

1 EJ

CFN60

TM

1987

7

Ej. 2



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE  
FIJACION DE NITROGENO

"Análisis transcripcional de los genes  
reiterados de la nitrogenasa reductasa  
en Rhizobium phaseoli"

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Maestro en Investigación Biomédica Básica

P r e s e n t a

El Lic. Juan Enrique Morett Sánchez.

Cuernavaca, Mor. Enero de 1987.

5-13-10



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

a Patricia

INDICE

INTRODUCCION.....  
Organización Estructural de los  
Genes de la Nitrogenasa.....  
Regulación de la Fijación de  
Nitrógeno.....  
Organización y Regulación de los Genes  
de la Nitrogenasa en Rhizobium phaseoli.....

MATERIAL Y METODOS.....  
Cepas Bacterianas y Plásmidos.....  
Condiciones de Cultivo.....  
Purificación y Análisis de  
Plásmidos Recombinantes.....  
Transformación con Plásmidos Recombinantes.....  
Construcción de las Mutantes.....  
Extracción de DNA Total y Condiciones  
de Digestión.....  
Hibridización de Secuencias de DNA con  
Detectores Específicos.....  
Determinación de la Nodulación y  
de la Fijación de Nitrógeno.....  
Determinación de la Actividad  
de la B-galactosidasa.....  
Determinación de Proteína.....

RESULTADOS.....  
Subclonación de las Regiones  
nif a, b y c en pSUP205.....  
Construcción de las Fusiones Génicas.....  
Construcción de las Cepas nifH::lacZ.....  
Construcción de Dobles Mutantes  
en los genes nifH.....  
Localización Física del Cassette lacZ.....  
Fenotipo Simbiótico de las Mutantes.....

DISCUSION.....

REFERENCIAS.....

AGRADECIMIENTOS.....

## INTRODUCCION

La conversión del nitrógeno molecular a amonio está catalizada por un complejo enzimático llamado nitrogenasa; este complejo enzimático solo está presente en algunos organismos procariotes denominados diazótrofos. La nitrogenasa está constituida por dos componentes protéicos: el componente I, denominado nitrogenasa, está conformado por dos subunidades "alfa" y dos subunidades "beta" codificadas por los genes nifD y nifK respectivamente, y requiere hierro y molibdeno como cofactores; mientras que el componente II, llamado nitrogenasa reductasa, es el producto del gene nifH y se encuentra como un dímero de subunidades idénticas, que requiere hierro para su actividad.

Las bacterias del género Rhizobium reducen el nitrógeno atmosférico al asociarse simbioticamente con las raíces de varias plantas leguminosas. Para establecer la asociación simbiótica se requiere de un reconocimiento muy específico entre la planta y la bacteria; las bacterias penetran por los pelos radiculares hasta la corteza de la raíz, en este sitio se introducen a las células de la planta y comienzan a dividirse hasta desarrollar una estructura característica conocida como nódulo (Beringer et al 1979). Dentro del nódulo las bacterias sufren un marcado cambio, tanto morfológico como fisiológico, que les permite estar en condiciones adecuadas para llevar a cabo la fijación de nitrógeno; las bacterias en este estado diferenciado se denominan bacteroides. El nitrógeno reducido en el nódulo es asimilado por las células vegetales ya que las enzimas necesarias para la asimilación de amonio se encuentran reprimidas en los bacteroides (Robertson et al 1975). Por otra parte, los bacteroides obtienen la energía necesaria para la fijación del nitrógeno de la oxidación de los compuestos

tomados de las células de la planta.

#### ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LOS GENES DE LA NITROGENASA.

Los genes estructurales de la nitrogenasa fueron caracterizados inicialmente en la enterobacteria Klebsiella pneumoniae; en este organismo el gene que codifica para la nitrogenasa reductasa, nifH, y los genes que codifican para la nitrogenasa, nifD y nifK, están organizados en un solo operón que se transcribe a partir del gene nifH hasta nifK (Mac Neil et al 1978; Merrick et al 1978; Elmerich et al 1978). Esta misma organización de los genes estructurales de la nitrogenasa se ha encontrado en varias especies de Rhizobium de crecimiento rápido, como lo es el caso de R. meliloti, R. leguminosarum y R. trifoli (Ruvkun et al 1982; Corbin et al 1982; Ma et al 1982; Scott et al 1982). El estudio de los genes de la nitrogenasa en estos organismos ha revelado que se encuentran contenidos en plásmidos de alto peso molecular que también contienen los genes necesarios para el establecimiento de la simbiosis (Nutti et al 1979). Estos genes fueron localizados utilizando a los genes análogos de K. pneumoniae como detectores de hibridización, puesto que las secuencias que codifican para los tres polipéptidos de la nitrogenasa se encuentran altamente conservadas en todos los organismos fijadores de nitrógeno que se han estudiado hasta el momento (Ruvkun y Ausubel 1980).

La organización de los genes estructurales de la nitrogenasa en los Rhizobium de crecimiento lento, Bradirhizobium japonicum y Parasponia rhizobium es diferente a la encontrada en los otros organismos fijadores de nitrógeno. En estos casos el gene nifH y los genes nifD y nifK se encuentran en dos unidades distintas de transcripción, separadas entre sí 20 Kb en el cromosoma de estos organismos (Scott et al 1983).

## REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO.

Para la formación de la simbiosis entre las bacterias del género Rhizobium y las leguminosas, se requiere de una serie de pasos de activación génica, tanto de la planta como de la bacteria, sujetos a un complejo control genético. En varias especies de Rhizobium han sido identificados recientemente dos genes regulatorios involucrados con el desarrollo del nódulo y para la fijación de nitrógeno. El producto del gene nodD, mediante cierto compuesto excretado por la planta, activa la expresión de los genes nodA, nodB y nodC. Los productos de estos genes inducen los primeros cambios morfológicos en la planta que conducen a la formación del enrollamiento de los pelos radiculares (Mulligan y Long 1985). El segundo gene regulador, denominado nifA, se requiere para la transcripción de los genes estructurales de la nitrogenasa; este gene ha sido descrito en R. meliloti, R. leguminosarum y B. japonicum (Szeto et al 1984; Downie et al 1983; Fisher et al 1986).

El producto de nifA fue descrito inicialmente en K. pneumoniae. En este organismo el producto de nifA, junto con la subunidad sigma de la RNA polimerasa codificada por glnF, funciona como un activador específico de la transcripción de los 8 operones nif presentes en este organismo. La activación de nifA a su vez está controlada por el sistema regulador general del metabolismo nitrogenado, es decir, para su expresión se necesitan los productos de glnG y nuevamente de glnF (Dixon 1984). Los promotores controlados por glnG, junto con la subunidad sigma glnF, tienen una secuencia consenso característica y los genes nifA y glnG son funcional y estructuralmente similares (Ow y Ausubel 1983; Merrick 1983). Las secuencias nucleotídicas en las regiones 5' de los genes de

la nitrogenasa de varios organismos, tienen una secuencia consenso que se requiere para la activación de la transcripción por el producto de nifA, esta secuencia se encuentra normalmente alrededor de 200 pb del sitio de iniciación de la traducción, aunque sigue funcionando si se desplaza hasta 2Kb e independientemente de la orientación (Buck et al 1986).

En R. meliloti se ha descrito que el gene regulatorio denominado nifA tiene homología con los genes nifA y glnG de K. pneumoniae (Buikema et al 1985; Weber et al 1985). Asimismo, en R. meliloti ha sido descrito un gene regulador similar a glnG, que al ser mutado induce el mismo fenotipo que en K. pneumoniae en cuanto a la incapacidad de crecer utilizando a ciertos aminoácidos como fuente única de nitrógeno, sin embargo, la regulación de la transcripción de los genes de la nitrogenasa en nódulo no se ven afectados por las mutaciones en este gene. Estos resultados sugieren que en R. meliloti el producto de glnG no es indispensable para la expresión de nifA en la simbiosis (Ausubel et al 1985).

#### ORGANIZACION Y REGULACION DE LOS GENES DE LA NITROGENASA EN R. phaseoli.

En Rhizobium phaseoli se ha encontrado que los genes de la nitrogenasa están reiterados en un plásmido de alto peso molecular (Quinto et al 1982). En un banco de genes de la cepa silvestre CFN42 se encontraron tres plásmidos que llevan clones distintas que presentan hibridización positiva usando como detector a los genes de la nitrogenasa de K. pneumoniae. El análisis por microscopía electrónica de heteroduplex de fagos recombinantes que llevan cada una de las tres regiones reiteradas, denominadas nif a, nif b y nif c, mostró que existe homología a lo largo de 5 Kb entre las regiones nif a y nif b y a su vez estas tienen 1.3 Kb de homología con la tercera región nif (Quinto et al 1985) (Fig. 1). El análisis de restricción



llevado a cabo en los fagos recombinantes demostró que la homología encontrada por heteroduplex se refleja en la conservación de los sitios de restricción, y que estos empiezan a divergir en el sitio que se pierde la homología de los fagos recombinantes. Los experimentos de hibridización llevados a cabo con fragmentos internos de cada uno de los genes de la nitrogenasa, reveló que el gene nifH esta presente en las tres reiteraciones, mientras que los genes nifD y nifK solo se encontraron en las regiones nif a y nif b (Quinto, no publicado).

La secuencia nucleotídica de las tres copias del gene nifH presentes en el plásmido simbiótico de la cepa CFN42, reveló una homología del 100% entre estos genes, que se inicia aproximadamente a 100pb del sitio de inicio de la traducción de la región nif c, y de 200pb entre las regiones nif a y nif b, y por el extremo 3' abarca al gene completo (Fig. 1) (Quinto et al 1985).

La reiteración de secuencias genómicas en Rhizobium phaseoli no está restringida a los genes de la nitrogenasa. Recientemente se ha encontrado una gran variedad de secuencias reiteradas en el genoma de estos organismos, estas secuencias han sido localizadas tanto el cromosoma como en varios megaplásmidos, lo que ha puesto de manifiesto que la reiteración de secuencias de DNA es una característica general de estos organismos (Flores et al 1987 en prensa).

El alto grado de homología entre las tres regiones nif puede ser el resultado de una reiteración muy reciente de estas secuencias y por lo tanto aún no se observa divergencia; otra explicación es que exista una presión de selección muy fuerte para mantener las tres reiteraciones, y que estas permanecen sin divergir mediante algún mecanismo que conserva la homología completa, de tal manera que si ocurriera alguna modificación en

la secuencia de alguna región, ésta sería corregida, o las restantes cambiarían de la misma manera. Con el fin de estudiar esa posibilidad, así como para determinar la función de la reiteración de los genes de la nitrogenasa, se construyeron mutantes en cada uno de los tres genes nifH por inserción in vitro del gene que confiere resistencia a kanamicina dentro de la región codificadora de nifH. Ninguna de las mutantes tiene alterado el fenotipo simbiótico, es decir, todas ellas nodulan plantas de frijol y fijan nitrógeno en sus raíces de la misma manera que la cepa silvestre; de lo anterior se deduce que en esta cepa ninguno de los genes de la nitrogenasa reductasa es indispensable para poder establecer una simbiosis efectiva (Quinto et al 1985). Asimismo, utilizando las cepas anteriores se construyeron dobles mutantes que además de las inserciones en los genes nifH, tienen interrumpido al gene nifD por un segmento de DNA que codifica para la resistencia a espectinomicina. El análisis de las mutantes simultáneas en dos de las tres regiones nif, demostró que los genes nifH y nifD se encuentran formando parte de un mismo operón, tanto en la región nif a como en la nif b, y que la fijación de nitrógeno se mantiene con solo una de estas dos regiones intacta (Segovia 1985).

La regulación de la transcripción de los genes de la nitrogenasa en este organismo ha sido poco estudiada. El análisis de la secuencia nucleotídica de los extremos 5' de los genes nifH demostró que los tres tienen la secuencia consenso característica de los promotores de los genes nif de K. pneumoniae (Beynon et al 1982; Ow et al 1983), mientras que la secuencia requerida para la activación por el producto de nifA, solo se encontró en las regiones nif a y nif b, y ésta se localiza en la parte en la que las secuencias de estas dos regiones divergen de la tercera (Buck et al 1986). Por otra parte, en este laboratorio se aislaron mutantes por inserción de Tn5 que alteran simultáneamente la asimilación de amonio y

la fijación de nitrógeno, por lo que no se descarta que pueda existir un mecanismo de control genético que involucre a ambas funciones (Morett et al 1985).

La reiteración de los genes de la nitrogenasa no es exclusiva de R. phaseoli; recientemente se han encontrado secuencias reiteradas que contienen genes nif en varios organismos, por ejemplo Rhodopseudomonas, Anabaena, Calothrix, Clostridium y también en algunas cepas de Rhizobium (Scolnick y Haselkorn 1984, Rice et al 1982, Kallas et al 1983, Chen et al 1985; Morrison et al 1983; Prakash y Atherly 1984; Martínez et al 1985). El análisis de mutantes de Rhodopseudomonas capsulata en las reiteraciones de los genes de la nitrogenasa demostró que solo una de las copias se expresa, puesto que con una sola mutación se obtienen cepas incapaces de fijar nitrógeno. De las mutantes anteriores se obtuvieron revertantes  $fix^+$ , lo que viene a demostrar que en condiciones normales solo una de las copias de las reiteraciones es funcional (Scolnick y Haselkorn 1984).

