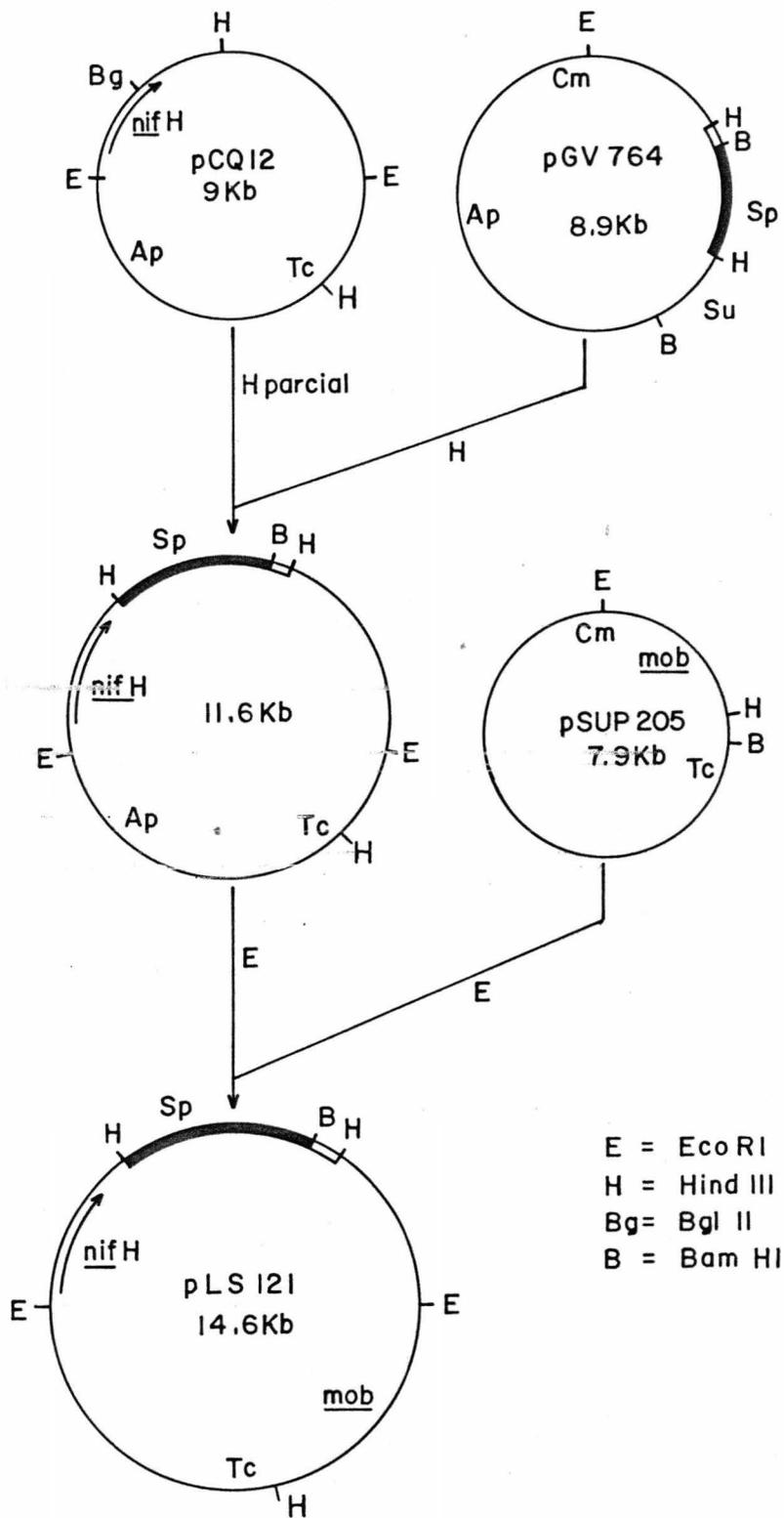
FIGURA 2: CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR INTERMEDIARIO pLS121

FIGURA 3: PATRONES DE HIBRIDIZACIÓN DE LAS MUTANTES. Hibridizaciones de DNA total de las mutantes digerido con EcoRI usando el plasmido que lleva el 1^{ra} y 3^{ra} fragmentos de Sali de pCQ15. A (vida libre) 1- CE3. 2-CFN2201. 3-CFN2202. 4-CFN2203. 5-CFN2204. 6-CFN2205. B (vida libre) y C (bacteroides) 1-CFN2202. 2-CFN2203. 3-CFN2206. 4-CFN2207. 5-CFN2208.