La presencia de secuencias reiteradas de DNA es una característica general de los genomas de los organismos eucariotes, en contraste, los genomas de las células procariotes contienen secuencias únicas de DNA y solo han sido reportados algunos casos de genes presentes en más de una copia. Los genes reiterados de la nitrogenasa de R. phaseoli constituyen uno de los pocos casos de reiteración génica en procariotes y son un buen ejemplo para estudiar la expresión de familias génicas en procariotes.

En el presente trabajo se estudia la expresión individual de cada una de las tres copias del gene nifH de la cepa CE3 de R. phaseoli, mediante la construcción in vitro de fusiones de estos al gene lacZ de E. coli. El estudio de la expresión de varios genes de los que se desconoce la función del producto

para el cual codifican, o cuya detección es difícil de realizar, ha sido llevada a cabo mediante la construcción de fusiones génicas en las que un gene cuyo producto sea de fácil determinación, se integra de tal manera que su expresión queda bajo el control de las señales de transcripción del gene en estudio. El gene lacZ de E. coli ha sido ampliamente utilizado para la construcción de fusiones génicas, puesto que el ensayo para la determinación de su producto, la B-galactosidasa, es muy sensible y rápido (Casadaban y Cohen 1979).

Los experimentos llevados a cabo en R. phaseoli citados anteriormente, demuestran que por lo menos las copias de nifH presentes en las regiones nif a y nif b son funcionales, pero se desconoce si la tercera reiteración se transcribe. Por otra parte el grado de expresión de cada una de ellas no ha sido determinado y no se sabe si esta puede ocurrir simultáneamente. Por medio de la construcción de fusiones nifH::lacZ en las tres reiteraciones se puede determinar la funcionalidad de estos genes y también es posible determinar si existe expresión simultánea, puesto que la transcripción de una de las reiteraciones se puede determinar por actividad de B-galactosidasa y la otra o las otras midiendo la fijación de nitrógeno.

## MATERIAL Y METODOS.

**CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS:** Las cepas bacterianas y los plásmidos construidos y utilizados en este trabajo están descritos en la Tabla 1. y la 2.

**CONDICIONES DE CULTIVO:** Para el crecimiento de todas las cepas de Rhizobium phaseoli se utilizó medio rico PY (Peptona de Caseína al 0.5%, Extracto de Levadura al 0.3% y CaCl<sub>2</sub> 7mM) (Noel et al 1984.). Para el crecimiento de Escherichia coli se usó medio LB (Peptona de Caseína al 1.0%, Extracto de Levadura al 0.5% y NaCl al 1.0%). Para los medios sólidos se empleó además agar al 1.5%. La concentración de antibióticos en PY fue la siguiente: Estreptomicina, Sm 200ug/ml, Espectinomicina Sp 100 ug/ml, Acido Nalidíxico, Nal 20 ug/ml, Kanamicina, Kan 30 ug/ml, Gentamicina, Gm 10ug/ml, Neomicina, Neo 60 ug/ml, Cloramfenicol, Cm 10-50 ug/ml y Tetraciclina, Tc 0.75-3.0 ug/ml. La concentración de antibióticos en LB fue de: Tc 10ug/ml, Cm 50ug/ml, Sp 100ug/ml, Nal 20ug/ml, Kan 30ug/ml, Ampicilina, Amp 50ug/ml. La temperatura de crecimiento para R. phaseoli fue de 30°C y de 37°C para E. coli. Los cultivos en medio líquido fueron agitados a 250rpm durante 16 a 24hrs y los cultivos en medio sólido fueron incubados hasta observar colonias aisladas (aproximadamente 3 días para R. phaseoli y de 18 a 24hrs para E. coli).

Las conjugaciones se hicieron sobre PY sólido mezclando en una relación de receptoras/donadoras de 5-10/1. La mezcla se recuperó en MgSO<sub>4</sub> 10mM después de un mínimo de 16hrs de incubación para posteriormente platear las diluciones adecuadas en los medios selectivos.

**PURIFICACION Y ANALISIS DE PLASMIDOS RECOMBINANTES:** Los plásmidos recombinantes fueron purificados por el método de "lisis alcalina" (Maniatis et al 1982). Para su análisis fueron digeridos con la enzima requerida y los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en Buffer Tris-Acetatos a 75V por cuatro horas.

**TRANSFORMACION CON PLASMIDOS RECOMBINANTES:** Para las transformaciones con plásmidos recombinantes fueron utilizadas las cepas HB101 y MC1061 como receptoras. Estas cepas fueron crecidas en 50ml de LB hasta alcanzar una densidad óptica de

0.600 a 650nm. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 8,000rpm a 4°C, lavadas con NaCl 10mM y resuspendidas en 50ml de Buffer de Transformación (75mM CaCl<sub>2</sub>, Tris-HCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM pH 7.4), se incubaron por 20min en hielo y fueron resuspendidas en 2ml de Buffer de Transformación. Las bacterias así tratadas se congelaron a -70°C hasta el momento de su utilización. Para la transformación se agregó 0.5ug del DNA en 100ul de Buffer de Transformación a 200ul de células competentes y se dejaron por 1 hora en hielo. Después de este tiempo, se les dió un choque de calor a 42°C por 1min, se pasaron a un tubo con 3ml de LB y se dejaron expresando por 3hrs para posteriormente platear 0.1ml en medio selectivo.

CONSTRUCCION DE LAS MUTANTES: Las cepas que llevan fusionados los genes nifH con lacZ fueron construidas mediante la inserción "in vitro" de un cassette que codifica para la enzima B-galactosidasa de E. coli y para la resistencia a los antibióticos Kan/Gm y Sp<sup>r</sup> (Guido de Boss no publicado). Los plásmidos construidos de esta manera fueron introducidos por conjugación a R. phaseoli y puesto que su origen de replicación proviene del plásmido ColE1, no son estables en este organismo, por lo que las transconjugantes que contienen la resistencia al marcador del cassette son recombinantes del vector intermediario con la región silvestre. Las clonas que llevan solo el marcador del cassette y no el del plásmido intermediario son dobles recombinantes que intercambiaron la región silvestre por la mutada.

EXTRACCION DE DNA TOTAL Y CONDICIONES DE DIGESTION: Para la obtención del DNA total de las cepas de R. phaseoli, se tomaron 1.5ml de un cultivo saturado crecido en PY, se colectaron las células por centrifugación, fueron lavadas con 1ml de TE (Tris 50mM, EDTA 20mM pH 8.0) y resuspendidas en 0.4ml de TE. Las células fueron lisadas al agregar 50ul de SDS al 10% y 100ul de Pronasa 5mg.ml, al cabo de 1 hora de incubación a 37°C, el lisado se pasó tres veces por una jeringa para reducir la viscosidad y fue extraído 3 veces con Fenol Cloroformo Isoamílico (24-24-1) equilibrado en TE, 2 veces con Cloroformo Isoamílico (24-1) y el DNA se precipito agregando NaCl 5M hasta alcanzar una concentración final de 0.25M y dos volúmenes de Etanol absoluto; la mezcla anterior se puso a -20°C y posteriormente se centrifugó en microfuga por 5min, la pastilla fue lavada 2 veces con Etanol al 70%, secada al vacío y se resuspendió en agua estéril. Para la digestión del DNA se usó la enzima requerida a una concentración aproximada de 4U/ug de DNA y la reacción se dejó toda la noche a 37°C en los Buffers estandar para cada enzima (Amersham).

Para la obtención de DNA de bacteroides, se homogenizaron

suavemente 100mg de nódulos en 1ml de Buffer A (Quinto et al 1985), se lava el tubo del homogenizador con otros tres ml del mismo Buffer y el homogenado se centrifuga 10min a 1,500rpm en tubos corex. El sobrenadante con los bacteroides se transfiere a otro tubo y se le agrega 1 volumen igual de Polivinil Pirrolidona insoluble al 10% en Buffer A, se mezcla perfectamente y nuevamente se centrifuga 10min a 1,500rpm. Se toma el sobrenadante libre de polifenoles y se centrifuga a 8,000rpm por 10min para coleccionar los bacteroides. A partir de este punto se procede a la extracción de DNA como en el caso de los cultivos en medio líquido.

**HIBRIDIZACION DE SECUENCIAS DE DNA CON DETECTORES ESPECIFICOS:**  
Para llevar a cabo los experimentos de hibridización de ácidos nucleicos, el DNA digerido fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1.0% en Buffer Tris Acetatos y transferido a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a lo reportado por Southern (Southern 1975). Los plásmidos utilizados como detectores de hibridización fueron marcados con (32P)CTP siguiendo el método de "nick translation" (Rigby et al 1977), agregándolos a la mezcla de hibridización de  $10 \times 10^{-6}$  cpm por gel. La hibridización se llevó a cabo de 12 a 24hrs a 65°C y los filtros fueron lavados de acuerdo a lo reportado por Quinto et al (Quinto et al 1982). Las autorradiografías fueron expuestas a -70°C con placas intensificadoras el tiempo necesario para detectar la hibridización (de uno a ocho días).

**DETERMINACION DE LA NODULACION Y DE LA FIJACION DE NITROGENO:**  
Para todas las determinaciones de fijación de nitrógeno y de actividad en nódulo de B-galactosidasa, se inocularon semillas germinadas de frijol cv "Negro Jamapa" con las distintas cepas de *R. phaseoli*. Las semillas se lavaron con agua y se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas 10min en una solución de Hipoclorito de Sodio al 1.0% y lavando varias veces con agua estéril. Antes de ser inoculadas, las semillas fueron pregerminadas a 30°C en la oscuridad por tres días. Las semillas así germinadas fueron transferidas a matraces Erlenmeyer de 250ml conteniendo 150ml de solución salina sin nitrógeno (Wacek 1976) en agar al 0.8% o bien a macetas con agrolita húmeda previamente esterilizada e inoculadas con 1ml de un cultivo saturado lavado en MgSO<sub>4</sub> 10mM. Las plantas en matraces Erlenmeyer fueron crecidas en una cámara de cultivo vegetal a 25°C con una humedad del 50 al 80%, mientras que las plantas crecidas en macetas permanecieron en el invernadero a no más de 30°C. Las plantas del invernadero se regaron dos veces por semana con 100ml de agua estéril y una vez por semana con el mismo volumen de solución salina.

La actividad de la nitrogenasa fue determinada en los nódulos adheridos a las raíces de las plantas o separados de ellas. Las raíces o los nódulos se cortaron y fueron introducidos en frascos de 15ml con tapón de hule e inmediatamente se les

inyectó 0.5 ml de acetileno y la reacción se dejó correr una hora. La producción de etileno se determinó por cromatografía de gases.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA B-GALACTOSIDASA: La actividad de la B-Galactosidasa fue determinada en nódulos y en cultivo líquido de la siguiente manera: se homogenizaron aproximadamente 20mg de nódulos en mortero agregandoles 1ml de Buffer Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM, Mercaptoetanol 50mM pH 7.0), o se colectaron por centrifugación 1ml de cultivo líquido y se resuspendió en 1ml del mismo Buffer; se transfirieron a tubos eppendorf y las bacterias fueron lisadas agregando 0.1ml de SDS al 10% y 0.1ml de Cloroformo mezclando vigorosamente por 15seg. en vortex. El lisado se centrifugó 5min a 4°C y el sobrenadante se recolectó en otro tubo. La reacción se llevo a cabo tomando 0.2ml del extracto anterior, 0.8ml de Buffer Z y 0.2ml de ONPG 4mg/ml en Buffer fosfatos (mezclar 61 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50mM con 39ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM). El curso de la reacción se registro cada 30seg. determinando la D.O. a 420nm.

DETERMINACION DE PROTEINA: Para calcular las actividades específicas de B-Galactosidasa de los ensayos efectuados, fue determinada la concentración de proteína de los extractos por el método de Lowry (Lowry et al 1951).



## RESULTADOS

En R. phaseoli los genes que codifican para la nitrogenasa se encuentran reiterados en un megaplásmido de 200 Kb en tres regiones distintas denominadas nif a, b y c. Con el fin de determinar la expresión individual de los genes reiterados de la nitrogenasa se construyeron, por medio de técnicas de mutagénesis dirigida, plásmidos con fusiones de los genes nifH con el gene lacZ de E. coli. Estas mutaciones fueron introducidas a R. phaseoli mediante técnicas de genética reversa por movilización de plásmidos suicidas y selección de dobles recombinantes.

### SUBCLONACION DE LAS REGIONES nif a, b Y c EN pSUP205.

Hasta el momento no ha sido descrito ningún sistema de transformación eficiente para Rhizobium, por tal motivo es necesario construir las mutaciones que se pretendan reintroducir a R. phaseoli en un vehículo capaz de ser conjugado o movilizado pero que no pueda replicarse autónomamente en este organismo. Un plásmido que cumple con las características requeridas es el pSUP205; este plásmido es un derivado del vehículo de clonación pBR325 que contiene clonado el sitio Mob del plásmido RP4, lo cual le confiere la capacidad de ser movilizado de una cepa a otra utilizando un plásmido ayudador que le complemente las funciones de transferencia necesarias para la conjugación.

Las tres regiones nif de la cepa CE3 de R. phaseoli habían sido

clonadas previamente en el laboratorio (Quinto et al 1982). Los plásmidos pCQ15, pCQ12 y pCQ23 son derivados del pBR329 que llevan clonadas en el sitio EcoRI las regiones nif a, b y c de 4.7, 4.1 y 4.5 Kb respectivamente. Los plásmidos pCQ15 y pCQ23 fueron digeridos con EcoRI y ligados al plásmido pSUP205; las transformantes Tc<sup>r</sup>, Cm<sup>s</sup> fueron objeto de un análisis de restricción de los plásmidos que contenían y de esta manera se obtuvieron los plásmidos pEM15 y pEM23. La orientación de los fragmentos clonados es indistinta para los fines requeridos, pero era necesario conocerla ya que la clonación futura del cassette lacZ si requiere de orientación precisa y solo se puede determinar conociendo de antemano la orientación de la primera clonación. Haciendo digestiones de los plásmidos pEM15 y pEM23 se determinó la orientación que es la que se muestra en las figuras 2 y 3. De manera similar, la región nif b, clonada en el plásmido pCQ12, fue subclonada en el sitio HindIII del plásmido pSUP205 interrumpiendo el gene de resistencia a Tetraciclina; de las transformantes Cm<sup>r</sup>, Tc<sup>s</sup> se obtuvo una cepa con un plasmido que al ser digerido con HindIII se generan dos bandas que corresponden al vehículo (7.9 Kb) y al inserto nif b (1.7 Kb); la orientación del inserto en este plásmido denominado pEM12 fue determinada digiriendolo con BamHI (Fig. 4).

#### CONSTRUCCION DE LAS FUSIONES GENICAS.

Una vez que se tuvieron las tres regiones nif clonadas en un plásmido movilizable, se les introdujo un cassette lacZ en la región codificadora de nifH. Para la construcción de las fusiones génicas se utilizó un plásmido que lleva clonado al gene lacZ de E. coli sin su región promotora pero que conserva el sitio de unión a ribosomas, por lo que es posible construir fusiones génicas sin que resulten proteínas híbridas. Este plásmido, denominado pGS100, es un derivado del plásmido pBR322 que contiene además los genes de resistencia a Sp y a Kan/Gm,

flanqueados junto con lacZ por sitios de BamHI, de tal manera que puede ser utilizado como un cassette BamHI para la construcción de fusiones génicas puesto que las resistencias a antibióticos que posee permiten hacer una fácil selección de las clonas que lo contienen integrado (Guido de Boss no publicado).

La secuencia nucleotídica de los tres genes nifH ha sido determinada previamente (Quinto et al 1985). En base a los datos obtenidos de ella se ha podido determinar que en el codón 147 de la región codificadora de estos genes existe un sitio de restricción para la enzima BglII, el cual es ideal para la construcción de las fusiones por inserción del cassette lacZ, puesto que las enzimas BamHI y BglII dejan extremos cohesivos. Por otra parte, este sitio de restricción es el único sitio de reconocimiento para esta enzima en los plásmidos pEM15 y pEM12 y en el plásmido pEM23 solo hay otro sitio para BglII que mapea a 0.5 Kb aproximadamente hacia la región 5' del inicio de la traducción de nifH. Los plásmidos pEM15 y pEM12 fueron digeridos con BglII totalmente, mientras que el plásmido pEM23 fue digerido por un tiempo limitado para obtener un solo corte en la molécula. Por otra parte, el plásmido pGS100 fue digerido completamente con BamHI y ligado a cada una de las digestiones anteriores. Para el caso de los plásmidos pEM15 y pEM23, se seleccionaron las transformantes Tc<sup>r</sup>, Sp<sup>r</sup>, Amp<sup>s</sup>. De las transformantes obtenidas de la reacción de ligasa con el plásmido pEM12 se seleccionaron aquellas que tuvieran los siguientes marcadores: Cm<sup>r</sup>, Sp<sup>r</sup> y Amp<sup>s</sup>.

El análisis de las tranconjugantes anteriores permitió la selección de los plásmidos con las fusiones en las tres regiones nif y en ambas orientaciones. Al digerir el plásmido con la región nif a con EcoRI, la fusión en la orientación adecuada genera cuatro fragmentos de restricción: uno de 1.8 Kb, interno al cassette lacZ; otro de 7.9 Kb, que corresponde

al pSUP205; el tercero de 5.3 Kb, con lacZ y la región 5' del gene nifH; y un cuarto fragmento de 5.5 Kb con la región 3' del mismo gene. Este plásmido se denominó pEM151 (Fig. 2). Por otra parte, el plásmido pEM115 es el que lleva clonado el cassette lacZ en la orientación inversa, al ser digerido con EcoRI resultan cuatro fragmentos de restricción; uno de 3.6 Kb, con la región 5' de nifH; otro de 7.2 Kb con la región 3' y el gene lacZ; y los dos comunes a ambas orientaciones que son los de 1.8 y 7.9 Kb (Fig. 2). Las clonas con la fusión en la región nif c al ser digeridas con EcoRI/BglIII dan tres fragmentos comunes de 7.9 Kb; 1.8 Kb y 0.9 Kb; la clona en la orientación correcta, denominada pEM231, contiene además dos fragmentos; uno de 5.1 Kb con lacZ y la región 5' de nifH c, y otro de 4.6 Kb con la parte 3' del mismo gene (Fig. 3); mientras que en la clona inversa, pEM123, los dos fragmentos que varían son de 6.3 Kb, con lacZ en 3' de nifH y de 3.5 Kb con la región 5' del mismo gene (Fig. 3). Los plásmidos contruídos al clonar el cassette lacZ en la región nif b contienen tres sitios de restricción de EcoRI; el plásmido pEM121 contiene la fusión en la orientación adecuada y los patrones de digestión revelan un fragmento de 7.6 Kb con lacZ y el extremo 5' de nifH, otro de 8.2 Kb con el extremo 3'; y un tercero de 1.8 Kb, que es el fragmento interno del cassette lacZ (Fig. 4); el plásmido pEM112 tiene además del fragmento de 1.8 Kb, uno de 9.7 Kb con lacZ en 3' de nifH y otro de 6.1 Kb con la región 3' y parte del plásmido intermediario (Fig. 4).

#### CONSTRUCCION DE LAS CEPAS nifH::lacZ

Las fusiones contruídas en los genes nifH, fueron introducidas a la cepa CE3 por movilización de los vectores intermediarios descritos anteriormente. El plásmido pR K2013 se utilizó como ayudador para la movilización de las fusiones a Rhizobium. Este plásmido es un derivado del plásmido ColE1 que lleva todas las funciones de transferencia del plásmido RP4, teniendo de esa manera la capacidad de movilizar a todos los plásmidos

que tengan ese mismo sitio Mob por complementación de las funciones conjugativas en trans.

Una vez introducidos los vectores intermediarios a la cepa CE3, fueron seleccionadas las clonas resistentes a Sp (codificada por el cassette lacZ) en medio conteniendo además ácido nalidíxico para contraseleccionar a las cepas de E. coli. Los vehículos intermediarios, al tener únicamente el sitio de replicación de ColE1, no se pueden mantener estables de manera independiente, por lo que las clonas Sp<sup>r</sup> necesariamente tuvieron que haber recombinado con las regiones silvestres. A las clonas Sp<sup>r</sup> se les determinó la resistencia a Tc, o en el caso de las inserciones en la región nif b, la resistencia a Cm. Las clonas que son dobles recombinantes, es decir, aquellas que intercambiaron la región silvestre por la región mutada, no llevan el marcador del pSUP205. La frecuencia de aparición de las dobles recombinantes fue de 0.1-0.01% en relación a las recombinantes sencillas.

El genotipo de las clonas con los marcadores característicos de las dobles recombinantes fue confirmado por medio de experimentos de hibridización tipo Southern, utilizando como detector un fragmento interno del gene nifH de la cepa CE3.

Cada una de las clonas anteriores fue purificada y crecida en medio líquido para obtener el DNA total. El DNA fue purificado y digerido con BamHI, y los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El DNA fue transferido a membranas de nitrocelulosa y los filtros fueron hibridizados contra un fragmento de 540pb que contiene el extremo 3' del gene nifH de la CE3. En la parte A de la figura 5 se muestran los perfiles de hibridización de las cepas CE3, así como las clonas recombinantes construidas a partir de los plásmidos que llevan la región nif a con la fusión lacZ en cada una de las orientaciones. En la cepa CE3 se revelan con este detector tres bandas de hibridización de 9.8, 5.6 y 4.0

Kpb, que representan a las regiones nif a, nif b y nif c respectivamente; en los carriles b y c, que contienen los fragmentos de restricción de las cepas EM407 y EM409, se observa que la banda correspondiente a la región nif a no aparece, pero se aprecia una nueva banda de hibridización de 17.7 Kpb, que es la suma del fragmento de restricción de la región nif a y del cassette lacZ (como el cassette BamHI con lacZ fue clonado en BglII, se crea un sitio híbrido que no es reconocido por ninguna de las dos enzimas). En la parte B de la misma figura esta la clona construida por recombinación del plásmido pEM121, con la capa CE3 el cual contiene la región nif b con el cassette lacZ en la orientación precisa; esta cepa, denominada EM410 (carril e), muestra las bandas correspondientes a las regiones nif a y c, así como una banda de 13.5 Kpb, que es el híbrido de la región nif b con lacZ. Por último, en la parte C de la misma figura se muestran los perfiles de hibridización de las cepas EM403 (carril g) y EM406 (carril h), construidas por recombinación de los plásmidos pEM231 y pEM123 con la CE3; en estas cepas se puede apreciar que el cassette lacZ recombinó con la región nif c, dando como resultado la desaparición de la banda de 4.0 Kpb y la generación de una nueva banda de 11.9 Kpb.

#### CONSTRUCCION DE DOBLES MUTANTES EN LOS GENES nifH.

Por otra parte, también fueron construidas cepas con inserciones en dos de las tres copias de los genes nifH. Estas cepas fueron construidas por conjugación del plásmido pJL115 a la cepa EM403. Este plásmido tiene clonado el fragmento EcoR1 de la región nif a con una inserción del cassette Kan/Neo en el gene nifH. El análisis de las dobles mutantes permitió la selección de cepas en las que el plásmido recombinó tanto en su región original, como en la región nif b; estas cepas fueron denominadas EM411 y EM412 (Fig. 6).

## LOCALIZACION FISICA DEL CASSETTE lacZ.

En la figura 7 se muestra la hibridización del DNA de las dobles recombinantes en las regiones nif a y c contra el plásmido pGS100. Estas hibridizaciones demuestran que el incremento en el tamaño de las bandas de las regiones nif en las diferentes mutantes, es el resultado de la integración del cassette lacZ, y que éste se encuentra en una copia.

Las hibridizaciones con el plásmido pGS100 revelan también cuatro bandas de aproximadamente 6.5, 5.0, 4.0 y 0.8 Kpb, inclusive en la cepa silvestre, indicando que en R. phaseoli existen secuencias homólogas a lacZ.

## FENOTIPO SIMBIOTICO DE LAS MUTANTES.

Para determinar el fenotipo simbiótico de las mutantes, se inocularon plantas de frijol de la variedad "Negro Janapa" de tres días de germinadas con cada una de las cepas a probar. En la Tabla 4 se observan los resultados de un experimento llevado a cabo con plantas crecidas en cámara de cultivo. La fijación de nitrógeno y la actividad de la B-galactosidasa de los nódulos fue determinada a los 15 días después de la infección. El ensayo de reducción de acetileno fue positivo para todas las cepas estudiadas. En vida libre, tanto la cepa CE3 como las fusiones nifH::lacZ, independientemente de la orientación, tienen una actividad muy baja de B-galactosidasa (Tabla 3), sin embargo, en los nódulos la actividad de esta enzima en todas las mutantes es superior al encontrado para la cepa silvestre, independientemente de la orientación en la que se encuentre insertado el cassette lacZ. En las cepas EM409, EM413 y EM406, en las que el cassette se encuentra en la orientación inversa, la actividad de B-galactosidasa se incrementa aproximadamente cinco veces en relación a la CE3, mientras que la actividad de

las cepas EM407 y EM403, en las que la transcripción de lacZ depende de los promotores nifH, aumenta de manera más significativa (Tabla 4).

Las propiedades simbióticas de las mutantes nifH::lacZ también fueron determinadas en plantas crecidas en macetas en el invernadero. En la Tabla 5 se muestran los resultados de un experimento en el que las plantas fueron cosechadas a los 15, 18 y 23 días después de la infección. Todas las plantas infectadas con cada una de las mutantes analizadas, desarrollaron nódulos que fueron positivos en el ensayo de nitrogenasa. Al igual que en el experimento de la Tabla 4, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las cepas con la inserción del cassette lacZ en la orientación inversa fue superior que el encontrado para la CE3, pero significativamente inferior que en los casos de las inserciones en la orientación precisa. En estos experimentos se puede observar que la transcripción de lacZ a partir de los promotores nifH, se incrementa al aumentar los días de infección de las raíces por las bacterias.

El patrón de resistencia a antibióticos, así como el genotipo de los bacteroides aislados de los nódulos obtenidos en los experimentos anteriores fueron determinados. Después de esterilizar la superficie de los nódulos, se recuperaron las bacterias y éstas fueron crecidas en PY para posteriormente checar los patrones de resistencia a antibióticos de varias colonias aisladas. El 100% de las colonias analizadas conservaron su patrón de resistencia característico. Por otra parte, se purificó una fracción de nódulo enriquecida para bacteroides y el DNA fue purificado. En las figuras 8, 9 y 10 se muestran los experimentos donde los fragmentos de digestión generados con BamHI fueron hibridizados con el fragmento interno de nifH. El patrón de bandas de hibridización del DNA de los bacteroides extraídos de los nódulos de los experimentos anteriores, no mostró ninguna diferencia al genotipo



determinado para las cepas en vida libre, excepto en la recombinantes de la región *nif* c (ver discusión).