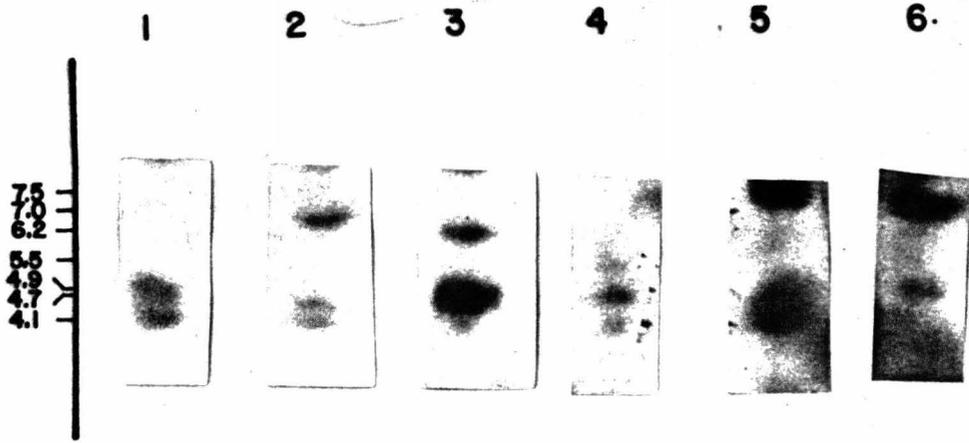
FIGURA 4: GENOTIPOS Y FENOTIPOS SIMBIOTICOS DE LAS MUTANTES UTILIZADAS CONSTRUIDAS.



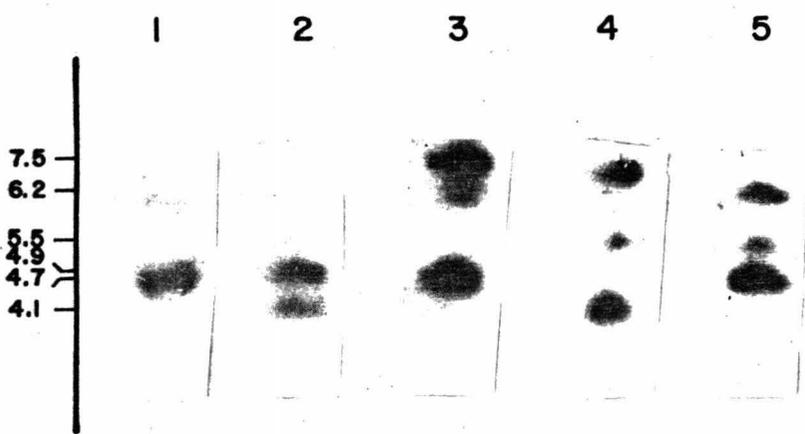
Construcción de una mutación en nif D



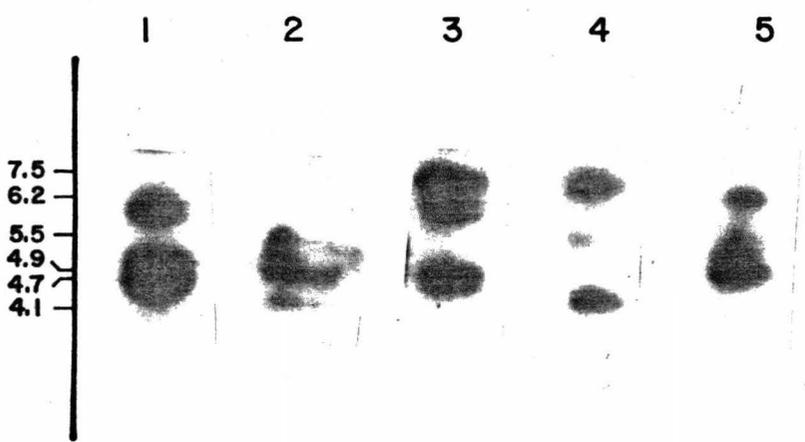
A



B



C



Kb

CEPA	GENOTIPO	FENOTIPO		Referencias
		Nod	Fix	
CFN 42		+	+	Noel <u>et al</u> 1984
CFN 2201		+	+	Quinto <u>et al</u> 1985
CFN 2202		+	+	"
CFN 2203		+	+	"
CFN 2204		+	+	Este trabajo
CFN 2205		+	-	"
CFN 2206		+	-	"
CFN 2207		+	+	"
CFN 2208		+	+	"

 Km^R
 Sp^R