## DISCUSION

La reiteración de secuencias genómicas ha sido considerada como una generalidad en las células eucarióticas, estas secuencias comprenden tanto a regiones transcripcionalmente activas, como a familias repetidas carentes de genes funcionales. Por otra parte, el genoma de los organismos procariotes está costituido exclusivamente por secuencias únicas y la reiteración de zonas del genoma ha sido reportada en muy pocos organismos (ver introducción).

La reiteración de los genes nif de R. phaseoli es uno de los pocos ejemplos bien documentados de genes repetidos en procariotes (Quinto et al 1982, 1985, Martínez et al 1986) y constituyen un buen ejemplo para estudiar la regulación transcripcional de familias genómicas en procariotes.

En este trabajo se estudia la expresión independiente de cada uno de los tres genes nifH de la cepa CE3 de R. phaseoli. La homología de estos genes es completa y abarca más de 100pb de la región promotora, estando presentes en las tres copias la secuencia consenso reportada para los genes nif de varios organismos, más no así la secuencia recientemente reportada necesaria para la activación por el producto de nifA; esta secuencia solo se encuentra en las regiones nif a y nif b (ver introducción). Estos resultados sugieren que probablemente la expresión de las tres reiteraciones no sea idéntica, puesto que no comparten todas las señales de activación. El análisis de las mutantes construidas previamente en los genes nif de la cepa CE3, demostraron la funcionalidad de los genes nifH de las regiones a y b, sin embargo la funcionalidad de la tercera reiteración no fue demostrada, puesto que en esta región solo

está presente el gene nifH y la expresión de ésta no puede ser monitoreada por actividad de nitrogenasa.

La estrategia seguida en este trabajo para analizar la expresión individual de las regiones nif, fue la construcción in vitro de fusiones génicas en las que el gene lacZ de E. coli queda bajo el control de las señales de transcripción de cada uno de los genes nifH. En las figuras 5 y 6 se muestra la construcción de las fusiones lacZ en cada una de las tres regiones nif, y en la figura 7 se demuestra que el cambio en el tamaño de los fragmentos de restricción es el resultado de la integración del cassette lacZ en la región correspondiente. El análisis del fenotipo simbiótico de las dobles recombinantes demostró que al igual que lo reportado por Quinto et al 1985 y Segovia 1985, las cepas con mutaciones en una o en dos de las regiones nif, siempre y cuando se respete la total integridad de las regiones nif a o nif b, retienen la capacidad de fijar nitrógeno.

En todas las mutantes, la actividad de B-galactosidasa en vida libre es muy similar a la que presenta la cepa silvestre (Tabla 3); sin embargo, cuando el ensayo se lleva a cabo con extractos de nódulo, las cepas que llevan el cassette lacZ en la orientación precisa llegan a tener hasta 300 veces mayor actividad que los nódulos de la cepa silvestre (Tablas 4 y 5). La actividad en los nódulos de las cepas con la inserción inversa también es superior al valor de la CE3, aunque significativamente más bajo que en la orientación adecuada; esta actividad parece ser el resultado de una pequeña síntesis de escape carente de regulación.

Los resultados anteriores indican que en las cepas con el cassette lacZ en la orientación correcta, la actividad de B-galactosidasa depende de las señales de transcripción propias de los genes nifH y que las tres copias de este gene se expresan en nódulo.

La diferencia en la actividad de B-galactosidasa encontrada en las distintas cepas puede estar ocasionada por un desfaseamiento en el crecimiento, y no en una real diferencia en la expresión de las tres regiones, ya que los valores encontrados para una misma fusión, como el caso de las cepas EM411 y EM412 tienen un amplio rango de variación. Para poder determinar si efectivamente existe una diferente expresión de cada una de las tres regiones *nif*, es necesario construir nuevamente cada una de las fusiones, de tal manera que el fenotipo pueda ser atribuido a la inserción y no como una característica de la clonación particular, puesto que se ha observado repetidamente que al clonar ciertas cepas de *R. phaseoli*, entre ellas la CE3, la organización de algunas secuencias genómicas aparecen alteradas (Flores et al sometido a publicación).

Por otra parte, el hecho de que en ninguna de las tres fusiones se pierda la capacidad de fijar nitrógeno indica que la expresión de los genes *nif* es simultánea, puesto que la transcripción de uno se observa por actividad de nitrogenasa, y el otro por B-galactosidasa. Asimismo, estos resultados comprueban lo reportado previamente en el sentido de que con una sola de las regiones *nif a* o *nif b* intacta es suficiente para mantener la fijación de nitrógeno.

A pesar de la gran diferencia en los ensayos de reducción de acetileno para plantas infectas con una misma cepa, la tendencia más significativa es que al mutar las regiones *nif a* o *nif b*, se ve disminuida la fijación de nitrógeno (Tablas 4 y 5). Esta disminución en la actividad de la nitrogenasa se refleja en la marcada diferencia en el desarrollo de las plantas. A los 25 días después de la infección, las plantas inoculadas con cualquiera de las cepas que tienen interrumpida las regiones *nif a* o *nif b*, se muestran etioladas y desarrollan mucho menor follaje que las plantas infectadas con la CE3; mientras que las plantas inoculadas con las cepas EM403 o

EM406, no presentan diferencia con la cepa silvestre (Fig. 11). Los resultados anteriores sugieren que si existe un efecto de dosis génica que podría ser la causa de la conservación de la reiteración de los genes de la nitrogenasa.

La carencia de alteración del fenotipo simbiótico de las cepas con mutaciones en la región *nif c*, podría ser el resultado de la creación de una nueva reiteración de *nifH*, puesto que en ellas invariablemente aparece una nueva banda que hibridiza contra el detector específico para este gene. En la figura 12 están las cepas derivadas de las fusiones con el cassette *lacZ* en la región *nif c*; en la parte A de la figura está el DNA de las cepas EM403 y EM406 que, a diferencia de la hibridización de la figura 5, muestran una nueva banda de 5.2 Kpb. Esta nueva banda se observó después de haber purificado las cepas, por lo que debe de ser el resultado de algún tipo de rearrreglo muy específico que además sucede a una muy alta frecuencia, ya que ocurre en ambas cepas. Después de haber observado lo anterior, se construyó nuevamente la cepa con la inserción *lacZ* en *nif c*, y el DNA se analizó inmediatamente después de obtenerla, así como después de crecerla en medio líquido. Como se puede observar en la parte C de la misma figura, en la nueva construcción la banda de 5.2 Kpb aparece después de un ciclo de crecimiento. Asimismo, la cepa EM412 presenta también después de ser purificada una nueva banda de 6.9 Kpb (Fig. 12 B). La diferencia en el tamaño de las bandas generadas tanto en la EM403 como en la doble mutante EM412, es de aproximadamente 1.7 Kpb, lo cual coincide con el tamaño del cassette Kan presente en la última cepa. Si recombinaran las regiones *nif a* y *nif b* y se generara una región híbrida con el extremo 5' de *nif b* y el 3' de *nif a*, los fragmentos de restricción generados serían de 5.2 y de 6.9 Kpb en las cepas EM403 y EM412 respectivamente, lo cual coincide con lo encontrado. Por otra parte, la intensidad relativa de las bandas de hibridización apoyan esta hipótesis puesto que generalmente las bandas de menor intensidad en un mismo carril son la correspondientes a las regiones *nif a*

y nif b, que en caso de llevarse a cabo una recombinación como la arriba mencionada, estas dos bandas tenderían a desaparecer. Si esta recombinación sucede realmente, probablemente ocurra algún cambio en el tamaño del plásmido simbiótico.

Las fusiones construidas en este trabajo pueden servir como una herramienta para el estudio de la regulación de los genes nif, tanto en vida libre como en simbiosis, ya que la expresión de los genes nifH puede ser monitoreada fácilmente por la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, así como por la modificación del análogo de lactosa x-gal, que se metaboliza a un compuesto azul de fácil identificación en placas.

En la figura 13 se muestran esquemáticamente los resultados del presente trabajo.

T A B L A I.

CEPAS BACTERIANAS.

C E P A	CARACTERISTICAS PRINCIPALES	REFERENCIA
<u>Rhizobium phaseoli.</u>		
CE3	Derivada Str <sup>r</sup> de la cepa CFN42.	Noel et al (1983)
EM403	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHc</u> en la orientacion correcta	Este trabajo
EM406	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHc</u> en la orientacion incorrecta	Este trabajo
EM407	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHa</u> en la orientacion correcta	Este trabajo
EM409	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHa</u> en la orientacion incorrecta	Este trabajo
EM410	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHb</u> en la orientacion correcta	Este trabajo
EM413	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHb</u> en la orientacion incorrecta	Este trabajo
EM411	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHc</u> en la orientacion correcta y con el cassette Kan/Neo en el gene <u>nifHa</u>	Este trabajo
EM412	Derivada de la CE3 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en el gene <u>nifHc</u> en la orientacion correcta y con el cassette Kan/Neo en el gene <u>nifHa</u>	Este trabajo
<u>Escherichia coli.</u>		
HB101	<u>recA</u> , <u>hsdR</u> , <u>hsdM</u> , <u>pro</u> , <u>leu</u> , StrA <u>thi</u> , <u>lacY</u> , <u>Endo1</u>	Boyer et al (1969)
MC1061	<u>galU</u> , <u>galK</u> , <u>hsdR</u> , StrA, $\Delta(\underline{ara}, \underline{leu})$ , $\Delta(\underline{IacIPOZYA})\times 74$ .	Casadaban (1980)

T A B L A II.

PLASMIDOS UTILIZADOS Y CONSTRUIDOS PARA ESTE TRABAJO.

PLASMIDO	CARACTERISTICAS PRINCIPALES	REFERENCIA
pRK2013	Derivado de ColE1 con la Región tra del plásmido RK2	Guiney et al (1979)
pSUP205	Derivado del plásmido pBR325 con el sitio Mob del plásmido RP4 y el sitio <u>cos</u> del fago $\lambda$ . Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Amp <sup>s</sup> .	Simon et al (1983)
pGS100	Derivado del plásmido pBR322 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en BamHI.	Guido de Vos. no publicado.
pCQ15	Derivado del plásmido pBR328 con la región nif a de R. <u>phaseoli</u> .	Quinto et al (1982)
pCQ12	Derivado del plásmido pBR328 con la región nif b de R. <u>phaseoli</u> .	Quinto et al (1982)
pCQ23	Derivado del plásmido pBR328 con la región nif c de R. <u>phaseoli</u> .	Quinto et al (1982)
pEM15	Derivado del plásmido pSUP205 con la región nif a de R. <u>phaseoli</u> .	Este trabajo
pEM12	Derivado del plásmido pSUP205 con la región nif b de R. <u>phaseoli</u> .	Este trabajo
pEM23	Derivado del plásmido pSUP205 con la región nif c de R. <u>phaseoli</u> .	Este trabajo
pEM151	Derivado del plásmido pEM15 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en la orientación correcta en el gene <u>nifHa</u>	Este trabajo
pEM115	Derivado del plásmido pEM15 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en la orientación incorrecta en el gene <u>nifHa</u>	Este trabajo
pEM121	Derivado del plásmido pEM12 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en la orientación correcta en el gene <u>nifHb</u>	Este trabajo
pEM112	Derivado del plásmido pEM12 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en la orientación incorrecta en el gene <u>nifHb</u>	Este trabajo
pEM231	Derivado del plásmido pEM23 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en la orientación correcta en el gene <u>nifHc</u>	Este trabajo
pEM123	Derivado del plásmido pEM23 con el cassette <u>lacZ</u> , Sp, Kan/Gm en la orientación incorrecta en el gene <u>nifHc</u>	Este trabajo



T A B L A 3

EXPRESION DE B-galactosidasa EN VIDA LIBRE

C E P A	ACTIVIDAD ESPECIFICA
CE3	2.3
EM407	3.5
EM409	1.5
EM410	2.7
EM413	0.7
EM403	2.5
EM406	1.6
EM411	1.9
EM412	3.6

Las actividades de B-galactosidasa estan expresadas en nM/min/mg prot.

T A B L A 4

EXPRESION DE  $\beta$ -galactosidasa EN NODULO

CEPA	EXPERIMENTO	DIA	ENSAYOS	PROMEDIO <sup>Φ</sup>	V. RELATIVO	F de N <sup>§</sup>
CE3	1	18	1	18.73	1	+
EM407	1	18	1	313.70	16.75	+
EM409	1	18	1	94.99	5.07	+
EM403	1	18	1	1120.52	59.80	+
EM406	1	18	2	94.81	5.06	+
EM411	1	18	1	361.67	19.32	+
EM412	1	18	1	1177.69	62.89	+

<sup>Φ</sup> Las actividades de  $\beta$ -galactosidasa estan expresadas en nM/min/mg prot.

<sup>§</sup> Las actividades de nitrogenasa fueron determinadas por reducci3n de acetileno.

T A B L A 5

EXPRESION DE  $\beta$ -galactosidasa EN NODULO

CEPA	EXP No.	DIA	ENSAYOS	PROMEDIO <sup>Φ</sup>	D. E. <sup>§</sup>	V. RELATIVO	F de N <sup>∞</sup>
CE3	3	15	4	13.63	5.45	1.00	100.0%
EM407	3	15	4	64.63	22.79	4.74	183.2%
EM409	3	15	4	22.00	7.37	1.61	131.5%
EM410	3	15	4	244.04	52.65	17.90	29.0%
EM413	3	15	4	43.42	29.90	3.18	33.9%
EM403	3	15	4	338.04	157.40	24.80	216.8%
EM406	3	15	4	56.37	18.02	4.14	215.8%
EM411	3	15	4	95.11	28.07	6.98	84.0%
EM412	3	15	4	811.89	207.25	59.57	195.8%
CE3	3	18	3	5.2	1.7	1.0	100%
EM407	3	18	4	389.8	245.2	74.9	65.7%
EM409	3	18	3	34.6	6.0	6.6	58.7%
EM410	3	18	4	760.1	357.4	146.1	28.7%
EM413	3	18	4	122.4	65.8	23.5	21.0%
EM403	3	18	4	805.9	405.5	154.9	65.7%
EM406	3	18	4	95.4	52.9	18.3	148.7%
EM411	3	18	4	430.4	162.7	82.8	82.0%
EM412	3	18	4	1596.7	1333.6	307.0	65.3%
CE3	3	23	7	8.1	1.4	1.0	100.0%
EM407	3	23	6	628.9	129.1	77.0	37.0%
EM409	3	23	6	61.0	24.1	7.4	54.0%
EM410	3	23	9	1109.5	268.8	135.9	26.6%
EM413	3	23	1	85.0	0.0	10.4	33.1%
EM403	3	23	6	2464.2	903.6	301.9	219.4%
EM406	3	23	7	229.1	48.6	28.2	49.8%
EM411	3	23	8	643.7	173.5	79.8	40.4%
EM412	3	23	8	2437.2	963.2	298.7	14.3%

<sup>Φ</sup> Las actividades de  $\beta$ -galactosidasa estan expresadas en nM/min/mg prot.

<sup>§</sup> Las actividades de nitrogenasa fueron determinadas por reducci3n de acetileno.

<sup>∞</sup> Desviaci3n estandar.

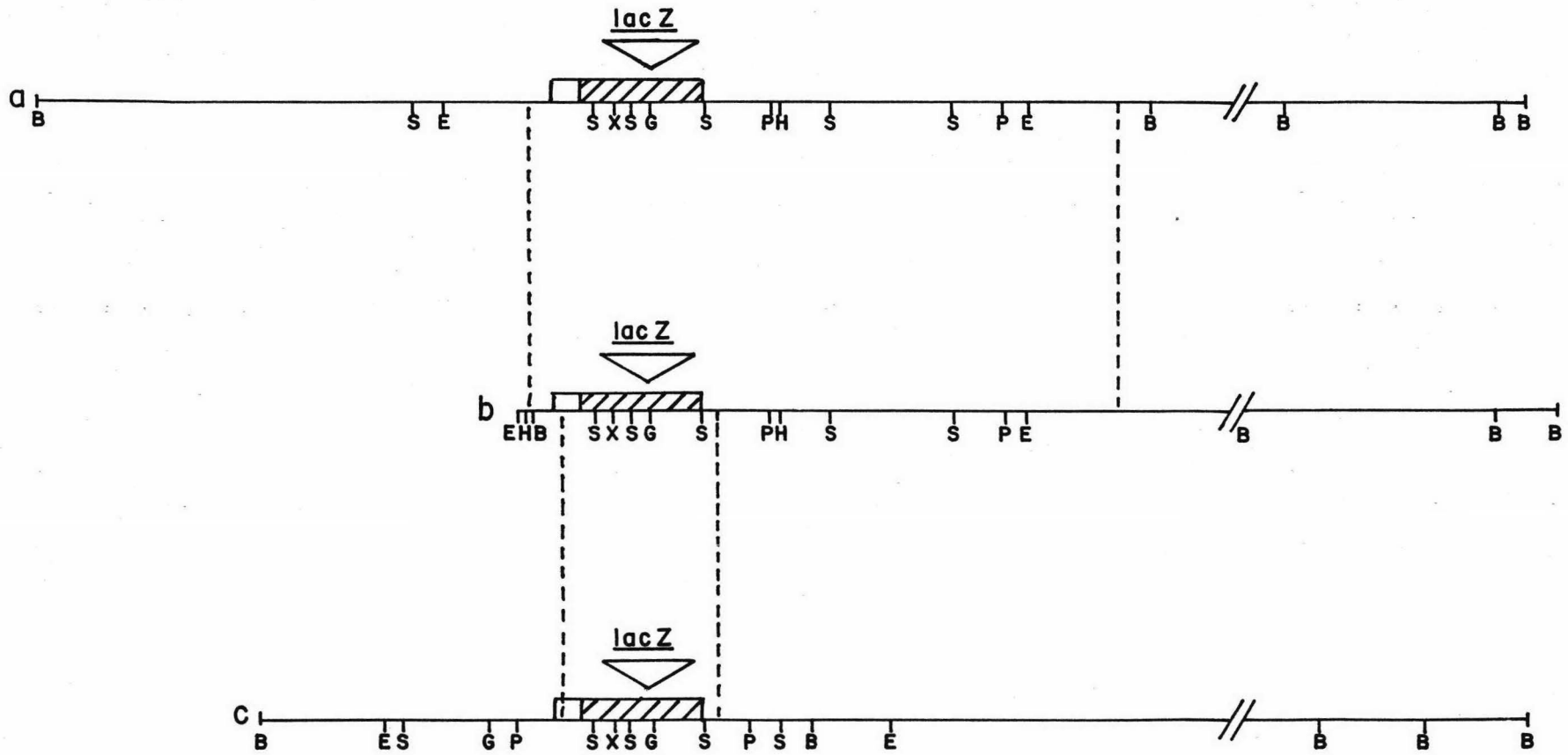


Fig. 1. MAPA DE RESTRICCIÓN DE LAS REGIONES NIF DE LA CEPA CE3. (a) Región nif a, (b) Región nif b, (c) Región nif c. Los sitios de restricción están indicados con letras mayúsculas. Tomado de Quinto et al 1985.

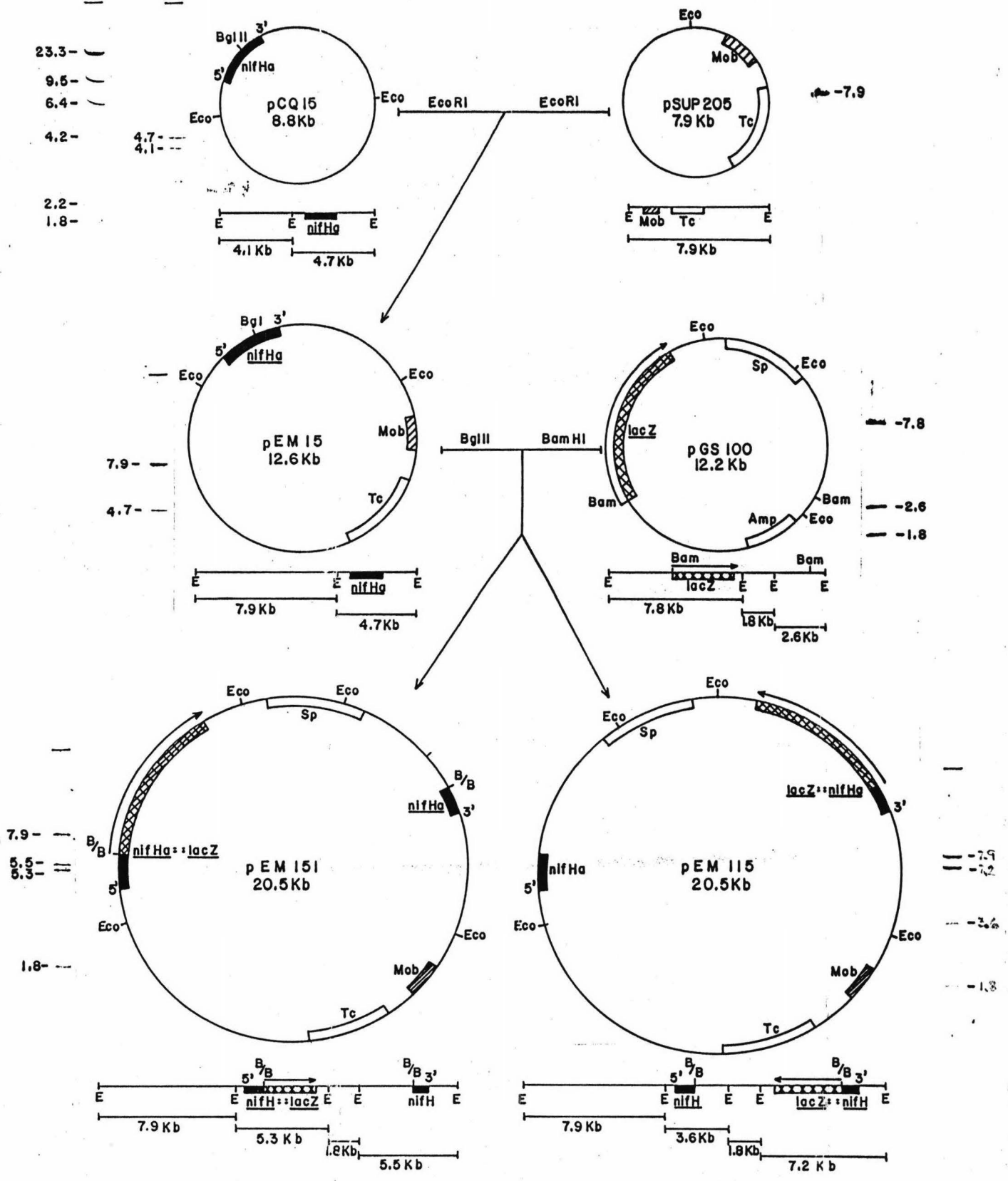


Fig. 2. Construcción de las fusiones nifHa::lacZ.

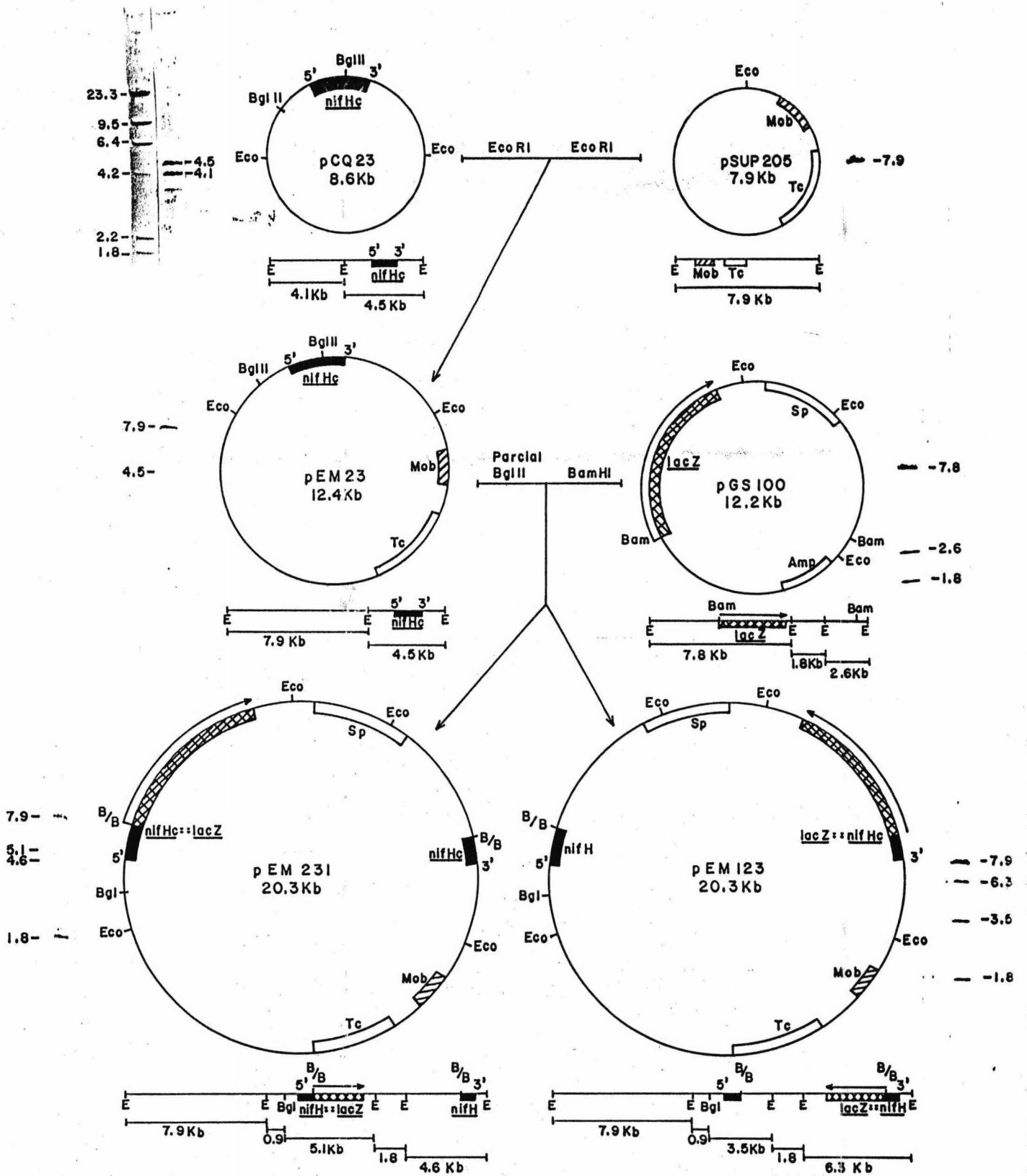


Fig. 3. Construcción de las fusiones *nifHc::lacZ*

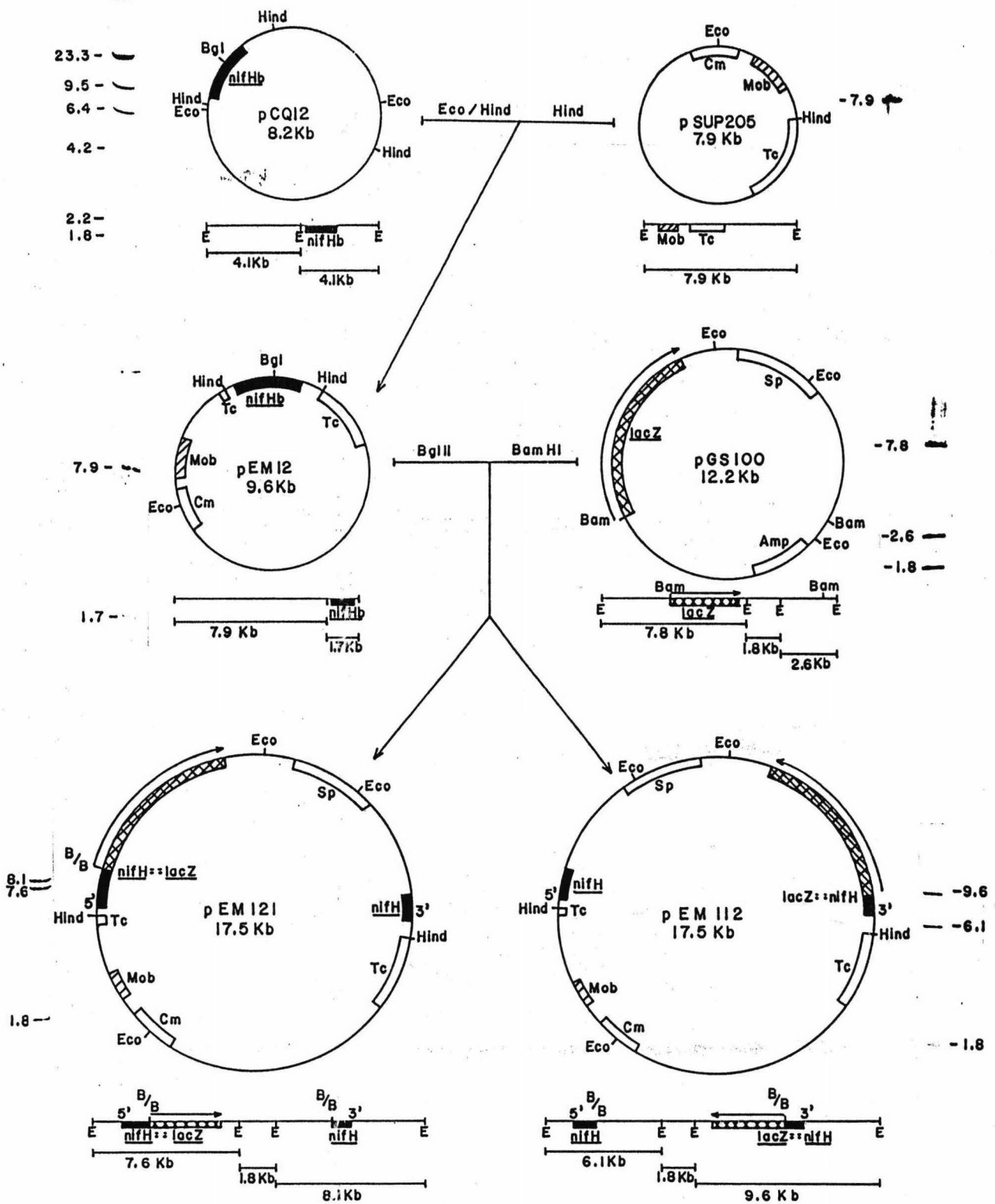


Fig. 4. Construcción de las fusiones *nifHb::lacZ*

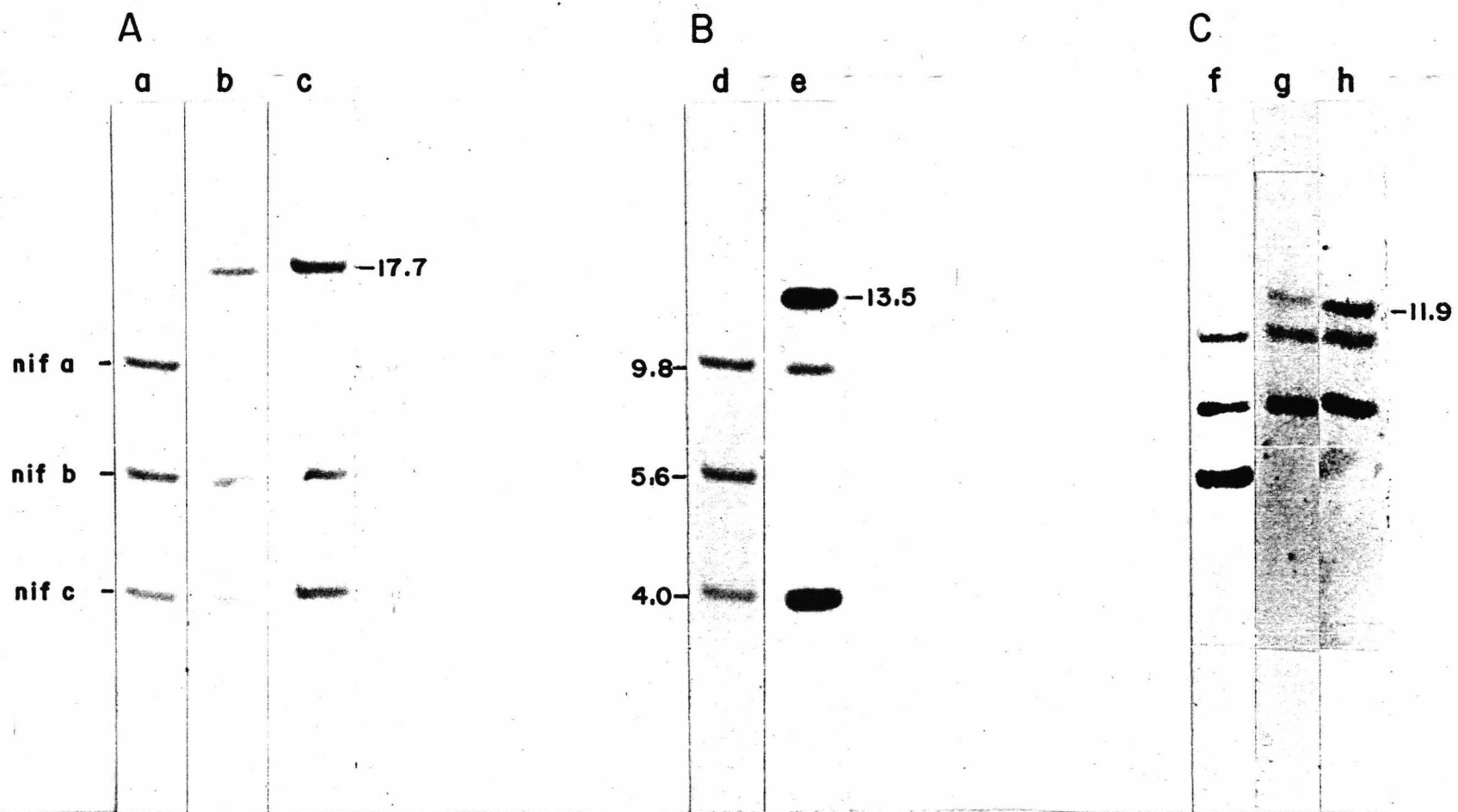


Fig. 5. PATRONES DE HIBRIDIZACION DE LAS FUSIONES GENICAS. El DNA total de las mutantes construidas fue digerido con *Bam*HI y separado por electroforesis. La hibridización se llevó a cabo usando como detector un fragmento interno del gene *nifH*. A: Cepas construidas por recombinación de los plásmidos pEM151 (b) o pEM115 (c) con la cepa CE3 (a) CE3, (b) EM407, (c) EM409. B: Cepa construida por recombinación del plásmido pEM121 con la cepa CE3. (d) CE3, (e) EM410. C: Cepas construidas por recombinación de los plásmidos pEM231 (g) o pEM123 (h) con la CE3. (f) CE3, (g) EM403, (h) EM406.

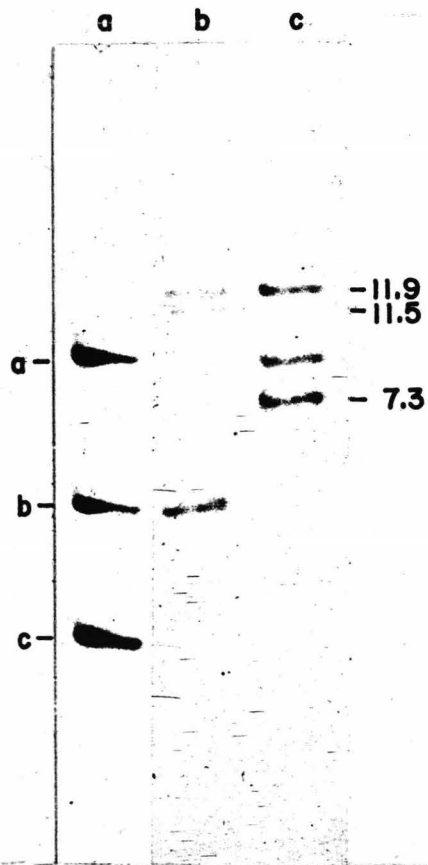


Fig. 6. PATRONES DE HIBRIDIZACION DE LAS DOBLES MUTANTES. El DNA total de las dobles mutantes fue digerido con BamHI y separado por electroforesis. La hibridación se llevó a cabo usando como detector un fragmento interno del gene nifH. Cepas construidas por recombinación del plásmido pJ1115 con la cepa ~~CE3~~. (a) CE3, (b) EM411, (c) EM412.

EM 403



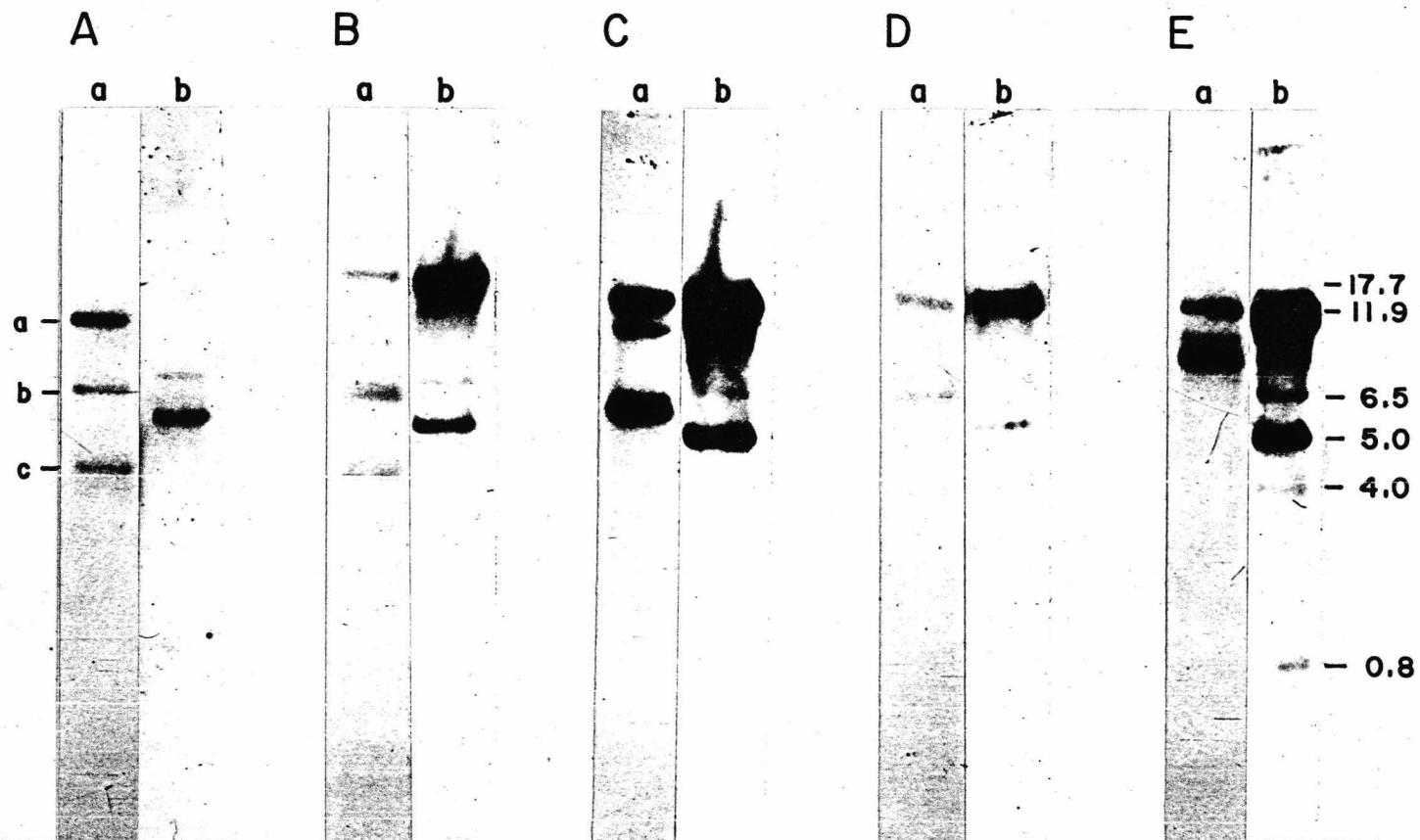


Fig. 7. LOCALIZACION FISICA DEL CASSETTE *lacZ*. El DNA de las cepas fue digerido con *Bam*HI y separado por electroforesis. La hibridación se realizó utilizando como detector un fragmento interno del gene *nifH* (a) o al plásmido *pGS100* (b). A CE3. B EM407, C EM403, D EM411, E EM412.

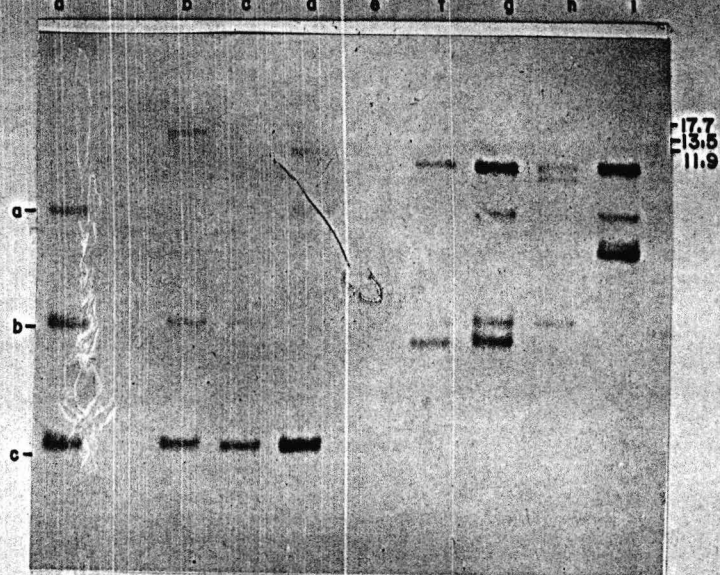


Fig. 8. HIBRIDIZACION DEL DNA DE LOS BACTEROIDES RECUPERADOS DE LOS NODULOS INDUCIDOS POR LAS MUTANTES. La fracción enriquecida con bacteroides fue utilizada para la purificación del DNA, el cual fue digerido con *Bam*HI y separado por electroforesis. Para la hibridización se utilizó como detector un fragmento interno del gene *nifH*. (a) CE3, (b) EM407, (c) EM409, (d) EM410, (e) EM413, (f) EM403, (g) EM406, (h) EM411, (i) EM412. Las muestras se obtuvieron de nódulos del experimento 1 de la tabla 4.

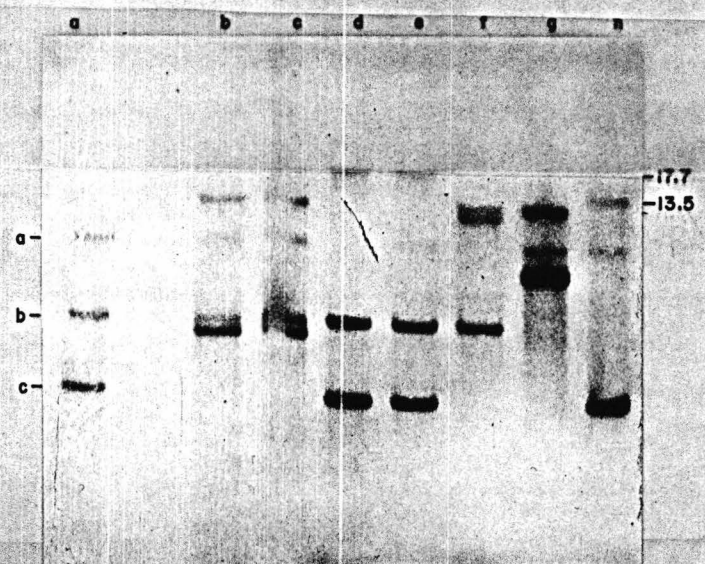


Fig. 9. HIBRIDIZACION DEL DNA DE LOS BACTEROIDES RECUPERADOS DE LOS NODULOS INDUCIDOS POR LAS MUTANTES. La fracción enriquecida con bacteroides fue utilizada para la purificación del DNA, el cual fue digerido con *Bam*HI y separado por electroforesis. Para la hibridización se utilizó como detector un fragmento interno del gene *nifH*. (a) CE3, (b) EM403, (c) EM406, (d) EM407, (e) EM409, (f) EM411, (g) EM412, (h) EM410. Las muestras se obtuvieron de nódulos del experimento 3 de la tabla 5.

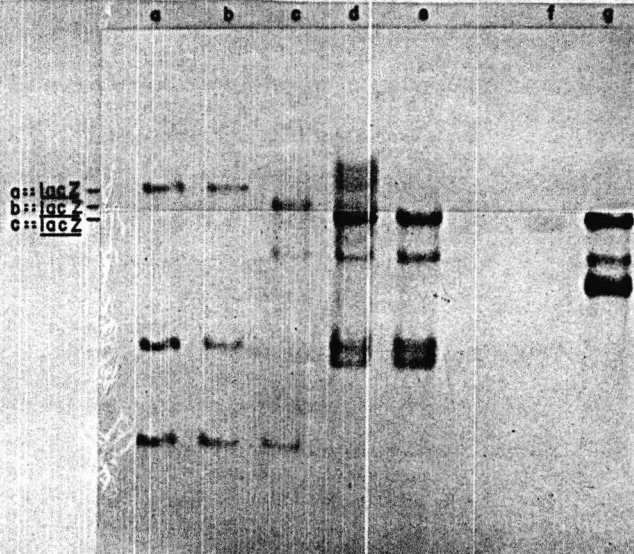


Fig.10. HIBRIDIZACION DEL DNA DE LOS BACTEROIDES RECUPERADOS DE LOS NODULOS INDUCIDOS POR LAS MUTANTES. La fracción enriquecida con los bacteroides fue utilizada para la purificación del DNA, el cual fue digerido con *Bam*HI y separado por electroforesis. Para la hibridización se utilizó como detector un fragmento interno del gene *nifH*. (a) EM407, (b) EM409, (c) EM410, (d) EM403, (e) EM406, (f) EM411, (g) EM412. Las muestras se obtuvieron de los nódulos del experimento 3 de 23 días de la tabla 5.

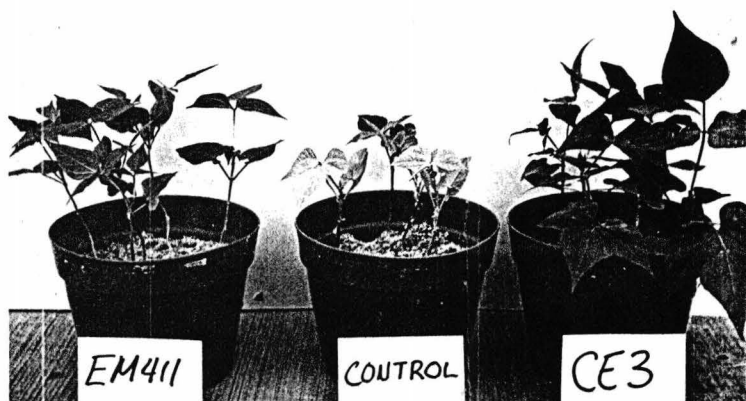
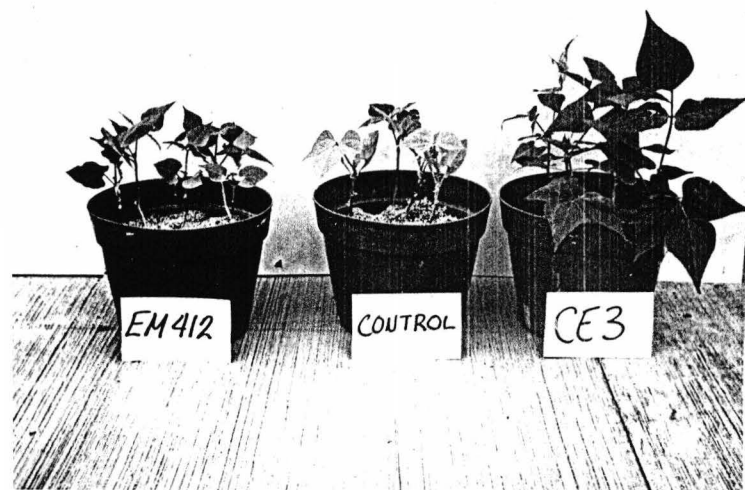
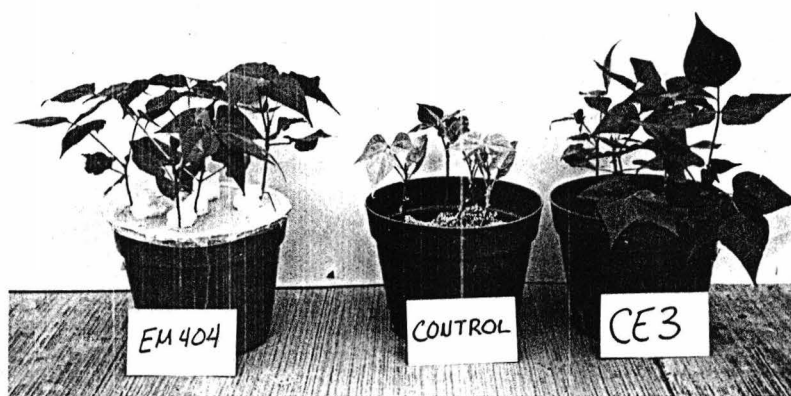
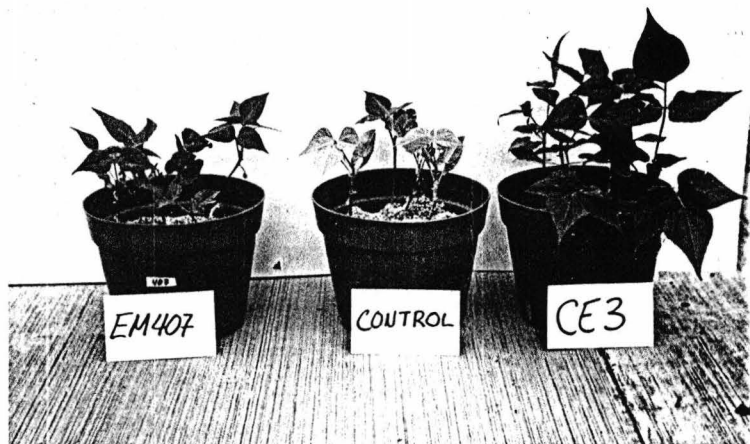
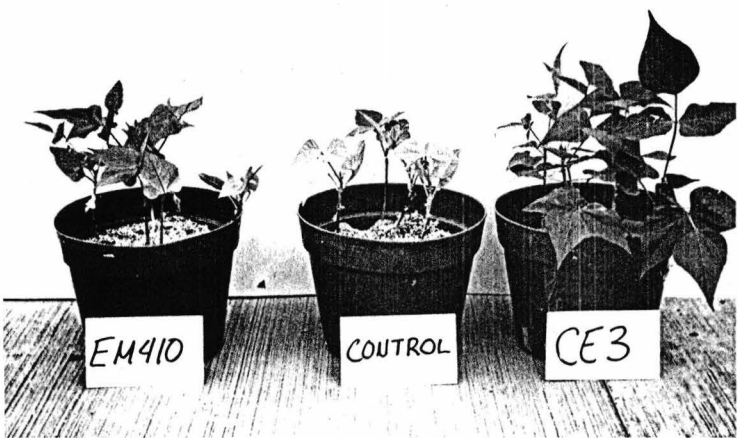


Fig. 11. Plantas infectadas con las distintas mutantes después de 25 días de inoculación.

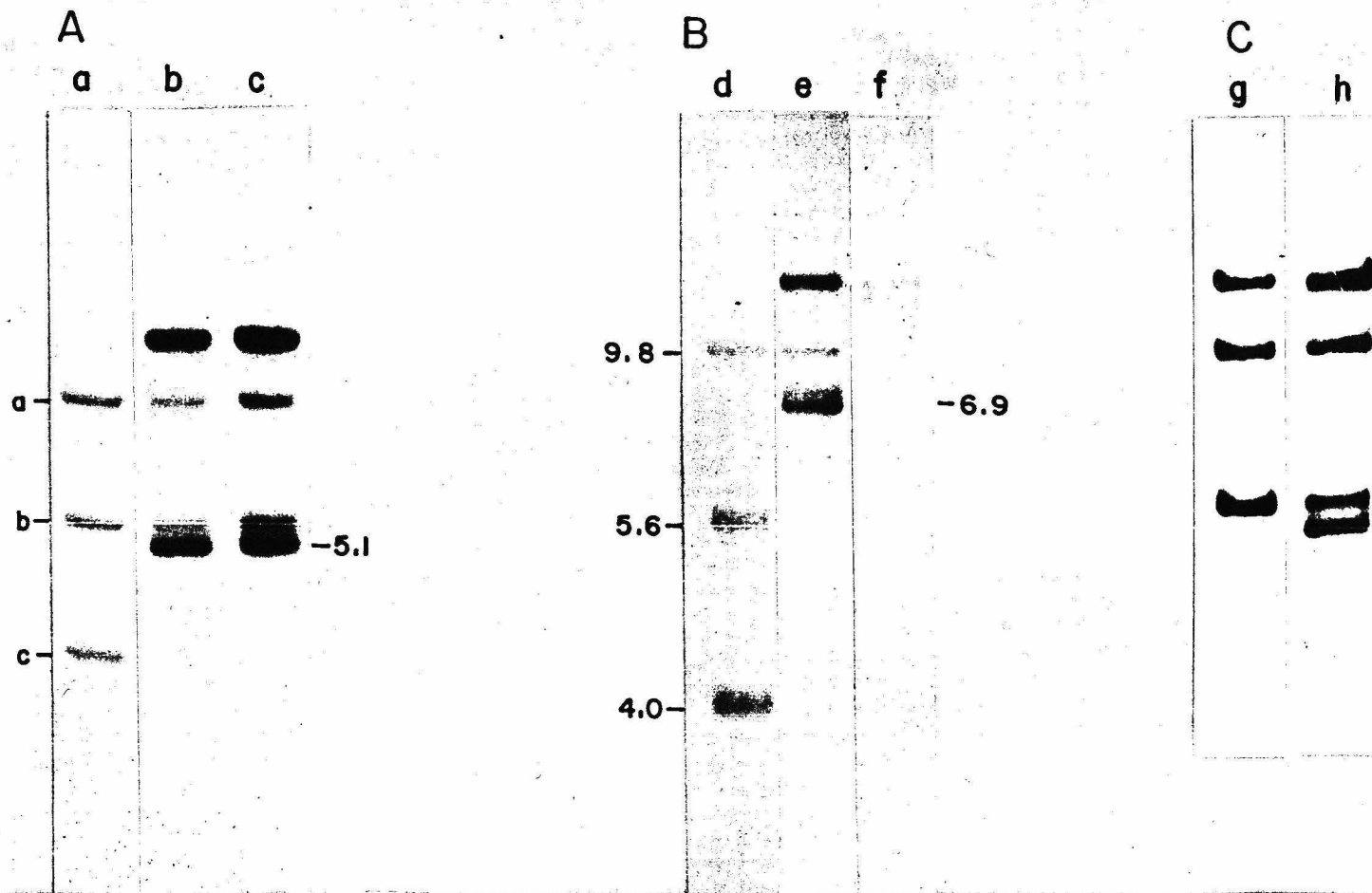


Fig. 12. PATRONES DE HIBRIDIZACION DE LAS CEPAS DEREIVADAS DE LAS FUSIONES *nifHc::lacZ*. El DNA total de las cepas derivadas de las construcciones *nifHc::lacZ* se purificó y se digirió con *Bam*HI, los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis. La hibridización se llevó a cabo usando como detector un fragmento interno del gene *nifH*. A: Derivadas de las cepas EM403 (b) o de la cepa EM406 (c) después de un ciclo de crecimiento. (a) CE3, (b) EM403\*, (c) EM406\*. B: Derivadas de las cepas EM411 (e) o de la cepa EM412 (f) después de dos ciclos de crecimiento. (d) CE3, (e) EM411, (f) EM412\*. C: Cepas construidas por recombinación del plásmido pEM231 con la cepa CE3. (g) EM404, (h) EM404\* (después de un ciclo de crecimiento).

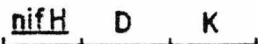
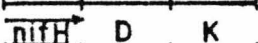
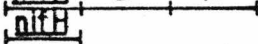
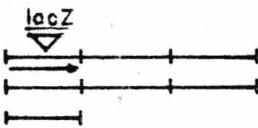
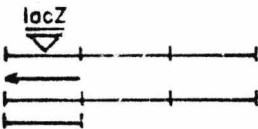
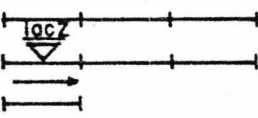
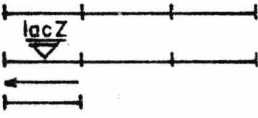
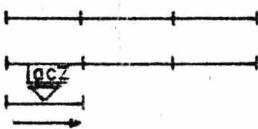
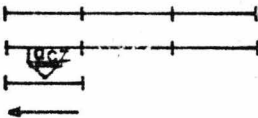
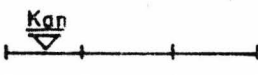

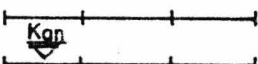
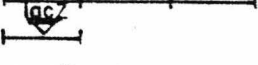
CEPA	GENOTIPO	FENOTIPO		
		Nod	Fix	B-GAL
CE3	nif a  nif b  nif c 	+	+	-
EM407		+	+	+
EM409		+	+	+/-
EM410		+	+	+
EM413		+	+	+/-
EM403		+	+	+
EM406		+	+	+/-
EM411	 	+	+	+
EM412	 	+	+	+

Fig. 13

## REFERENCIAS:

- Ausubel, FM, Buikema, WJ, Earl, CD, Klingensmith, JA, Nixon, BT y Szeto, WW (1985). En: Nitrogen Fixation Research Progress. Evans, HJ Bottomley, PJ y Newton, WE (eds). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrech, pp 165-171.
- Berlinger, JE, Brewin, N, Johnston, AWB, Schulman, HM y Hopwood, DA (1979). The Rhizobium-Legume Symbiosis. Proc.R.Soc. London SerB 204:219-233.
- Beynon, J, Cannon, M, Buchanan-Wollaston, V y Cannon, F (1983). The nif promoters of Klebsiella pneumoniae have a characteristic primary structure. Cell 34:665-675.
- Boyer, HB y Roulland-Dussoix, D (1969). A Complementation Analysis of the restriction and modification of DNA in Escherchia coli. J.Mol.Biol 41:459-472.
- Buck, M, Miller, S y Dixon, R. (1986). Upstream activator secuencias are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature 320:374-378.
- Buikema, WJ, Szeto, WW, Lemley, PV, Orme-Johnson, WH y Ausubel, FM (1985). Nitrogen fixation specific regulatory genes of Klebsiella pneumoniae and Rhizobium meliloti share homology with the general nitrogen regulatory gene ntrC of K. pneumoniae. Nucleic Acids Res. 13:4539-4555.
- Casadaban, M y Cohen, SN (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. PNAS. 76:4530-4533.
- Corbin, D, Ditta, G y Helinski, D (1982). Clustering of Nitrogen Fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti J.Bacteriol 149:221-228.
- Chen, KC, Chen, JS y Johnson, JL (1985). en: Nitrogen Fixation Research Progress (eds. Evans, HJ, Bottomley, RP y Newton, WE) 512 (Martinus Nijhoff, Dordrech).
- Dixon, R (1984). The Genetic Complexity of Nitrogen Fixation. J.Gen.Microbiol. 130:2745-2755.
- Downie, JA, Ma, QS, Knight, CD, Hombrecher, G y 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, I, Manheimer, I y 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.

Fischer, HM, Alvares-Morales, A y Hennecke, H (1986). The plaiotropic nature of simbiotic regulatory mutants: Bradyrhizobium japonicum nifA gene is involved in control of nif gene expression and formation of determinate symbiosis. En prensa.

Guiney, DG y Helinski, DR (1979). Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. J. Bacteriol. 117:619-630.

Kallas, T, Rebiere, MC, Rippka, R y Tandeau de Marsac, N. (1983). The structural nif genes of the Cyanobacteria Gloeotheca sp. and Calothrix sp share homology with those of anabaena sp. but the Gloeotheca genes have a different arrangement. J. Bacteriol. 155:427-431.

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL y Randal, RS (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

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

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

Maniatis, T, Fritsch, EF y Sambrook, J (1982). Molecular cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Martinez, E, Pardo, MA, Palacios, R y Cevallos, M. (1985). Reiteration of nitrogen fixation gene secuencias and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen Microbiol. 131:1779-1786.

Merrick, M, Filser, M, Kennedy, C y 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 (1983). Nitrogen control of the nif regulation in Klebsiella pneumoniae: Involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA. EMBO J. 2:39-44.

Morett, E, Moreno, S y Espin, G (1985). Impaired nitrogen fixation and glutamine synthetase in methionine sulfoximine sensitive (MSs) mutants of Rhizobium phaseoli. M.G.G. 200:229-234.

Morrison, NA, Hau, CY, Trinick MJ, Shine, J y Rolfe, B. (1983). J. Bacteriol. 153:527-531.

Mulligan, JT y Long, SR (1985). Induction of Rhizobium meliloti nodC expression by plant exudate requires nodD. PNAS 82:6609-6613.

Noel, KD, Sanchez, A, Fernandez, L, Leemans, J y Cevallos, MA (1984). Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol 158:148-155.

Nuti, MP, Leipold, AA, Prakash, RK, Schilperoort, RA y Cannon, FC (1979). Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature 182:533-535.

Ow, DW, Sundaresan, V, Rothstein, DM, Brown, SE y 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.

Prakash, RK y Atherly, AF. (1984). Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 160:785-787.

Quinto, C, de la Vega, H, Flores, M, Fernandez, L, Ballado, T, Soberon, G y 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, ML, Calva, E y Palacios, R (1985). Nitrogenase reductase: a multigene family in Rhizobium phaseoli. PNAS. 82:1170-1174.

Rice, D, Mazur, BJ y Haselkorn, R. (1982). Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium Anabaena 7120. J. Biol. Chem. 257:13157-13163.

Rigby, PWJ, Dieckman, M, Rhodes, C y Berg, P (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to a high specific activity in vitro 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 y Ausubel,FM (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. PNAS 77:191-195.

Ruvkun,G, Sundaresan,V y Ausubel,FM (1982). Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation genes. Cell 29:551-559.

Scolnick,PA y Haselkorn,R (1984). Activation of extra copies of genes coding for nitrogenase in Rhodopseudomonas capsulata. Nature 307:289-292.

Scott,K, Hughes,JE, Gresshoff,PM, Beringer,JE, Rolfe,BG y 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 y Shine,J (1983). Nitrogenase structural genes are unlinked in the non-legume symbiont Parasponia Rhizobium. DNA 2:141-148.

Segovia,L. (1985). Tesis de licenciatura. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades.

Simon,R, Priefer,V y 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 y Ausubel,FM (1983). Conservation of nitrogenase promoters from Rhizobium meliloti and Klebsiella pneumoniae. Nature 301:728-732.

Szeto,WW, Zimmerman,JL, Sundaresan,V y Ausubel,FM (1984). A Rhizobium meliloti symbiotic regulation gene. Cell 36:1035-1043.

Wacek,T y Brill,WJ (1976). Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in Soy-bean. Crop.Sci 16:519-522.

Weber,D, Morschel,E, Kort,R, Melor,RB y Bassarab, S. (1984). Planta 162:8-16.

## AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de mi Comité Tutorial y a los miembros del jurado en el examen de grado: M en C Guadalupe Espín, Dr. Rafael Palacios, Dr. Carlos Arias, Dr. Guillermo Dávila, Dra. Gloria Soberón, M en C Luis Servín, por la profunda revisión y constante discusión del presente trabajo.

La realización de esta investigación fue posible gracias al apoyo de una beca otorgada por la Dirección General de Asuntos del personal Académico de la UNAM y por un apoyo complementario por parte del CONACyT.

Prof. [unclear]  
del [unclear]

Nif C es una de las 2a región reguladora  
la frecuencia que interacciona nif A  
diferencia de intensidad



Responde algunas preguntas  
de otras abiertas

Trabajo

Haber a [unclear]  
Mem [unclear]

La banda que aparece con las imágenes es  
el resultado de plantas con 4 por cada de un [unclear]  
estudio más cuantitativo David

— Que significa y como probar algo —

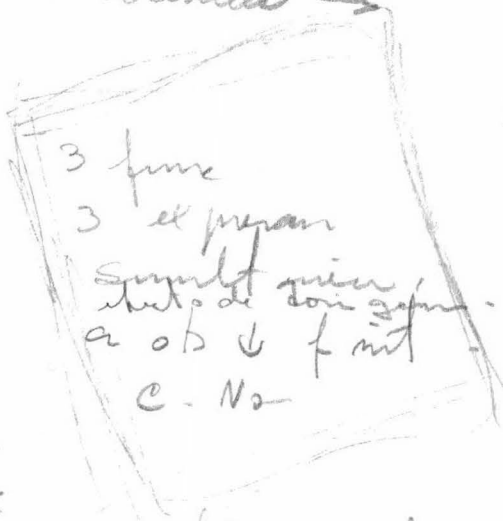
- Eckhardt
- Datos de David
- ← La nueva banda →

inferencia

stress  
increm

10pa es 1 midanda  
4/1 vs 4/2

e-lae



meter comido



Se sabe que al menos 2 se separaban  
no necesariamente simult  
y que ninguna es indep p. fija int a ser  
abre

los 3 se separan  
mult por inferencia.  
datos geminados

exp's de David → plantas incl int a ser  
sign de f [unclear] C  
Eckhardt → [unclear] int emido

datos multos

Si no [unclear]  
congru  
varian

que falta

General que significa datos geminados aquí  
comparar con int [unclear] → [unclear]